

05(К.УН.)
Вісн



ISSN 1728-3817 (загальний)

ISSN 1728-2748 (серійний)



ВІСНИК

**КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

БІОЛОГІЯ

47-48

2006

Подано експериментальні дані про функціонування, будову, розвиток організмів людини, тварин і рослин, одержаних науковцями НДІ фізіології та біологічного факультету. Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та органному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Розраховано на викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

The experimental dates about functioning, content, development of human, animal, plant organismes achived by scientists of research institute and biological faculty. Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР

Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.

**РЕДАКЦІЙНА
КОЛЕГІЯ**

М.Є. Кучеренко, д-р біол. наук, проф., акад. НАН України;
Т.Л. Проценко, канд. біол. наук (відп. секр.); І.В. Якубцова (техн. секр.);
В.М. Войціцький, д-р біол. наук, проф.; С.В. Демидов, д-р біол. наук,
проф.; М.Є. Держинський, д-р біол. наук, проф.; М.С. Мірошніченко,
д-р біол. наук, проф.; М.М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., чл.-кор.
УААН; В.К. Позур, д-р біол. наук, проф.; І.Ю. Костіков, д-р біол. наук,
доц.; В.В. Серебряков, д-р біол. наук, проф.; М.Ю. Макарчук,
д-р біол. наук, проф.; В.П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.

Адреса редколегії

01033, м. Київ-33, просп. акад. Глушкова, 2, корп. 12, біологічний
факультет; (38044) 266 93 67

Затверджено

Вченою радою біологічного факультету
07.02.06 (протокол № 10)

Атестовано

Вищою атестаційною комісією України.
Постанова Президії ВАК України
№ 1-05/7 від 9.06.99

Зареєстровано

Міністерством інформації України.
Свідоцтво про державну реєстрацію КІ № 251 від 31.10.97

**Засновник
та видавець**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
Свідоцтво внесено до Державного реєстру
ДК № 1103 від 31.10.02

Адреса видавця

01601, Київ-601, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43
(38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

Наукова бібліотека
ім. М. Максимовича

КНУ

ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА



11830JB

45 - чит. зап. періодики та дисерт. 37.00

Степанова Л., Кисіль О., Левченко Л., Бабич Л. Оцінка вмісту фосфоліпідів та їхнього жирнокислотного складу в апікальній мембрані ентероцитів за хронічної дії іонізуючої радіації та кадмію	6
Богданова О., Кузьменко Л., Остапченко Л. Активність тирозинпротейнфосфатаз у лімфоїдних клітинах за умов парентерального введення циклоферону опроміненим тваринам	8
Дворченко К., Дворченко О., Діденко Г., Ковальова В. Вплив антиоксидантів на загальний склад білків клітин слизової шлунка при етаноловій виразці	10
Цимбалюк О., Давидовська Т., Холодна Л. Вплив імуноактивної субстанції лейкоцитів на скорочувальні білки серцевого м'яза	12
Євтушенко Н., Ковальова В., Кузьменко Л. Рівень вуглеводів у слизовій оболонці шлунка при експериментальній виразці	15
Майданюк А., Матишевська О., Пивоваренко В. Чутливий спектрофлуориметричний метод кількісного визначення АТФ	16
Бондаренко Л., Гайдай Г. Кислоторозчинний колаген шкіри щурів, уражених карциномою Герена, при навантаженні раціону триптофаном	18
Мартинюк В., Цейслер Ю., Мірошніченко М. Дія електромагнітного поля на процес ренатурації метгемоглобіну, насиченого неполярними лігандами	20
Михальченко В., Мінченко Д., Бобарикіна А., Мінченко О. Структура та експресія 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази в сітківці ока щура	24
Тарасенко І., Макарчук М., Куценко Т. Порівняльний аналіз темної адаптації та гостроти зору при роботі з монітором комп'ютера й паперовими носіями	26
Настенко Є., Білик Л., Янчук П. Зв'язок між периферичним опором судин і показниками кисневого гомеостазу й гемодинаміки у людини	28
Федорчук С., Мірошнік Т., Садовська Ю., Горго Ю. Зв'язки ефективності операторської діяльності зі структурою інтелекту	30
Мартюшева О., Серебряков В. Весняна міграція берегової ластівки (<i>Riparia riparia</i> L.) в Україні за даними фенологічних спостережень	32
Трохименко О., Дзюблик І., Коршун Л., Білоткач К. Застосування резазурину для визначення життєздатності поверхневозалежних культур клітин і оцінки цитотоксичності лікарських засобів	33
Андрійчук О., Семчук Л., Ромашев С., Ігнатенко Т. Аналіз частоти рекомбінацій фагів фітопатогенних бактерій та їхня роль у природі	36
Бабій Н., Молчанець О., Щербінська А. Реплікативна активність вірусу імунодефіциту людини 1 типу в осіб, коінфікованих вірусним гепатитом С	38
Радченко О., Степура Л., Собко В. Деякі закономірності формування біоплівки <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Горелікова О., Держинський М., Пустовалов А., Тормасов І. Зв'язок функціональної активності щитоподібної залози та епіфіза в імунізованих птахів	42
Радченко О., Степура Л., Войціцький В. Розповсюдження у ґрунтах Антарктиди мікроорганізмів, резистентних до гіаміну та антибіотиків	43
Яворська Н., Фурзікова Т., Нестерова О., Позур В. Антимікробні властивості новосинтезованих гетеробіметалевих Cu/M (M = Zn, Cd) комплексів з етилендіаміном	45
Карпенко Н. Електрофоретичне дослідження запасних білків насіння представників триби <i>Coronilleae</i> (Adans.) Boiss	47

CONTENTS

ISSUE 47

Stepanova L., Kysil O., Levchenko L., Babych L. Evaluation of the phospholipids content and their fatty acid composition in the enterocyte apical membrane at chronic influence of the ionizing radiation and cadmium	6
Bogdanova O., Kuzmenko L., Ostapchenko L. Protein tyrosine phosphatase activities in lymphoid cells under conditions of cycloferone treatment of irradiated rats	8
Dvorschenko K., Dvorschenko O., Didenko G., Kovalyova V. Action of antioxidants on the general composition of proteins of cells of gastric mucosa at ethanol ulcer	10
Tsimbalyuk O.V., Davidovska T.L., Kholodna L. The influence of leukocyte immuneactive substances on cardiac muscle contractile proteins	12
Yevtushenko N., Kovalyova V., Kuzmenko L. The carbohydrate levels in gastric mucosa under experimental ulcer development	15
Maidanyuk A., Matyshevska O., Pivovarenko V. The sensitiv fluorimetric method for quantitative determination of ATP	16
Bondarenko L., Gaiday G. Skin acid soluble collagen amino acid composition of rats with Guerin's carcinomas at tryptophan load	18
Martynyuk V., Tseysler Yu., Miroshnichenko M. The influence of extremely low frequency magnetic field on renaturation process of methemoglobin under action of hydrophobic ligands	20
Mykhalchenko V., Minchenko D., Bobarykina A., Minchenko O. Structure and expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-1 in the ret retina	24
Tarasenko I., Macarchuk M., Kutsenko T. Comparative analyses of dark adaptation values and visual acuity during work with computer monitor and paper	26
Nastenko Z., Bilyk L., Yanchuk P. The correlations between pereferral vessel resistance and oxygen homeostasis and hemodinamical indices at human	28
Fedorchuk S., Miroshnik T., Sadovska Yu., Gorgo Yu. Frame of intelligence in connection with efficiency of operator activity	30
Martyusheva A., Serebryakov V. Spring migration of Sand martin <i>Riparia riparia</i> L. in Ukraine according to the fenological observations	32
Trokhymenko O., Dzyublyk I., Korshun L., Bilotkach K. Definition of and viability of anchorage-dependent cell culture and ratings of cytotoxicity of medical products using resazurin	33
Andriychuk O., Semchuk L., Romashev S., Ignatenko T. The analysis of recombination's frequency of the phytopathogenic bacteria phages and their role in nature	36
Babiy N., Molchanets O., Scherbinska A. The replicative activity of HIV-1 in HCV-coinfected person	38
Radchenko O., Stepura L., Sobco V. Some behaviours of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm formation	40
Gorelikova O., Dzerzhynsky M., Pustovalov A., Tormasov I. Correlation between functional activity of the thyroid gland and the epiphysis of the immunized birds	42
Radchenko O., Stepura L., Voitsitsky V. The diversity of Hyamine and antibiotic resistant microorganisms in Antarctica soils	43
Yavorska N., Furzikova T., Nesterova O., Pozur V. The antimicrobial characteristics of the syntetized coordinating combinations	45
Karpenko N. Electrophoretic investigation of seed's storage proteins of tribe <i>Coronilleae</i> (Adans.) Boiss. representatives	47

Богданова О., Прокопова К., Кузьменко Л., Гавриш Л. Вплив імуномодуляторів на вміст циклічних нуклеотидів у лімфоїдних клітинах щурів за умов дії радіації	49
Імедадзе С., Майданюк А. Визначення активності 5'-нуклеотидази тимоцитів	52
Хілько Т., Кравченко О., Левкович Н., Безпалько О. Вплив поліненасиченого фосфатидилхоліну на ліпідний склад плазматичних мембран клітин слизової оболонки шлунка за умов етанолової виразки.....	53
Шкрабак О., Данилович Г., Векліч Т. Локалізація "базальної" Mg^{2+} -АТФази у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин матки свині	55
Новікова І., Паршикова Т. Вплив шестивалентного хрому на життєдіяльність <i>Chlorella vulgaris</i> Beijer. str. ЛАРГ-3.....	58
Кондратюк А., Костіков І. Едафотрофічні водорості ризосфери цукрового буряка	59
Карпенко Н., Баданіна В. Морфологія представників родів <i>Coronilla</i> L., <i>Hippocrepis</i> L., <i>Securigera</i> DC. триби <i>Coronilleae</i> флори України на ранніх етапах онтогенезу	61
Таран Н., Бацманова Л., Мелешко А., Улинець В. Вивчення особливостей біології розвитку <i>Viscum album</i> для розробки стратегії профілактики розповсюдження та боротьби з рослиною-паразитом	63
Войціцький В., Хижняк С., Маніло О., Павлович А. Біохімічні показники сироватки крові риб Антарктики	66
Лукашова К., Ковальова В., Дворченко К., Томачинська Л. Процеси пероксидації ліпідів у ядерній фракції слизової шлунка за умов виразки	68
Хижняк С., Кудрявцева А., Капля О., Осинський Д. Дослідження Ca^{2+} -АТФази у тканинах колоректальної карциноми людини	69
Гавриленко В., Каніболоцький Д., Мірошніченко М., Зима В. Дослідження молекулярної динаміки насиченого іонами кальцію тропоніну С серцевого м'яза	72
Белава В., Панюта О., Таран Н. Особливості гормонального балансу рослин при інфікуванні патогенними грибами.....	74
Ткачук О. Перспективні сорти троянд для озеленення територій промислових підприємств	77
Радченко О., Степура Л. Бактерицидна та спороцидна дія катіонних поверхнево-активних речовин і дезінфектантів, створених на їхній основі	80
Олійник Л. Сучасний стан і основні завдання охорони вищої водної флори й рослинності лівобережного лісостепу.....	82
Топчій Н., Демидов С., Шкляр С., Скрипка К. Негістонові білки хроматину	83
Євтушенко Н., Ковальова В., Кузьменко Л. Активність амінотрансфераз за дії різних чинників при експериментальній виразці.....	87
Вудмаска М., Найдьонов В., Ногарев О., Бучацький Л. Використання полімеразної ланцюгової реакції для діагностики ретровірусу лімфосаркоматозу щук.....	88

CONTENTS

ISSUE 48

Bogdanova O., Prokopova K., Kuzmenko L., Gavrysh L. Influence of immunomodulators on cyclic nucleotide content in lymphoid cells of rats after irradiation exposure	49
Imedadze S., Maidanyuk A. Study 5'-nucleotidase activity thymocytes.....	52
Khilko T., Kravchenko O., Levkovich N., Bezpalko O. Effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on plasmic membranes lipid content of gastric mucosa cells at ethanol ulcer	53
Shkrabak A., Danylovych H. Localization of "basal" Mg^{2+} -ATPase in a pig uterus smooth muscle cells plasmatic membrane	55
Novikova I., Parshikova T. Influence of six-valent chrome on ability to live <i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck str. LARG-3.....	58
Kondratyuk A., Kostikov I. Soil algae of sugar-beet rhizosphere.....	59
Karpenko N., Badanina V. The morphology of genera's <i>Coronilla</i> L., <i>Hippocrepis</i> L., <i>Securigera</i> DC. representatives of <i>Coronilleae</i> tribe within the ukrainian flora on initial age phases of ontogenesis	61
Taran N., Batsmanova L., Melechko A., Ulinets V. Study of <i>Viscum album</i> development biology peculiarities for working-out of spreading prophylaxis and struggle against plant-parasite	63
Voitsitsky V., Hizhnyak S., Manylo O., Pavlovich A. The biochemical characteristics of the blood serum of Antarctic fishes	66
Lukashova E., Kovalyova V., Dvorschenko E., Tomachinska L. Lipid peroxidation processes in nuclear cell mucosa in the way stomach ulcer	68
Hizhnyak S., Kudryavceva A., Kaplya A., Osinsky D. Ca^{2+} -ATPase activity and SERCA 3 detection in human colorectal carcinoma tissues	69
Gavrilenko V., Kanibolotsky D., Miroshnichenko M., Zyma V. Molecular Dynamics of Calcium-saturated Cardiac Troponin C	72
Belava V., Panyuta O., Taran N. Peculiarities of plant hormonal balance under phytopathogenic fungi	74
Tkachuk O. Perspective kinds of roses for gardening in conditions of pollution of free air	77
Radchenko O., Stepura L. Bactericide and sporocidal effect of cationic surfactants and disinfectants, created with them.....	80
Oliylyk L. Present-day state and main tasks of the higher water flora and vegetation protection of the left-bank Ukraine.....	82
Topchiy N., Demidov S., Shklyar S., Skripka K. Nonhistone DNA-binding proteins of the chromatin	83
Yevtushenko N., Kovalyova V., Kuzmenko L. Aminotransferases activities under conditions by effected of different factors on experimental stomach ulcer.....	87
Vudmaska M., Naidyonov V., Nogarev O., Buchatsky L. Application of polymerase chain reaction with the purpose of diagnostics of pike lymphosarcomatous virus	88

ОЦІНКА ВМІСТУ ФОСФОЛІПІДІВ ТА ЇХНЬОГО ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ В АПІКАЛЬНІЙ МЕМБРАНІ ЕНТЕРОЦИТІВ ЗА ХРОНІЧНОЇ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ ТА КАДМІЮ

Досліджено вміст індивідуальних фосфоліпідів і жирнокислотний склад сумарних фосфоліпідів апікальної мембрани ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки за окремої та сумісної хронічної дії іонізуючої радіації та іонів кадмію. Установлено відмінності окремої чи сумісної дії іонізуючої радіації та кадмію на перерозподіл вмісту індивідуальних фосфоліпідів. Поряд з цим, максимальні зміни жирнокислотного складу фосфоліпідів, що призводять до збільшення коефіцієнту насиченості, відбуваються за хронічного кадмієвого навантаження.

The content of the individual phospholipids and fatty acid composition of the total phospholipids of the enterocytes apical membrane of the small intestine mucosa at separate and combined chronic influence of the ionizing radiation and cadmium have been examined. The differences in separate and combined effects of the irradiation and cadmium on the redistribution of individual phospholipids content were revealed. However, the maximal changes of the phospholipids fatty acid composition, leading to the saturation rate increase occur at chronic cadmium consumption.

Вступ. У сучасних умовах спостерігається підвищення радіаційно-хімічного навантаження на організм людини, що може зумовлювати появу нових біологічних ефектів [4]. Особливого значення набуває дослідження механізмів сумісної дії іонізуючої радіації та токсичних хімічних речовин, зокрема важких металів [3]. Кадмій, один із розповсюджених забруднювачів довкілля, характеризується високою токсичною і канцерогенною дією. Першим бар'єром при надходженні сполук кадмію до організму з їжею виступає тонка кишка, основна функція якої полягає в розщепленні й усмоктуванні екзогенних харчових субстратів [7]. Складні процеси травлення, усмоктування та секреції речовин у тонкій кишці можливі завдяки особливостям структурної організації та багатогранності функцій, що виконує плазматична (складовою частиною якої є апікальна) мембрана ентероцитів [7]. Важливу роль у стабілізації молекулярної організації й забезпеченні нормального функціонування плазматичної мембрани відіграють жирні кислоти (ЖК). Ступінь ненасиченості жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів характеризує структурний стан мембрани, обумовлює активність мембранозв'язаних ферментів, латеральний перенос мембранних компонентів і ранню відповідь клітини на зовнішній вплив тощо [1]. У зв'язку з цим, у представленій роботі досліджено особливості окремої чи сумісної хронічної дії іонізуючої радіації та кадмію на фосфоліпідний склад апікальної мембрани ентероцитів тонкої кишки й жирнокислотний склад її фосфоліпідної фракції.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проведені на білих безпородних щурах-самцях, масою 180–200 г. Хронічне зовнішнє γ -опромінення експериментальних тварин здійснювали на установці "ЕТАЛОН" Інституту ядерних досліджень НАН України, яка як джерело випромінювання містила ^{60}Co . Потужність дози становила 0,72 сГр/добу, до досягнення сумарної дози 1,0 Гр. Хлорид кадмію щури отримували з питною водою, яка містила 0,01 мг/л CdCl_2 у перерахунку на метал (10 ГДК). Експериментальних тварин розподіляли на чотири групи: 1 – контрольні тварини; 2 – навантажені іонами кадмію; 3 – опромінені в дозі 1,0 Гр; 4 – піддавали сумісній дії кадмію та опромінення. Щурів

декапітували через 145 діб після впливу зазначених чинників. Виділення препаратів апікальної мембрани (АМ) ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки проводили, як описано у роботі [8] з незначними модифікаціями. Екстракцію ліпідів здійснювали за методом Фолча [10], розділяли методом двомірної тонкошарової хроматографії та визначали їхню кількість [9]. Жирнокислотний склад фосфоліпідів АМ ентероцитів досліджували за методом газорідинної хроматографії [6]. Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики [5].

Результати та їх обговорення. Фосфоліпідний склад біологічних мембран – один з головних факторів, який визначає її структурну організацію та функціональний стан. Дослідження фосфоліпідного складу препаратів АМ контрольних і піддослідних тварин дозволило виявити всі основні фракції фосфоліпідів (ФЛ) у мембранах. Аналіз отриманих результатів свідчить, що в АМ ентероцитів тонкої кишки контрольних тварин найбільше міститься фосфатидилхоліну (ФХ) і фосфатидилетаноламіну (ФЕА) відповідно в середньому 31 і 30 % від загальної суми ФЛ. Найменший вміст їхніх лізоформ: лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) і лізофосфатидилетаноламіну (ЛФЕА) – близько 1,7 % від суми усіх ФЛ (табл. 1). Разом з тим, установлено, що хронічна дія досліджуваних чинників призводить до перерозподілу вмісту індивідуальних ФЛ у АМ (табл. 1). За окремої дії кадмію вміст сфінгомієліну (СФМ) і фосфатидилінозиту (ФІ) зменшується на 17 і 23 % відповідно, а фосфатидилсерину (ФС) – зростає на 64 % щодо контролю. За окремої дії іонізуючої радіації чи сумісно з кадмієм вміст ФХ зменшується відповідно на 42 і 24 %, СФМ на 29 і 62 %, ФІ – на 60 і 50 % щодо контролю. Разом з тим, відносний вміст ФС за цих умов впливу зростає в 5,6 і 3,5 раза відповідно. Вміст ФЕА зменшується на 31 % лише за окремої дії іонізуючої радіації. Спостерігається також значне зростання вмісту лізоформ ФЛ (ЛФХ та ЛФЕА), приблизно в 1,8–4,3 раза відносно контролю за всіх умов досліджень. Установлено, що за хронічної дії випромінювання вміст загальної фракції ФЛ у препаратах АМ знижується в середньому на 17 %, а сумісно з кадмієм – на 22 % щодо контролю (дані не наведено).

Таблиця 1. Вміст індивідуальних фосфоліпідів у препаратах АМ ентероцитів тонкої кишки (% від суми фосфоліпідів) за хронічної дії іонізуючої радіації та кадмію ($M \pm m$, $n=7$)

Фосфоліпід	Контроль	Кадмій	Іонізуюча радіація	Кадмій + іонізуюча радіація
фосфатидилхолін	31,4 $\pm$ 2,1	26,1 $\pm$ 1,8	18,2 $\pm$ 1,4*	25,1 $\pm$ 1,8*
фосфатидилетаноламін	30,5 $\pm$ 2,7	26,5 $\pm$ 2,3	21,4 $\pm$ 1,4*	29,4 $\pm$ 2,3
сфінгомієлін	12,6 $\pm$ 0,9	10,4 $\pm$ 0,7	9,0 $\pm$ 0,7*	4,8 $\pm$ 0,4*
фосфатидилінозитол	4,7 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,3*	1,9 $\pm$ 0,2*	2,4 $\pm$ 0,2*
фосфатидилсерин	3,3 $\pm$ 0,3	5,4 $\pm$ 0,4*	18,5 $\pm$ 1,5*	11,5 $\pm$ 1,0*
лізофосфатидилхолін	1,7 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,3*	4,6 $\pm$ 0,3*	7,4 $\pm$ 0,7*
лізофосфатидилетаноламін	1,6 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,4*	3,9 $\pm$ 0,3*	2,8 $\pm$ 0,2*
невизначені фосфоліпід	13,1 $\pm$ 1,0	20,4 $\pm$ 1,7*	22,3 $\pm$ 1,9*	16,6 $\pm$ 1,2*

* – $P \leq 0,05$ відносно контролю.

Таким чином, дія досліджуваних чинників по-різному впливає на вміст індивідуальних ФЛ в АМ ентероцитів: рівень основних ФЛ достовірно знижується лише за дії іонізуючого випромінювання, окремо чи сумісно з кадмієм; за цих самих умов у найбільшій мірі змінюється вміст міnorних ФЛ. Водночас, у разі дії всіх чинників виявлено збільшення рівня лізоформ (ЛФХ і ЛФЕА).

Особливості структури жирнокислотних ланцюгів ліпідів визначають спосіб пакування ліпідів у мембранах, білок-ліпідні та ліпід-ліпідні взаємодії, мікрров'язкість мембран тощо. Зміни жирнокислотного складу можуть надавати молекулам ФЛ інших властивостей. У зв'язку

з цим проведено дослідження ЖК фосфоліпідів АМ. У загальній фракції ФЛ виявлено та ідентифіковано 24 ЖК з довжиною вуглецевого ланцюга від C_{12} до C_{22} (табл. 2). У контролі серед насичених ЖК найбільше представлена пальмітинова ($C_{16:0}$) (у середньому 23 % від усіх ЖК) і стеаринова ($C_{18:0}$) – 12 %. Загальний же вміст насичених ЖК становить у середньому 39,31 %. Ненасичені ЖК представлені в основному олеїновою ($C_{18:1}$; 20,7 %), лінолевою ($C_{18:2}$; 15,83 %) та арахідоною ($C_{20:4}$; 17,72 %) кислотами, сумарний вміст яких становить у середньому 54,25 % від усіх ЖК, а вміст ненасичених ЖК досягає 61 %.

Таблиця 2. Жирнокислотний склад сумарної фракції фосфоліпідів апікальної мембрани ентероцитів тонкої кишки (% від суми всіх кислот) за хронічної дії іонізуючої радіації та іонів кадмію ($M \pm m$, $n = 7$)

Символ жирної кислоти	Контроль	Кадмій	Іонізуюча радіація	Кадмій + іонізуюча радіація
12 : 0	0,44 ± 0,05	0,11 ± 0,02*	0,33 ± 0,04*	0,10 ± 0,02*
14 : 0	0,80 ± 0,07	0,13 ± 0,01*	0,63 ± 0,07*	0,73 ± 0,06
14 : 1	0,07 ± 0,02	сліди	0,06 ± 0,02	сліди
15 : 0	0,43 ± 0,05	0,07 ± 0,02*	0,34 ± 0,05*	0,43 ± 0,03
15 : 1	1,40 ± 0,12	0,65 ± 0,05*	1,30 ± 0,11	0,70 ± 0,05
16 : 0	22,80 ± 1,85	14,85 ± 1,28*	19,66 ± 1,24	26,72 ± 2,03
16 : 1	1,04 ± 0,08	0,32 ± 0,04*	1,03 ± 0,09	1,01 ± 0,08
16 : 2	0,16 ± 0,02	сліди	0,13 ± 0,01	сліди
17 : 0	0,72 ± 0,06	0,19 ± 0,02*	0,68 ± 0,07	0,91 ± 0,07*
17 : 1	0,24 ± 0,03	0,30 ± 0,02*	0,20 ± 0,03	0,30 ± 0,02*
18 : 0	11,90 ± 0,89	48,90 ± 4,38*	11,68 ± 1,07	14,00 ± 1,22
18 : 1	20,70 ± 1,87	10,47 ± 0,98*	21,57 ± 2,15	17,43 ± 1,58
18 : 2	15,83 ± 1,39	8,66 ± 0,75*	18,08 ± 1,90	12,44 ± 0,86*
18 : 3	0,29 ± 0,02	сліди	0,21 ± 0,03*	сліди
20 : 0	1,07 ± 0,08	4,46 ± 0,32*	0,88 ± 1,13	1,52 ± 0,10*
20 : 3	0,62 ± 0,05	0,25 ± 0,03*	0,73 ± 0,06	0,99 ± 0,07*
20 : 4	17,72 ± 1,67	8,89 ± 0,76*	18,92 ± 1,80	19,47 ± 1,76
21 : 0	0,41 ± 0,05	сліди	0,45 ± 0,05	0,41 ± 0,03
22 : 0	0,74 ± 0,06	0,32 ± 0,02*	0,59 ± 0,06*	1,59 ± 0,12*
22 : 1	0,26 ± 0,01	сліди	0,27 ± 0,01	сліди
22 : 2	0,22 ± 0,02	сліди	0,14 ± 0,02*	сліди
22 : 3	0,89 ± 0,09	0,11 ± 0,01*	0,88 ± 0,07	0,25 ± 0,03*
22 : 4 w 6	0,70 ± 0,08	0,10 ± 0,02*	0,54 ± 0,06*	0,36 ± 0,05*
22 : 5 w 6	0,52 ± 0,04	0,35 ± 0,02*	0,44 ± 0,03	0,55 ± 0,06
Насичені	39,31 ± 3,56	69,03 ± 5,81*	35,24 ± 2,89	46,41 ± 4,13
Ненасичені	60,66 ± 5,87	30,10 ± 2,76*	64,50 ± 6,04	53,50 ± 5,21
Коефіцієнт насиченості	0,64 ± 0,05	2,29 ± 0,19*	0,54 ± 0,04	0,87 ± 0,06*

Проведені дослідження свідчать, що хронічне опромінення викликає зменшення вмісту насичених ЖК у середньому від 14 до 25 %. Поряд з цим спостерігається зниження вмісту окремих ненасичених ЖК: лінолевої ($C_{18:2}$) і докозодокаєнової ($C_{22:2}$) на 28 та 36 % відповідно. Виявлені зміни приводять до незначного зменшення коефіцієнта насиченості. Найбільш впливає на перерозподіл вмісту ЖК у фосфоліпідах АМ ентероцитів окрема дія кадмію. Зменшення вмісту таких коротколанцюгових насичених ЖК, як міристинової ($C_{14:0}$) і пальмітинової ($C_{16:0}$) у середньому у 2 рази, пентадеканової ($C_{15:0}$) у 6 разів відбувається на тлі зростання вмісту стеаринової ($C_{18:0}$) та арахідоної ($C_{20:0}$) кислот у середньому в 4 рази. Це може бути пов'язано з порушенням процесу синтезу пальмітинової кислоти, яка є попередником інших довголанцюгових ЖК. Кількість ненасичених ЖК за цих же умов зменшується. Найбільшою мірою це стосується олеїнової ($C_{18:1}$) та арахідонової ($C_{20:4}$) – у 2 рази, пальмітолеїнової ($C_{16:1}$) – у 3 рази, докозотетраєнової ($C_{22:4}$) – у 7 разів, докозотриєнової ($C_{22:3}$) – у 8 разів. Перерозподіл вмісту окремих ЖК призводить до значного збільшення коефіцієнта насиченості в середньому у 3,5 рази. Подібне зниження вмісту

ненасичених ЖК може зумовлюватись зростанням переробки процесів окиснення [2].

Сумісна дія випромінювання та іонів кадмію характеризується різноспрямованими змінами вмісту насичених і ненасичених ЖК ФЛ. Серед насичених ЖК збільшується вміст лише таких довголанцюгових, як арахідова ($C_{20:0}$) і бегонова ($C_{22:0}$) у середньому у 2 рази. Разом з тим, ненасичені ЖК змінюються по-різному: поряд із зниженням кількості пентадеєнової ($C_{15:1}$), лінолевої ($C_{18:2}$), докозотриєнової ($C_{22:3}$) та докозотетраєнової ($C_{22:4}$) кислот у середньому в 1,3–3,5 рази відбувається зростання кількості гептадеєнової ($C_{17:1}$) та ейкозатриєнової ($C_{20:3}$) кислот на 25 та 60 % відповідно. Результатом цих змін є збільшення коефіцієнта насиченості на 36 %.

Оптимальний рівень насиченості ліпідів мембран підтримується цілою низкою процесів, на які по-різному можуть впливати досліджувані чинники. У результаті може порушуватись співвідношення швидкості синтезу насичених ЖК та їхньої денатурації (підтримання рівня ненасичених кислот), що проявляється у зміні величини коефіцієнту насиченості. Виявлено відмінності модифікації жирнокислотного складу фосфоліпідів АМ за окремої дії кадмію чи опромінення. Якщо в першому

випадку вміст ненасичених ЖК зменшується, а насичених – зростає, то у другому – навпаки. За сумарної дії досліджуваних чинників зміни ЖК складу призводять до менш вираженого перерозподілу вмісту їхньої насиченої та ненасиченої компоненти.

Таким чином, встановлено, що за дії іонізуючого випромінювання окремо чи сумісно з кадмієм знижується рівень основних ФЛ. Зменшення вмісту функціонально важливих ФЛ може свідчити про пригнічення синтезу цих сполук. За цих самих умов змінюється вміст міnorних ФЛ, наприклад СФМ, що, можливо, пов'язано зі сповільненням реакції утворення його із ФХ. Надходження кадмію призводить до перерозподілу вмісту лише міnorного компонента. Водночас за цих умов перерозподіл вмісту окремих ЖК ФЛ є причиною значного збільшення коефіцієнта насиченості. Істотно збільшується вміст ПФХ і ПФЕА в АМ за всіх умов впливу досліджуваних чинників. У той же час, різноспрямовані зміни вмісту індивідуальних ФЛ, з одного боку, пояснюють незначні зміни вмісту загальної фракції фосфоліпідів мембран, а з іншого – можуть свідчити про різну чутливість окремих процесів, які відповідні за синтез і розпад певних ФЛ. Аналіз наведених даних, які характеризують стан фосфоліпідної компоненти ліпідів апікальної мембрани ентероцитів тонкої кишки, свідчить про відмінності їхньої модифікації за окремої чи сумісної дії іонізуючої радіації та кадмію.

Висновки. 1. Установлено що за хронічної окремої чи сумісної дії іонізуючої радіації та кадмію спостерігається перерозподіл у вмісті індивідуальних фосфоліпідів в апікальній мембрані ентероцитів. 2. За умов хронічної окремої дії кадмію чи сумісно з опроміненням виявлено перерозподіл вмісту жирних кислот у фосфоліпідній фракції, що призводить до зростання коефіцієнту насиченості. 3. Виявлені зміни у фосфоліпідному та жирнокислотному складі апікальної мембрани ентероцитів тонкої кишки щурів за умов хронічного дослідження, можливо, пов'язані з різноспрямованими порушеннями метаболізму, які призводять до структурних змін плазматичної мембрани.

1. Иевов В.Г., Берестовский Г.Н. Липидный бислой биологических мембран. – М., 1982. 2. Каган В.Е., Оргом О.Н., Прилипко Л.Л. Проблема анализа эндогенных продуктов ПОЛ // Итоги науки и техники. – 1986. – Т. 18. 3. Маньора Г.Б., Грубинко В.В. // Доп. НАН України. – 2003. – № 11. – С. 167–170. 4. Осипов А.Н., Григорьев М.В., Сытин В.Д. и др. // Радиация биол. Радиоэкол. – 2000. – Т. 40, № 4. – С. 373–377. 5. Плохинский В.М. Математические методы в биологии. – М., 1981. 6. Синяк К.М., Оргель М.Я., Круг В.И. // Лаб. дело. – 1976. – № 1. 7. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Тимофеева Н.М. // Физиол. журн. СССР. – 1992. – Т. 78, № 8. – С. 1–20. 8. Цвилюховський Н.И., Усатюк Г.В., Мельничук Д.А. // Укр. биохим. журнал. – 1988. – Т. 60, № 6. – 91–94. 9. Brockhuysse R.M. // Biochim. Biophys. Acta. – 1968. – Vol. 152, № 2. 10. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, № 2.

Надійшла до редколегії 05.10.05

УДК 613.648.4+612.112:577.152.3

О. Богданова, канд. біол. наук, Л. Кузьменко, асп.,
Л. Остапченко, д-р біол. наук

АКТИВНІСТЬ ТИРОЗИНПРОТЕІНФОСФАТАЗ У ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИНАХ ЗА УМОВ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ ЦИКЛОФЕРОНУ ОПРОМІНЕННЯМ ТВАРИНАМ

Установлено, що введення контрольним тваринам циклоферону знижувало активність тирозинових протеїнфосфатаз у плазматичних мембранах і підвищувало її в цитозолі клітин як тимусу, так і селезінки. Чутливість досліджуваних ферментів до дії радіації була різною: найвищі значення активності мембраноасоційованих тирозинових протеїнфосфатаз клітин як тимусу, так і селезінки були встановлені після опромінення тварин у дозі 1,0 Гр, у цитозолі тимоцитів активність була найвищою за дії радіації в дозі 0,75 Гр, спленоцитів – у дозі 0,25 Гр після введення циклоферону

Cycloferone treatment leads to decreasing of protein tyrosine phosphatase activities in plasma membranes and increasing in cytosol in spleen, the same way as thymus lymphocytes. There are the highest means of the activities in membranes after ionizing irradiation in dose 1.0 Gy cytosol of thymus – 0,75 Gy, cytosol of spleen – 0,25 Gy in cycloferone treated animals

Вступ. Фосфорилування білків є одним із ключових механізмів передачі сигналу від цитокінів, ростових факторів, гормонів і антигенів. До сукупності цитокінінних агентів, ефект яких реалізується за участю ферментів тирозинового фосфорилування білків, належать інтерферони – група біологічно активних білкових сполук з антивірусною, антипроліферативною, імунomodуючою та радіозахисною активністю. Реалізація цих ефектів відбувається, головним чином, опосередковано клітинами гематопоетичного ряду. На ранніх стадіях інтерферон-індукованої сигнальної трансдукції збільшується вміст фосфотирозину, що відіграє одну з ключових ролей у реалізації цього процесу. Тому актуальним є вивчення питання про участь тирозинових протеїнфосфатаз, ТПФаз, протеїн-тирозинфосфат фосфогідролаз, КФ 3.1.3.48 у інтерферон-індукованій регуляції відповіді лімфоїдних клітин.

Об'єкт і методи досліджень. Досліди були проведені на нелінійних білих щурах обох статей масою 150–200 г. Циклоферон (індуктор синтезу інтерферону) вводили щурам перед опроміненням шляхом внутрішньочерев-

них ін'єкцій у дозі 62 мг/кг ваги двічі на добу протягом 5 днів перед опроміненням згідно з рекомендаціями статті [10]. Опромінення проводили на установці РУМ-17 за умов, які описано раніше [6]. Тварин декапували через 12 год після опромінення та виділяли лімфоїдні клітини із селезінки й тимусу контрольних і опромінених щурів осадженням на градієнті Ficoll-Paque (густина 1,077 г/см³), як описано в роботі [8]. Отриману суспензію лімфоїдних клітин гомогенізували в гомогенізаторі з тефлоновим пестиком. Гомогенат центрифугували (20000 g; 30 хв) для видалення ядер, мітохондрій і везикул апарату Гольджі. Осад відкидали, а супернатант використовували для отримання фракцій мембран і цитозолу за методом, описаним у роботі [7], центрифугуванням на 30 % сахарозному градієнті (густина 1,127). ТПФазна активність була визначена за вмістом неорганічного фосфату як кінцевого продукту реакції [1].

Результати та їх обговорення. Сьогодні підтверджено протипроменеві властивості інтерферону та його індукторів. При введенні інтерферону спостерігається зменшення негативних наслідків променевої терапії, приско-

рення відновлювальних процесів і зменшення рівня проліферації клітин. Механізм дії інтерферону пов'язаний з дерепресією контролюючих процеси репарації генів і, як наслідок, з підсиленням ексцизійної та постреплікативної репарації. Показано, що передмутагенна обробка клітин інтерфероном супроводжується стабілізацією структури ДНК, що призводить до зменшення кількості розривів. Серед штучних індукторів синтезу інтерферону нами було обрано препарат "Циклоферон" – низькомолекулярну сполуку (сіль акридооцтової кислоти та N-метилглюкамину), який використовується для індукції високих титрів інтерферону при імунodefіцитних станах різного походження та аутоімунних захворюваннях, а також при лікуванні онкологічних захворювань [3]. Перевага циклоферону перед іншими препаратами полягає в тому, що введення його має наслідком не лише індукцію синтезу всіх видів інтерферонів, а й деяких цитокінічних речовин, зокрема ІЛ1 та ІЛ2, які не є чужорідними для організму. Уведення циклоферону в клітинну суспензію створює умови для активації систем інтерферонзалежної сигнальної трансдукції після променевого впливу [5]. Крім того, показано, що введення циклоферону тваринам з експериментальною виразкою шлунка мало потенціюючий вплив на ТПФазні системи лімфоцитів [2].

Таким чином, показано, що циклоферон – це високоактивний індуктор синтезу інтерферону, який є спорідненим до пулу лімфоїдних клітин. Оскільки передача сигналу від інтерферону є взаємопов'язаною з ферментативними системами тирозинового фосфорилування білків, визначення ролі тирозинових протеїнфосфатаз у подібних процесах за умов тотального опромінення організму є важливим питанням, для вирішення якого нами було досліджено тирозинпротеїнфосфатазну активність у плазматичних мембранах і цитозолі лімфоїдних клітин селезінки та тимусу щурів, опромінених різними дозами в сублетальному діапазоні (рис. 1) за умов уведення тваринам циклоферону протягом 5 діб перед опроміненням.

Нами було встановлено складну дозозалежну картину змін активності ТПФаз у післяпроменевий період. Іонізуюче опромінення тварин у дозі 0,25 Гр не мало значного впливу на ТПФазну активність клітин лімфоїдних органів, окрім ферментів цитозолу脾еноцитів, де спостерігалось підвищення дефосфорилуючої здатності ферменту в 1,5 рази. Найбільше зростання активності тирозинових протеїнфосфатаз спостерігалось за умов впливу іонізуючої радіації в дозі 0,5 Гр в усіх дослідженнях, крім цитозольних фракцій лімфоцитів селезінки, де значення практично не відрізнялись від контрольних. Так, зростання активності ТПФаз тимоцитів становило 1,3 рази (у мембраноасоційованій формі), 2,5 рази (у цитозолі) і 1,4 рази – для ТПФаз мембран脾еноцитів.

Опромінення тварин у дозах 0,75 і 1,0 Гр мало інгібуючий ефект на каталітичну здатність ферментативних систем дефосфорилування білків лімфоїдних клітин в усіх досліджуваних субфракціях порівняно із впливом радіації в менших дозах. Найбільш вираженим такий ефект був у випадку мембраноасоційованих ферментів тимоцитів і цитозольних тирозинпротеїнфосфатаз клітин селезінки – значення були нижче контрольних. У цитозолі клітин тимусу активність ферментів залишалась вище контрольної; для мембраноасоційованих ТПФаз клітин селезінки було наближення значень до контрольного рівня.

У разі відсутності променевого впливу ефект уведення циклоферону на ТПФазні системи імункомпетентних клітин полягав у інгибуванні мембраноасоційованої активності, тоді як цитозольні форми ферменту набували значно більшої дефосфорилуючої здатності (рис. 1). Така картина змін є відповідною процесам пригнічення проходження зовнішньоклітинних сигналів і може свідчити про перебування імункомпетентних клітин у стані відносного спокою.

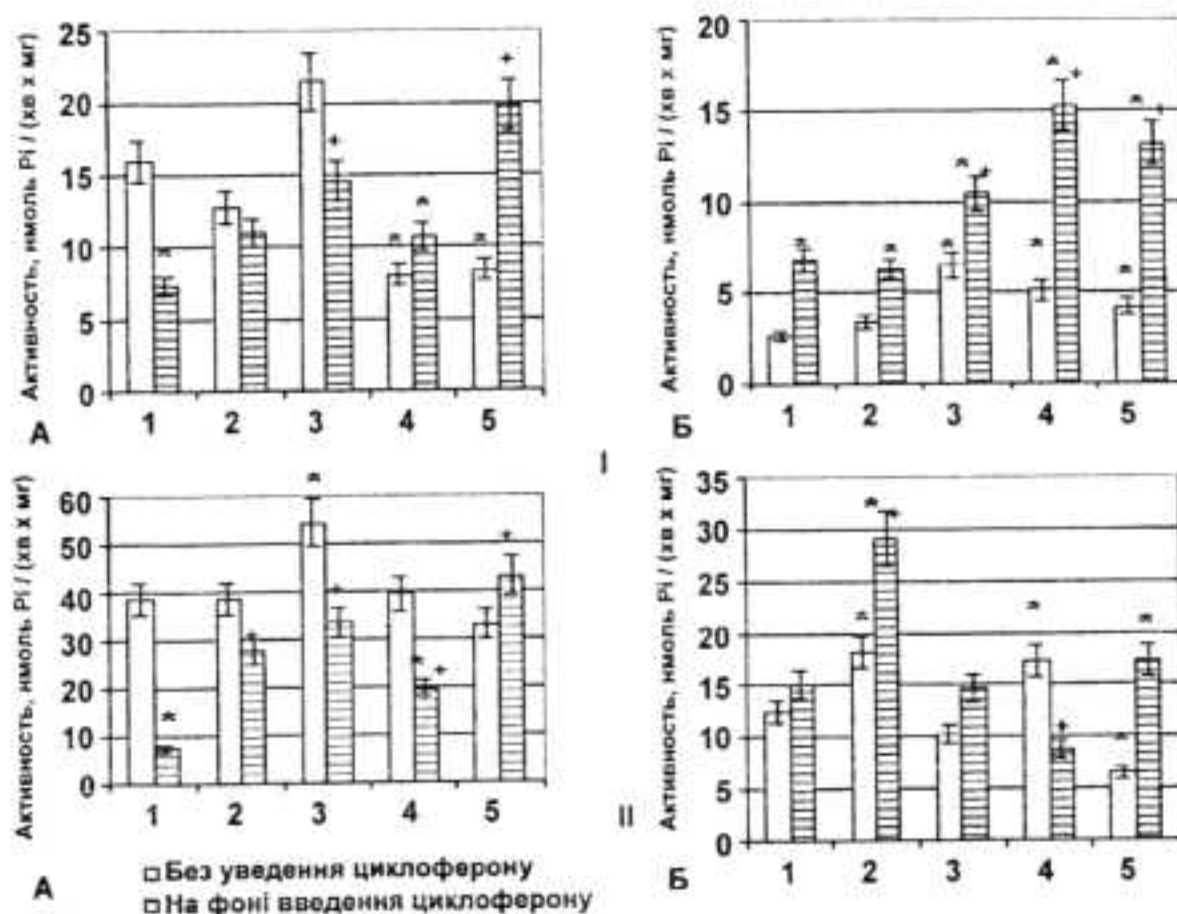


Рис. 1. Активність тирозинпротеїнфосфатаз у плазматичних мембранах (А) і цитозолі (Б) лімфоїдних клітин тимусу (І) і селезінки (ІІ) щурів за впливу іонізуючого випромінювання на фоні введення циклоферону, нмоль Рі (хв * мг білка)⁻¹, n = 6: 1 – контроль; рентгеновське опромінення: 2 – у дозі 0,25 Гр; 3 – у дозі 0,5 Гр; 4 – у дозі 0,75 Гр; 5 – у дозі 1,0 Гр; p < 0,05 порівняно з контролем: * – без введення циклоферону; + – на фоні введення циклоферону

При порівнянні активності ТПФаз після впливу променевого фактора за різних дозових значень з рівнем цих показників без введення циклоферону нами було показано, що найсуттєвішого підвищення ферментативна активність набувала за високих доз опромінення – 0,75 та 1,0 Гр за виключенням цитозольних ТПФаз лімфоїдних клітин селезінки, що може бути пов'язаним більш значною радіочутливістю спленоцитів. Дія циклоферону в цьому випадку є вираженою у зростанні стимулюючої дії іонізуючого випромінювання за дози 0,25 Гр.

На фоні введення циклоферону максимальні значення активності ТПФаз відзначено за дії більшої дози променевого фактора, ніж у контролі, у більшості з досліджуваних зразків за виключенням цитозольних ТПФаз лімфоцитів селезінки.

Така стимуляція дефосфорилуючої здатності ферментів може бути наслідком циклоферон-індукованого синтезу інтерферону та інших цитокінних сполук, вплив яких призводить до стабілізації ядерного апарату клітини та підсилення відповіді на подібний ушкоджуючий чинник [5]. Таке припущення збігається з даними про стимуляцію синтезу інтерферону за дії іонізуючого випромінювання в сублетальних дозах [9].

Зростання активності мембраноасоційованих ферментів після дії іонізуючого опромінення в дозі 1,0 Гр не відповідало змінам активності ТПФаз цитозольних субпопуляцій і свідчило про різні шляхи впливу діючої речовини на досліджувані субпопуляції ферментативних систем.

Оскільки паренхіма тимусу складається з клітин різного ступеня дозрівання, саме стимуляція цих клітин циклоферон-індукованими біологічно активними сполуками може відігравати значну роль у формуванні радіаційно-стійкого пулу клітин та, відповідно, перенесення найбільш значного зростання рівня активності ТПФаз у бік вищих доз опромінення. У клітинах селезінки вве-

дення циклоферону сприяло зростанню рівня активізації цитозольних ТПФаз за дози 0,25 Гр. Максимум мембраноасоційованої ТПФазної активності спленоцитів після введення циклоферону був визначений при опроміненні значно більшою дозою, ніж у контрольних тварин, що також може бути наслідком протипроменевої дії цієї речовини.

Висновок. Введення циклоферону перед опромінюванням призводило до переміщення максимальних значень активності тирозинових протеїнофосфатаз лімфоцитів у бік більш значного впливу променевого фактора. У цитозольних субфракціях клітин селезінки ефект введення циклоферону полягав у більшому зростанні ТПФазної активності після опромінення в дозі 0,25 Гр.

1. Биохимические, иммунологические и биофизические методы в токсикологическом эксперименте: Методическое руководство / Сост. У.А. Кузьминская и др. – К., 1989. 2. Богданова О.В., Кузьменко Л.И., Кравченко О.М. та ін. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2004. – № 43. – С. 58–59. 3. Горячева Л.Г., Тихонова В.А., Рогозина Н.В. и др. // Terra Medica nova. – 1999. – № 1. – С. 6–9. 4. Коваленко А.П., Казаков В.И., Слута А.В. // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 7. – С. 659–663. 5. Михайлик І.В. Функціонування інтерферонозалежних систем трансдукції сигналу в лімфоїдних клітинах щурів за умов дії іонізуючої радіації: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2002. 6. Остапченко Л.І. Молекулярні механізми регуляції активності циклонуклеотид- та кальційзалежних протеїніналімфоїдних клітин в умовах радіаційного впливу. – К., 1999. 7. Рыбальченко В.К., Коганов Н.М. Структура и функции мембран: Практикум – К., 1988. 8. Boyum A. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21. – P. 28–30. 9. Ibuki Y., Goto R. // J. Radiat. Res. – 1999. – Vol. 40, № 3. – P. 253–262. 10. Popovich I.G., Zabozhinski M.A., Kovalenko A.L. et al. // Cancer. Lett. – 2000. – Vol. 148, № 2. – P. 215–219.

Надійшла до редколегії 28.09.05

УДК 577.112.083:616.33-002.44

К. Дворщенко, канд. біол. наук, О. Дворщенко, мол. наук. співроб.,
Г. Діденко, мол. наук. співроб., В. Ковальова, канд. біол. наук,

ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТІВ НА ЗАГАЛЬНИЙ СКЛАД БІЛКІВ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ШЛУНКА ПРИ ЕТАНОЛОВІЙ ВИРАЗЦІ

Установлено деградацію білків з молекулярною масою 72, 89, 95 і 99 кДа в загальному складі білків клітин слизової оболонки шлунка при експериментальній моделі етанолової виразки. При використанні аммівіту й сквалену на 3-тю і 5-ту добу, після введення щурам етилового спирту, відбувалось відновлення білків з молекулярною масою 89, 95 і 99 кДа. Ефект був однаковий як у разі окремого введення аммівіту, так і за сумісної дії аммівіту та сквалену.

It fixed degradation of proteins with molecular weight 72, 89, 95 and 99 kDa in the general composition of proteins of cells of gastric mucosa at a pilot model of ethanol ulcer. At use of ammivit and squalene for 3 and 5 day, after introduction to rats of ethanol, there was a regeneration of proteins to molecular weight 89, 95 and 99 kDa. The effect was identical both at separate introduction of ammivit, and at combined action of ammivit and squalene.

Вступ. Третє місце серед найпоширеніших захворювань населення посідають хвороби органів травлення [3, 10]. Серед них найчастіше зустрічається виразкова хвороба шлунка [4]. Незважаючи на велику кількість публікацій з даної теми, залишається багато невирішених питань стосовно патогенезу, клініки та лікування цієї хвороби. Оскільки використання існуючих лікарських засобів не дає бажаного ефекту, хвороба набуває хронічного характеру з виникненням рецидивів, тому дослідження методів лікування цієї патології є актуальною проблемою сьогодення [8].

Основним фактором в ініціації виразки є порушення функціональної системи фізико-хімічних і біохімічних

процесів на рівні епітеліальних клітин слизової оболонки шлунка. Оскільки білки виконують головну роль у клітинному метаболізмі, тому дослідження білкового складу клітин слизової шлунка є необхідною ланкою при вивченні даної патології [9].

Різноманіття факторів, які спричиняють розвиток виразки шлунка, зумовило появу великої кількості лікарських засобів, що вибірково діють на різні патогенетичні механізми хвороби [6]. Відомо, що антиоксиданти позитивно впливають на обмін речовин і регенеративні процеси [1]. Тому вивчення властивостей препаратів, які діють на ці процеси, дозволить знайти нові шляхи лікування виразкової хвороби.

Метою роботи було дослідити в динаміці особливості дії препаратів природного походження – аммівіту та сквалену на загальний склад білків клітин слизової оболонки шлунка при етаноловій виразці.

Об'єкт і методи досліджень. У досліді використовували щурів лінії Вістар вагою 180–230 г., яких утримували на стандартному раціоні віварію. Етанолова модель виразки шлунка викликала пероральним введенням 80 %-го етилового спирту загальноприйнятим методом [5]. Отримання загальної фракції клітин слизової оболонки шлунка проводили за методом, описаним у роботі [2].

Аналіз білкового складу клітин слизової оболонки шлунка проводили за допомогою електрофорезу у 10 %-му поліакриламідному гелі за методом Леммлі [7]. Для оцінки результатів електрофорезу використовували програму TotalLab 1.10.

Результати та їх обговорення. Декапітацію тварин проводили на 3-тю та 5-ту добу експерименту. Установлено, що на 3-тю добу після перорального введення щурам етилового спирту загальний склад білків слизової оболонки шлунка змінюється порівняно з контрольними тваринами. Так, спостерігалось зникнення фракцій білків з молекулярними масами 72, 89, 95 та 99 кДа

(рис. 1, А). Ця сама картина зберігалась і на 5-ту добу експерименту (рис. 1, Б).

Отримані результати свідчать про деградацію високомолекулярних білків у клітинах слизової оболонки шлунка при етаноловій виразці, що призводить до суттєвих змін властивостей слизової оболонки, зокрема її регенеративної здатності.

Після введення аммівіту щурам зі спиртовою виразкою встановлено відновлення білків з молекулярною масою 89, 95 та 99 кДа у загальній фракції клітин слизової оболонки шлунка на 3 добу (рис. 1, А). При цьому білок з молекулою масою 72 кДа не відновлюється. На відміну від експериментальної моделі виразки, при введенні аммівіту зникали молекулярні білки з масою 19 кДа, паралельно з цим виникала нова група білків ($M_r=36$ кДа). Подібна тенденція зберігалась і на 5-й день досліджень (рис. 1, Б).

При комбінованому додаванні аммівіту і сквалену при виразці шлунка, викликаній етиловим спиртом, спостерігались результати подібні до використання чистого аммівіту.

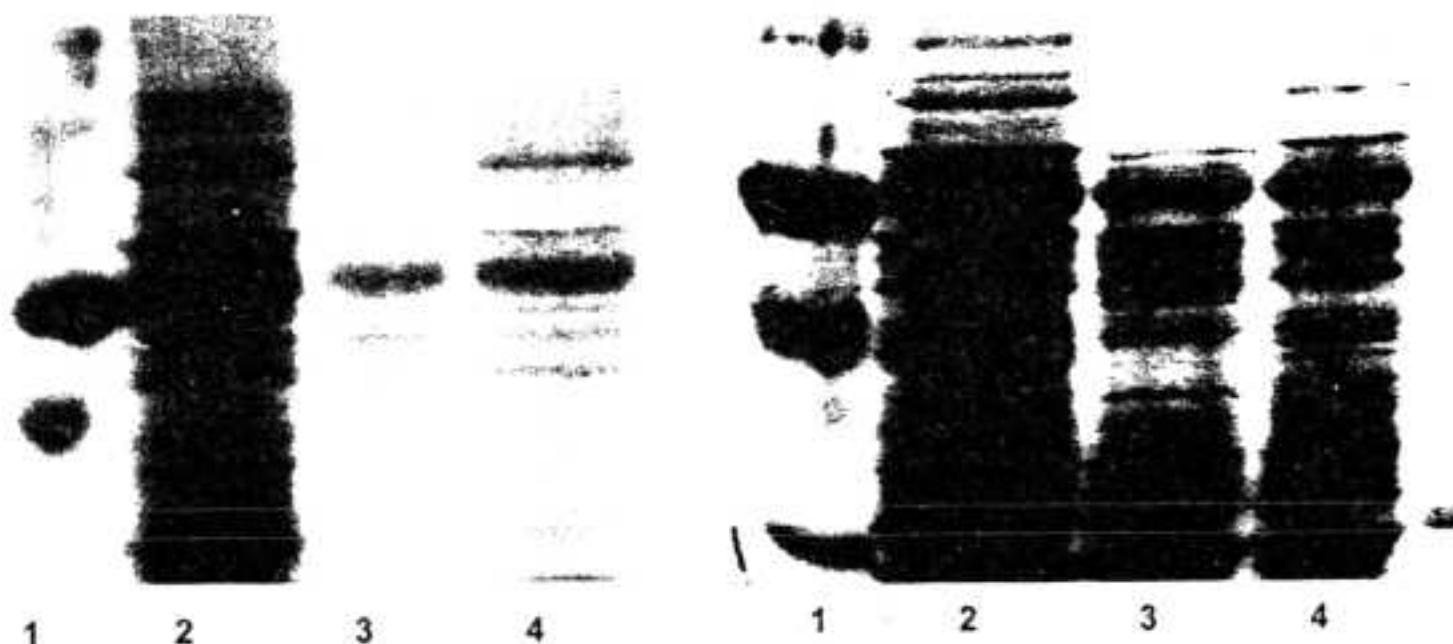


Рис. 1. Електрофореграма білків клітин слизової оболонки шлунка на 3-тю (А) і 5-ту (Б) добу: 1 – стандарти, 2 – контроль, 3 – етанолова виразка, 4 – етанолова виразка + аммівіт

Висновки. Отримані результати свідчать про те, що антиоксиданти природного походження – аммівіт і сквален регенерують загальний склад білків клітин слизової оболонки шлунка, що сприяє відновленню її структурно-функціонального стану, і тому ці сполуки можуть бути рекомендовані для використання в комплексному лікуванні виразкової хвороби шлунка.

1. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. // Усп. совр. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 4. 2. Таиров М.М., Берсимаев Р.И., Аргутинская С.В., Салганик Р.И.

// Биохим. – 1983. – Т. 48, № 6. 3. Филиппов Ю.А., Шмигель З.Н., Петречук Л.Н., Скурда И.Ю. // Гастроэнтерол. – 1999. – Вып. 28. 4. Calam J., Baron J.H. // B. M. J. – 2001. – Vol. 323. 5. Cao H., Wang M., Jia J. et al. // J. of health science. – 2004. – Vol. 50. – № 1. 6. Gyires K. // Curr. Med. Chem. – 2005. – Vol. 12 (2). 7. Laemmli U.K. // Nature. – 1970. – Vol. 227. 8. Laine L. // Rev. Gastroenterol. Disord. – 2004. – Vol. 4. 9. Paula A.C., Gracioso J.S., Toma W. et al // Br. J. Nutr. – 2005. – Vol. 93 (1). 10. Vouillamoz D., Viani F., Jornod P. et al. // Rev. Med. Suisse. – 2005. – Vol. 1 (3).

Надійшла до редакції 03.10.05

УДК 577.3

О. Цимбалюк, канд. біол. наук, Т. Давидовська, д-р біол. наук,
Л. Холодна, д-р біол. наук

ВПЛИВ ІМУНОАКТИВНОЇ СУБСТАНЦІЇ ЛЕЙКОЦИТІВ НА СКОРОЧУВАЛЬНІ БІЛКИ СЕРЦЕВОГО М'ЯЗА

Досліджено вплив фактора перенесення імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* на АТФазну активність і реакцію суперпреципітації актоміозину серцевого м'яза. Одержані результати експериментальних досліджень указують на здатність цієї імуноактивної субстанції лейкоцитів підсилювати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність і змінювати параметри реакції суперпреципітацію актоміозину, а за певних умов – частково усувати пригнічувальну дію донора екзогенного оксиду азоту – нітропрусида натрію.

The effect of the transfer factor of immune reactivity to corpuscular antigens of *Staphylococcus aureus* on ATPase activity and superprecipitation reaction of cardiac muscle actomyosin has been investigated in current work. These experimental results show that the immuneactive substances enhance Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity and change parameters of actomyosin superprecipitation and at definite condition it may partly eliminate inhibiting effect of exogenic NO-oxide donor – sodium nitroprusside.

Фактор перенесення (ФП) імунної реактивності до корпускулярних антигенів золотистого стафілокока – це низькомолекулярний діалізабельний компонент лізату імуноактивних клітин, здатний за короткий проміжок часу підсилювати антигенспецифічну імунну відповідь [1–4]. З літературних джерел [5, 6] відомо, що ця імуноактивна субстанція лейкоцитів деполяризує мембрану гладеньких м'язів (ГМ) *taenia coli* морських свинок і підсилює їхні спонтанні скорочення. Вона активує потенціалзумовлений транспорт позаклітинних іонів кальцію до гладеньком'язових клітин, модулює механізми збуджувальної дії такого агоніста як ацетилхолін (збільшує як початковий фазний, так і наступний тонічний компоненти агоніст викликаних скорочень гладеньком'язових смужок). У той же час, блокатор кальцієвих каналів L-типу ніфедипін пригнічує підвищений фактором перенесення тонічний компонент ацетилхолінових скорочень. З'ясовано також, що цей фактор усуває пригнічувальну дію екзогенного донора NO – нітропрусида натрію (НПН) на спонтанні скорочення гладеньких м'язів *taenia coli*, потенціюючи появу ритмічних скорочень. ФП модулює пригнічувальну дію НПН на механізми збуджувальної дії ацетилхоліну в цих же м'язах. Регуляторні механізми гальмівної дії екзогенного аденозин-5'-трифосфату (АТФ) у гладеньких м'язах кишечника фактором перенесення трансформуються у збуджувальну. Установлено також, що фактор перенесення не пригнічує гальмівну дію екзогенного норадреналіну на ГМ кишечника, хоча кінцевий ефект гальмування АТФ і норадреналіну однакові щодо активації апамінчутливих Ca^{2+} -залежних калієвих каналів низької провідності мембрани гладеньком'язових клітин. Отже, судячи з наведених вище даних літературних джерел, фактор перенесення є ефективним модулятором мембранних і внутрішньоклітинних механізмів передачі сигналів нейромедіаторів збудження та гальмування у збудливих клітинах.

Метою нашої роботи було дослідити дію фактора перенесення імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* на функціональну активність скорочувального апарату серцевого м'яза, робота якого, як відомо [7], супроводжується взаємодією контрактильних білків – актину та міозину. Саме міозин є молекулярним мотором, який забезпечує перетворення хімічної енергії гідролізу АТФ у механічну роботу м'язового скорочення [7, 8]. Відповідно до цього, функціональною характеристикою білків скорочувального апарату є АТФазна активність, яка визначається

інтенсивністю гідролізу АТФ з утворенням АДФ і фосфату. У даній роботі вивчали дію фактора перенесення на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність і суперпреципітацію натурального актоміозину. Цікавим також було дослідити властивості цієї субстанції щодо здатності модулювати пригнічену нітропрусидом натрію його АТФазну активність.

Об'єкт і методи досліджень. Виділення натурального актоміозину здійснювали за методом Маргосян [9] з деякими модифікаціями. Екстракцію актоміозину проводили розчином, що містив 0,2 моль/л KCl, 0,15 моль/л трис-HCl, pH 8,0, 1 ммоль/л EDTA, 5 ммоль/л MgCl_2 , 0,2 ммоль/л PMSF, 1 ммоль/л NaN_3 , 3,5 ммоль/л АТФ. Білковий препарат очищали переосадженням 10 об'ємами води й розчиняли в 0,6 моль/л KCl. Склад препаратів контролювали методом електрофорезу.

АТФазну активність актоміозину вимірювали за кількістю утвореного при гідролізі АТФ неорганічного фосфату, який визначали за методом Фіске – Суббароу [10]. АТФазну активність актоміозину вимірювали в інкубаційному середовищі (загальний об'єм становив 1,8 мл), яке містило 20 ммоль/л імідазол, pH 7,5, 5 ммоль/л MgCl_2 та 0,1 ммоль/л CaCl_2 (іонна сила середовища створювалась 0,08 ммоль/л KCl). АТФазну реакцію ініціювали додаванням до середовища інкубації білка, концентрація якого в кінцевому об'ємі реакційної суміші була 0,28 мг/мл. Тривалість інкубації актоміозину при температурі 37 °C у присутності АТФ (1,0 ммоль/л) становила 5 хв. АТФазну реакцію зупиняли додаванням трихлороцтової кислоти до кінцевої концентрації 2,5 %.

Кінетику процесу суперпреципітації (СПП) актоміозину реєстрували за зміною оптичної густини при довжині хвилі 450 нм протягом 15 хв у реакційній суміші (загальний об'єм 2 мл): 1 ммоль/л MgCl_2 , 0,1 ммоль/л CaCl_2 , 0,15 моль/л KCl, 20 ммоль/л трис-HCl, pH 7,5, 0,1 мг/мл білка. Реакцію суперпреципітації ініціювали внесенням до середовища розчину АТФ. З одержаних кінетичних кривих знаходили $t_{1/2}$ – час, який необхідний для досягнення половини ($D_M - D_0$), де D_0 – початкова оптична густина актоміозину в ході реакції суперпреципітації, D_M – оптична густина актоміозину після завершення цієї реакції.

У дослідах використовували препарати ФП, отримані на кафедрі мікробіології та загальної імунології біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

ФП вносили в середовище інкубації актоміозину й витримували при температурі 37 °С протягом 15 хв до початку ініціації АТФазної реакції з метою зрівноваження температурних умов і надання можливості взаємодіяти з білками.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятою методикою [11].

Результати та їх обговорення. Досліджували дію фактора перенесення імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* у концентраціях 10^{-7} – 10^{-2} мг/мл на показники Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності препаратів натурального актоміозину із серцевого м'яза за умов низької іонної сили інкубаційного середовища (рис. 1).

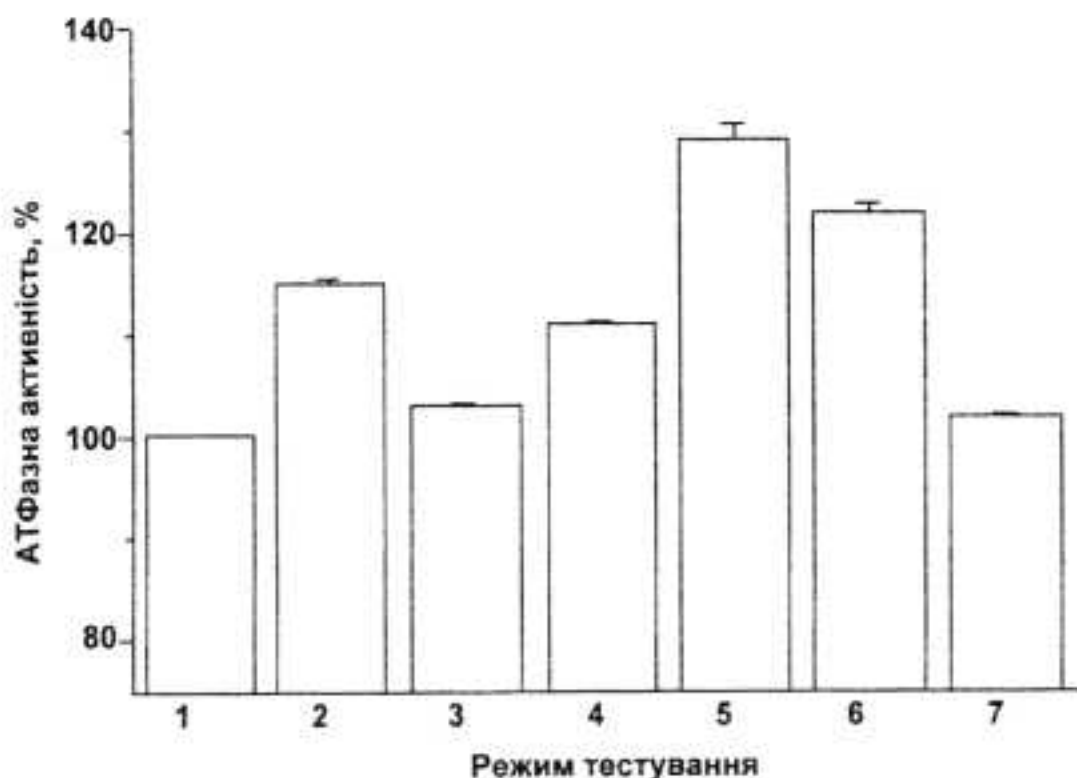


Рис. 1. Гістограма залежності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності актоміозину серцевого м'яза від концентрації фактора перенесення імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* у середовищі інкубації. За 100 % взято АТФазну активність актоміозину в контролі (1). 2, 3, 4, 5, 6, 7 – концентрації ФП 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} і 10^{-7} мг/мл відповідно

Установлено, що ФП у концентрації 10^{-7} мг/мл не викликав у порівнянні з контролем, узятим за 100 %, статистично достовірних змін (102.0 ± 0.3 %, $n=8$, $p>0.05$) АТФазної активності актоміозину. При наступному збільшенні концентрації субстанції до 10^{-6} мг/мл спостерігали підвищення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності актоміозину, яке складало 122.4 ± 0.8 %, $n=8$, $p<0.05$. Максимальна активація АТФазної активності актоміозину досягалася у присутності фактора перенесення в концентрації 10^{-5} мг/мл. За даних умов вона становила щодо контролю, узятого за 100 %, 129.8 ± 1.5 %, $n=8$, $p<0.05$. Під час подальшого зростання концентрації субстанції до 10^{-4} мг/мл відбувалось зниження ефекту активації фактором перенесення ферментативної активності актоміозину, яка становила (111.0 ± 0.4 %, $n=8$, $p<0.05$). З'ясовано також, що фактор перенесення в концентрації 10^{-3} мг/мл не викликав статистично достовірних змін АТФазної активності актоміозину. Її показники були на рівні контролю. Збільшення концентрації субстанції на один порядок знову приводило до підвищення ферментативної активності препаратів, величина якої становила (115.3 ± 0.5 %, $n=8$, $p<0.05$).

У наступній серії експериментів досліджували дію фактора перенесення на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність, модульовану попередньо впливом нітропрусиду натрію. Перш за все було встановлено, що нітроприсид натрію в концентрації 5 ммоль/л у порівнянні з контролем, узятим за 100 %, пригнічує АТФ-гідролазну активність препаратів актоміозину (на 39.0 ± 1.6 %, $n=9$, $p<0.05$) (рис. 2).

Внесення в інкубаційне середовище, до складу якого входив нітроприсид натрію в зазначеній вище концентрації, фактора перенесення в концентрації 10^{-5} мг/мл супроводжувалось не зменшенням, а навпаки – збільшенням Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності в порівнянні зі значенням цього параметра в присутності НПН. По-

рівняно з контролем (АТФазна активність за відсутності НПН), узятим за 100 %, АТФазна активність препаратів актоміозину за даних умов становила (80.0 ± 0.8 %), $n=9$, $p<0.05$.

В іншій серії дослідів проводили попередню (протягом 10 хв) інкубацію препаратів актоміозину в середовищі, до складу якого входив фактор перенесення. У подальшому до цієї суміші додавали нітропрусид натрію в концентрації 5 ммоль/л. Установлено, що субстанція лейкоцитів певною мірою усуває пригнічувальний ефект НПН на АТФазну активність актоміозину. Величина цього параметра становила 70.4 ± 1.4 %, $n=9$, $p<0.05$. Крім того, проводили попарне комбінування речовин таким чином, що в тестоване середовище вносили одночасно фактор перенесення (10^{-5} мг/мл) і нітропрусид натрію в зазначеній вище концентрації. З'ясовано, що за даних умов АТФазна активність була такого ж порядку, як і при дії нітропрусиду натрію.

На рис. 3 наведено кінетичні криві Mg^{2+} -залежної реакції суперпреципітації актоміозину серцевого м'яза в контролі (крива 1) і в присутності фактора перенесення в концентрації 10^{-2} мг/мл (крива 2).

Криві суперпреципітації актоміозину характеризувались значенням часового параметра $t_{1/2}$, яке для контролю становило 3,4 хв, а в присутності ФП – 2,5 хв, тобто у присутності фактора перенесення в досліджуваній концентрації спостерігалось зменшення максимального значення оптичної густини, а також часу досягнення її напівмаксимуму в порівнянні з контролем.

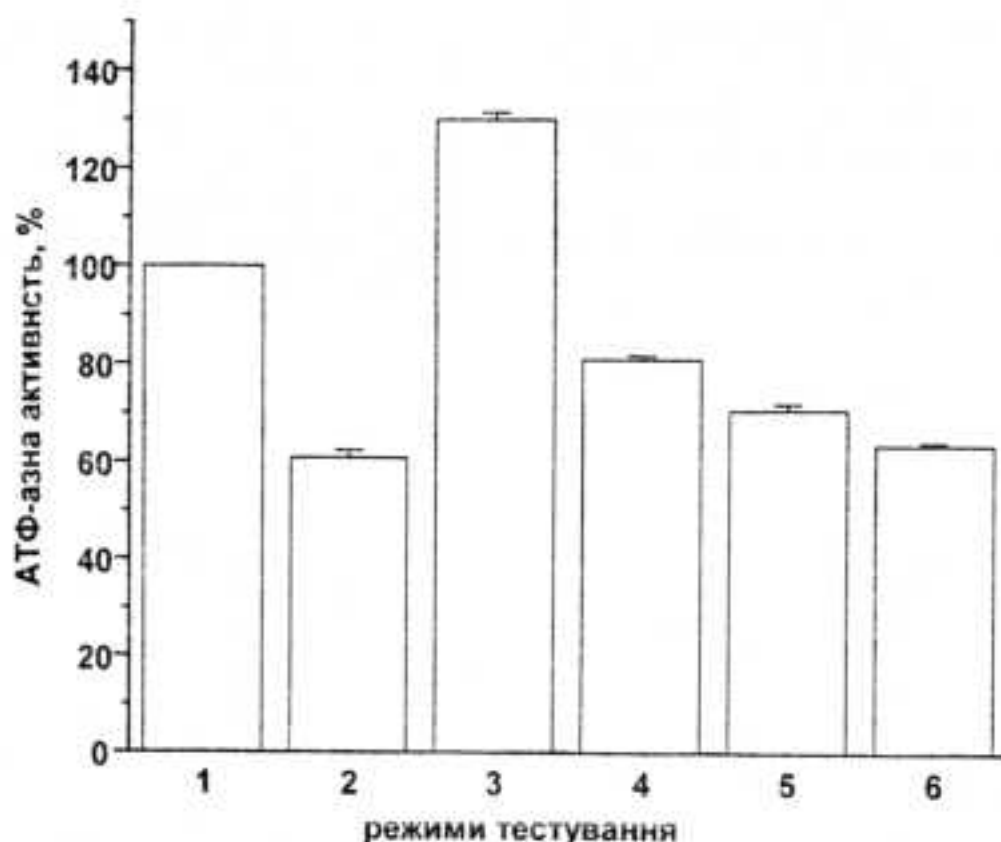


Рис. 2. Гістограма змін фактором перенесення (ФП) імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазної активності актоміозину серцевого м'язу, пригніченої донором екзогенного NO – нітропрусидом натрію (НПН): 1 – АТФазна активність у контролі, узятая за 100 %; 2 – АТФазна активність при додаванні НПН (5 ммоль/л) до середовища інкубації; 3 – при додаванні ФП (10^{-5} мг/мл); 4 – за попередньої інкубації (10 хв) препаратів у середовищі, до складу якого входив фактор перенесення (10^{-5} мг/мл) та наступного додавання до нього нітропрусиду натрію (5 ммоль/л); 5 – за попередньої інкубації (10 хв) препаратів актоміозину в середовищі, до складу якого входив НПН (5 ммоль/л) та наступного додавання до нього фактора перенесення (10^{-5} мг/мл); 6 – при одночасному внесенні до середовища інкубації актоміозину НПН (5 ммоль/л) і ФП (10^{-5} мг/мл)

Таким чином, проведено дослідження впливу фактора перенесення на біохімічні процеси, що моделюють молекулярний механізм скорочення м'язів, – АТФ-гідролазну реакцію та суперпрєципітацію актоміозинового комплексу.

Висновки. Одержані в роботі результати досліджень указують на здатність фактора перенесення імунної реактивності до корпускулярних антигенів *Staphylococcus aureus* підсилювати Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазну активність та впливати на проходження суперпрєципітації актоміозину

серцевого м'язу, а також за певних умов частково усувати пригнічувальну дію нітропрусиду натрію на нього. Можна припустити, що фактор перенесення здатний взаємодіяти з актоміозинним комплексом: така взаємодія супроводжується зміною величини АТФазної активності та параметрів реакції суперпрєципітації актоміозину. Можливо, модифікація білків скорочувального апарату серцевого м'язу фактором перенесення може мати захисне значення при стафілококовому ураженні міокарда.

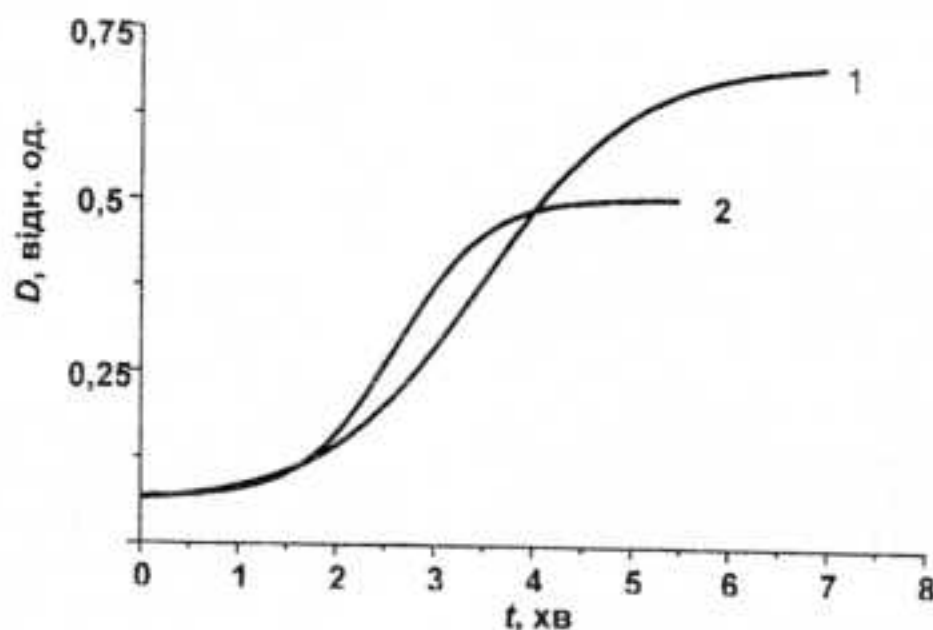


Рис. 3. Кінетичні криві реакції суперпрєципітації актоміозину: 1 – у контролі; 2 – у присутності фактора перенесення в концентрації 10^{-2} мг/мл

1. Lawrence H.S., Borkowsky W. // *Biotherapy*. – 1996. – Vol. 9, № 1–3. – P. 1–5. 2. Kirkpatrick C.H. // *Mol. Med.* – 2000. – Vol. 6, № 4. – P. 332–341. 3. Holveva O.H., Paster I.P., Lyubchenko T.A. et al. // *Fiziol. Zh.* – 2000. – Vol. 46, № 4. – P. 58–65. 4. Любченко Т.А., Голєва О.Г., Холодна Л.С. та ін. // *Мікробіол. журн.* – 1997. – Т. 59, № 5. – С. 83–100. 5. Давидовська Т.Л., Філіппов І.Б., Цимбалюк О.В. та ін. // *Фізіол. журн.* – 2002. – Т. 43, № 5. – С. 9–16. 6. Fadeenko N.P., Davidovskaya T.L., Lyubchenko T.A. et al. // *Abstr. of the XI International Congress of transfer*

factor. – Mexico (Mexico), 1999. – P. 18. 7. Зима В.Л. // *Укр. біохім. журн.* – 1998. – Т. 70, № 3. – С. 23–38. 8. Данилова В.М. // *Біополімери і клітина*. – 1996. – Т. 12, № 4. – С. 5–24. 9. Margossian S.S. // *J. Biochem.* – 1985. – Vol. 260, № 25. – P. 13747–13754. 10. Северин С.Е., Соловьева Г.А. *Практикум по биохимии*. – Л., 1989. 11. Лакін Г.Ф. *Биометрия*. – М., 1990.

Надійшла до редколегії 10.03.05

УДК 616.33 + 616.45 – 001.1/3

Н. Євтушенко, канд. біол. наук, В. Ковальова, канд. біол. наук
Л. Кузьменко, асп.

РІВЕНЬ ВУГЛЕВОДІВ У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ШЛУНКА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ВИРАЗЦІ

Установлено, що комплексне введення "Аммівіту" та сквалену сприяє росту питомого вмісту фукози та гексоз за умов експериментальної виразки шлунка у тварин.

It was shown that administration of the composite of "Ammivit" and scvalen make an impact on rise in the specific contents of fucose and hexose under conditions of stomach ulcer development in animals

Вступ. До основних компонентів слизової оболонки шлунка відносять сульфомуцинові фракції та вуглеводи глікопротеїнів (ГП), а саме: сіалові кислоти, гексозаміни, фукозу, галактозу. Деякий час питання про наявність і залучення до процесів захисту N-зв'язаних олігоцукрів ГП викликало сумнів. Згодом було виявлено 10 N-зв'язаних олігоцукрів, які координують приєднання до скелетного ланцюга муцину зі шлунка щурів. Пізніше було описано різноманітність складу ГП муцинів шлунка в нормі, при стресі та при новоутвореннях [8]. Відомо, що муцинові ГП синтезуються слизовими клітинами епітелію та шлунковими залозами, до яких відносять слизові шийні, головні парієтальні, ендокринні та проміжні клітини. Було встановлено, що N-зв'язані олігоцукри, які утримують залишки фукози, галактози, локалізовані у внутрішніх каналцях і тубукуловезикулярній системі парієтальних клітин, а також у гранулах молодих парієтальних клітин. Є повідомлення [6], що при пептичній виразці шлунка вуглеводи глікопротеїнів слизу здатні встановлювати зв'язок із *H. pylori*. Це дає підставу вважати, що вуглеводи глікопротеїнів муцинів мають важливе значення в забезпеченні захисту слизової оболонки шлунка. Пригнічення регенерації клітин останньої і, як результат, зменшення продукції шлункового слизу, посилення процесу деструкції білків при утворенні виразки шлунка роблять актуальним дослідження кількісного вмісту вуглеводів у муцинових ГП. Тому метою нашої роботи було визначення динаміки змін вмісту глікопротеїнів зв'язаних гексоз і фукози у клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної моделі виразки при дії аммівіту та сквалену.

Об'єкт і методи досліджень. Досліди проводились на нелінійних щурах масою 180–230 г. Експериментальну виразку шлунка викликали пероральним введенням 1 мл етанолу в концентрації 80 %. Білок визначали за методом Лоурі [12]. Дослід проводили в контрольній групі у тварин з експериментальною виразкою, а також при введенні препарату аммівіту з третьої по шосту добу. Це – біологічно активний препарат. Він складається з комплексу амінокислот і вітамінів і вживається для корекції стану при різних патологіях. Потім вводили сквален [10] – з 3-ї по 7-му добу в комплексі з аммівітом. Сквален – це препарат із широким спектром позитивних властивостей. Він сприяє підвищенню резистентності організму, підсилює імунну систему, впливає на процеси загоєння виразок і будь-яких інших пошкоджень тканин внутрішніх органів, нормалізує холестеринний обмін.

Слизову оболонку шлунка піддавали гомогенізації в 0,01 моль/л трис-НСІ буфері (рН 7,4) у співвідношенні 1:10 [10]. Рівень вмісту вуглеводів оцінювали за кількістю фукози [9] і галактози [4] на 3-й, 5-й, 7-й день утво-

рення виразки у шлунку. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Дослідження останніх років свідчать про те, що ГП беруть участь практично в усіх метаболічних процесах, оскільки вони входять до складу ферментів, гормонів, транспортних білків, анти-тіл, білків-рецепторів та інших біологічно важливих речовин [11]. Особливо цікавим є вивчення ролі ГП, які містяться на поверхні клітин і беруть участь у міжклітинних взаємодіях [3], їхнього зв'язку з процесами проліферації та розвитку тощо. Сьогодні є експериментальні роботи [5], які дозволяють стверджувати, що ГП притаманна важлива біологічна функція в секреторних гранулах клітин шлунка. Показано, що залишки фукози відіграють суттєву роль у формуванні й перетворенні проміжних клітин шлунка в головні клітини. Відомо, що фукоза – потужний імуномодулятор. Є випадки, коли її застосовують для запуску програм апоптозу, деградації ДНК у ракових клітинах і використовують для подолання зв'язку між бактеріальними лектинами і клітинами хазяїна [1, 2]. На поверхні клітин шлунка були виявлені N-зв'язані фукозилізовані олігоцукри, секрецію яких пов'язують із цитопротективною роллю слизових ГП і вважається, що саме фукозилізовані олігоцукри створюють захисний слизовий бар'єр у шлунку.

Тому дослідження динаміки змін вмісту глікопротеїнів зв'язаних гексоз на прикладі фукози й галактози у клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної моделі виразки викликало у нас особливий інтерес.

Установлено, що на 3-тю добу розвитку етанолової виразки спостерігається збільшення питомого вмісту фукози та гексоз у 3 та 1,5 рази відповідно (рис. (М ± m; n = 6)). Це може свідчити про виникнення запалення в досліджуваній тканині, що підтверджується результатами інших авторів [7]. На 5-ту та 7-му добу спостерігається різке зниження рівня фукози й гексоз на 90 % та 83 % відповідно. Під час уведення аммівіту на 5-ту й 7-му добу кількість фукози досягла меж контрольного значення і становила 48 мкг/мг білка та 54 мкг/білка відповідно. Комплексне введення аммівіту із скваленом тваринам з етаноловою виразкою збільшило вміст фукози в 4,5 рази на 7-му добу. Аналогічна картина спостерігається при визначенні кількості гексоз. Питомий вміст гексоз у контрольних тварин становив 146 мкг/мг білка.

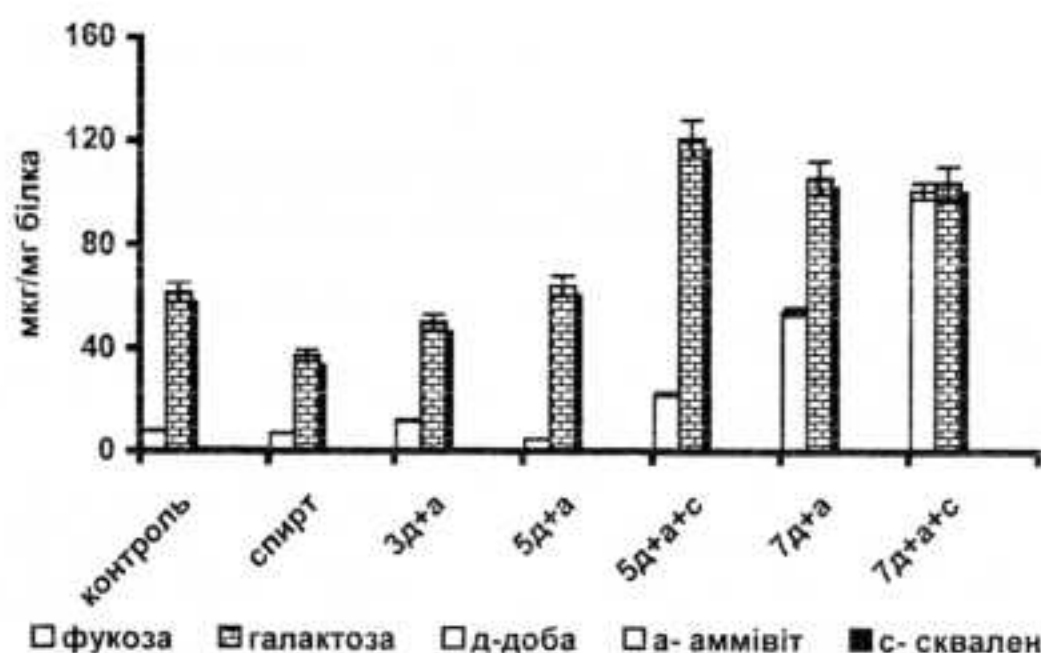


Рис. 2. Вплив аммівіту та сквалену на рівень вуглеводів при спиртовій виразці

Висновки. Зростання вмісту фукози й гексоз у слизовій тканині шлунка після комплексного впливу препарату "Аммівіт" і сквалену може свідчити про збільшення кількості глікопротеїнів і мукопротеїнів, що призводить до стабілізації репаративних процесів у організмі. Використання цих препаратів у свою чергу може відкривати перспективи для лікування виразки шлунка.

1. Галич И., Евтушенко Н. // Онкология. – 2003. – Т 5, № 1. – С. 4–9.
2. Djurdjic N, Mandic Lj. // Anal. Biochem. – 1990. – Vol. 188. – P. 222–227.
3. Elkins R. Miracle Sugars. – Woodland Publishing, 2003.
4. Madrid J., Leis O., Diaz-Flores L. // J. Histochem. Cytochem. – 1998. – Vol. 46.

5. Kolset S, Prydz K., Pejler G. // Biochem. J. – 2004. – Vol. 379. – P. 217–227.
6. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 2. – P. 265–275.
7. Mondoa E., Kitei M. Sugars that Heal. – Ballantine Publishing, 2001.
8. Ogata M, Araki K, Ogata T. // Histol. Histopathol. – 1998. – Vol. 13. – P. 347–358.
9. Ostapchenko L., Kovalova V., Seleznova L. // Abstract book of International conf. Neuro-humoral and cellular regulatory mechanisms of digestion processes. October 1–3, 2003. Ukraine. – Lviv, 2003. – P. 30–31.
10. Seifter, D., Novic C., Muhtmyier E. // Ftrch. BB. – 1950. – Vol. 25, № 1. – P. 191–200.
11. Wallace J., Granger D. // FASEB J. – 1996. – Vol. 10. – P. 731–740.
12. Werther J. // Mount. Sinai J. Med. – 2000. – Vol. 67, № 1. – P. 41–53.

Надійшла до редколегії 21.09.05

УДК 577.543.426

А. Майданюк, канд. біол. наук, О. Матишевська, д-р біол. наук,
В. Пивоваренко, канд. хім. наук

ЧУТЛИВИЙ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧНИЙ МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АТФ

Запропоновано новий чутливий спектрофлуориметричний метод кількісного визначення АТФ.
The sensitive method for fluorimetric assays of ATP has been developed.

Характер загибелі клітини за механізмом апоптозу чи некрозу визначається рівнем внутрішньої організації геному і метаболізму клітин. Показано, що процеси апоптозу стимулюються як зовнішніми сигналами (гормони, стрес, опромінення тощо), так і внутрішніми – такими як зміни метаболізму пуринів за відповідної зміни активності ферментів пуринового обміну. Пуринові нуклеозиди – аденозин (Ado), дезоксиаденозин і дезоксигуанозин індують загибель клітин тимусу, але не селезінки чи лімфатичних вузлів за механізмом апоптозу. Інгібітори макромолекулярного синтезу і фосфорилювання білка блокували фрагментацію ДНК, спричиненої пуриновими нуклеозидами. Порушення пуринового обміну в післяпроменевий період є одним із ранніх і характерних процесів апоптозу тимоцитів. Зниження концентрації аденілових нуклеотидів відбувається за рахунок їхнього посиленого катаболізму за схемою: $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow$ аденозин $\rightarrow$ гіпоксантин і виходу із клітини, що в часі збігається з максимальним накопиченням полідезоксинуклеотидів (ПДН) і розпадом хроматину. Більш того, додавання аденіну (А) до суспензії опромінених клітин тимусу сприяє їхньому виживанню і пригнічує утворення і вихід ПДН. Проте інкубація неопромінених тимоцитів у середовищі з гіпоксантином

супроводжується утворенням ПДН і апоптозом клітин, тобто механізм міжнуклеосомної фрагментації хроматину у випадку надлишку в середовищі гіпоксантину подібний до механізму його фрагментації за рентгеновського опромінення [4].

Перетворення пуринових метаболітів контролюється різними регуляторними системами клітини, до яких належать, на наш погляд, і метаболічна система підтримання кисло-лужного гомеостазу та антиоксидантна система. Виявом дії системи метаболічного кисло-лужного гомеостазу є зміни АТРазної активності у клітинах. Так, якщо підвищується рН середовища і концентрація HCO_3^- , активність ферменту значно збільшується. Проте ацидозу (високі концентрації H^+ та CO_2) зумовлюють гальмування процесів дегідратації метаболітів і фосфорилювання ADP у мітохондріях, що призводить до зниження аденілатного енергетичного заряду та зміни активності ферментів пуринового обміну, залежних від його величини.

До прискорення катаболізму аденілових нуклеотидів крім дії іонізуючої радіації приводить вплив на лімфоцити стероїдних гормонів, алкілюючих агентів, препаратів типу дегранолу, аденозину або дезоксиаденозину та інших агентів. Вважається, що прискорення катаболізму аде-

нінуклеотидів є загальною реакцією клітини на дію будь-яких стресорних факторів. Згідно з приведеною схемою прискорений катаболізм аденоїнових нуклеотидів буде мати своїм наслідком зменшення внутрішньоклітинної концентрації АТФ і збільшення її для аденозину та гіпоксантину. Експериментально показано накопичення аденозину у разі фізичних маніпуляцій з клітинами при їхньому виділенні, ресуспензуванні, центрифугуванні, різкій зміні температури тощо. Аденозин приводить до зміни рівня цАМФ через взаємодію з відповідними рецепторами на зовнішній і внутрішній поверхнях плазматичної мембрани. Збільшення вмісту цАМФ у клітинах часто супроводжує токсичну дію різних речовин, у тому числі й аденозину на лімфоцити. Нещодавно з'явилися дані, які дозволяють вважати, що цАМФ може прискорювати катаболізм аденіннуклеотидів за рахунок цАМФ-залежного фосфорилування фосфофруктокінази. Активация цього ферменту при дії іонізуючого опромінення приводить до прискореного катаболізму пуринів [6].

Зниження внутрішньоклітинного вмісту АТФ у тимоцитах, яке корелює з розпадом ядерного хроматину, крім іонізуючої радіації, викликають гідрокортизон та дегранон. Зменшення вмісту АТФ у цитоплазмі клітин приводить до втрати дихальної функції мітохондрій у зв'язку з пошкодженням їхньої внутрішньої мембрани. Було встановлено, що іонізуюче опромінення викликає інактивацію рибонуклеотидредуктази, що може відігравати провідну роль у його генотоксичній дії, оскільки при цьому знижується рівень і спостерігається дисбаланс попередників, що зумовлює пригнічення реплікативного синтезу й накопичення однієї дволанцюгових розривів ДНК [2]. Дезоксиаденозин і дезоксиформіцин викликають зниження синтезу РНК і за рахунок збільшення внутрішньоклітинного рівня дезоксиАТФ (паралельно зі зменшенням вмісту АТФ) пригнічують репарацію розривів ДНК після опромінення лімфоцитів, що приводить до накопичення розривів двоспиральної ДНК у лімфоцитах і до зростання нестабільності геному. Вважається, що викликане аденозином або дезоксиаденозином (у присутності інгібітора аденозиндезамінази – дезоксиформіцину) збільшення вмісту дезоксиАТФ приводить до гальмування синтезу АТФ при гліколізі й прискорення його катаболізму за рахунок активації АМФ – аміногідролазної реакції [2].

Отже, у біохімічних механізмах апоптозу важливу роль відіграє порушення катаболізму (прискорення) аденіннуклеотидів, оскільки воно приводить до указа-

них змін у клітинному метаболізмі й урешті-решт – до дисбалансу пуринових і піримідинових метаболітів, що сприяє нестабільності геному й запуску генетичної програми апоптозу.

Метою даної роботи була розробка швидкого й чутливого методу кількісного визначення АТФ при дослідженні біохімічних механізмів апоптозу.

Об'єкт і методи досліджень. Аденозин-5'-трифосфорної кислоти динатрієва сіль (АТФ) виробництва фірми Reanal (Угорщина), 4'-(диметиламіно) флавонол – (Україна). Тимоцити отримували м'яким продавливанням через капронове сито тимусу молодих щурів вагою 120–150 г у буфері, що містив, ммоль/л: Na_2HPO_4 – 3, KCl, HEPES – 5, NaCl – 120, глюкоза – 10, NaHCO_3 , CaCl_2 , MgCl_2 – 1. Визначали АТФ у стандартних розчинах або суспензіях тимоцитів, добавлених до концентрації АТФ 0,5–5 мкг/мл. Загальний об'єм проб був 2 мл. Спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-16 визначали вміст АТФ і сумарних аденіннуклеотидів і нуклеозидів тимоцитів за $\Delta E_{260-290}$ [5]. Спектрофлуориметричним методом визначали інтенсивність флуоресценції контрольних розчинів ($I_{\text{ф0}}$) і зразків ($I_{\text{ф1}}$) на спектрофлуорофотометрі RF-510 фірми Shimadzu (Японія) при довжинах хвиль збудження (ex) – 405 або 480 нм і реєстрації (em) – 554 нм. Вміст АТФ розраховували за програмою [1, с. 29] для розрахунку коефіцієнтів рівняння лінійної регресії.

Результати та їх обговорення. Біохімічні механізми загибелі клітин імунної системи після опромінення залишаються мало дослідженими. Є думка, що вони включають у себе порушення структури й функцій ДНК і енергетики клітини. Суттєвим виявом променевого ураження є зниження енергетичного забезпечення клітин радіочутливих органів. Залишається не з'ясованим питання, чи розвиток дефіциту АТФ спричинює апоптоз клітини, чи порушення в енергетиці вторинні й вони є наслідком первинного ураження інших систем клітини?

Для відповіді на це питання необхідна розробка швидкого й чутливого методу визначення кількісного вмісту АТФ у клітинах. Ураховуючи швидкість спектрофотометричних методів і високу чутливість флуориметричного аналізу, нами було проведено визначення кількісного вмісту АТФ як у стандартних розчинах, так і в клітинах тимусу щурів за допомогою флуоресцентного зонду 4'-(диметиламіно) флавонолу, синтезованого В. Пивоваренком – доцентом кафедри органічної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Результати цих досліджень наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Результати спектрофотометричного (СФ) і спектрофлуориметричного аналізу (ФЛ) вмісту АТФ стандартних розчинів і тимоцитів

	Концентрація АТФ, М					Тимоцити 1 x 10 ⁶ кл	Вміст АТФ, нмоль/10 ⁶ кл
	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁴	10 ⁻³		
СФ $E_{260-290}$	0,008 ± 0,0008	0,0219 ± 0,0023	0,121 ± 0,0049	1,10 ± 0,0190	> 2,0	0,105 ± 0,009	8,78*
ФЛ ex 405 нм em 554 нм	$I_{\text{ф1}} / I_{\text{ф0}}$					1,29 ± 0,15	2,09
ФЛ ex 480 нм em 554 нм	1,18 ± 0,07	1,36 ± 0,31	1,49 ± 0,42	1,78 ± 0,19	1,48 ± 0,36	2,52 ± 0,20	2,31

Примітка: Результати СФ і ФЛ аналізу АТФ у тимоцитах подано в перерахунку на 10⁶ кл; * – нмоль суми аденоїнових нуклеотидів і нуклеозидів.

Аналіз наведених у таблиці результатів свідчить про близькі значення величин вмісту АТФ у тимоцитах, які визначені спектрофлуориметричним методом за різних

довжин хвиль збудження. Оскільки спектрофотометричний аналіз дає значення суми аденоїнових нуклеотидів і нуклеозидів, то слід зазначити, що визначене нами від-

ношення цієї величини до вмісту АТФ у тимоцитах подібне до значення, визначеного ферментним методом з використанням флуориметрії [3].

Таким чином, результати проведеного дослідження дозволяють зробити висновок про адекватність, чутливість і значний вигреш у часі, який необхідний для кількісного визначення АТФ тимоцитів спектрофлуориметричним методом, за рахунок уникнення необхідності проводити відокремлення АТФ від інших компонентів аденоинового ряду. Усе це робить його перспективним методом дослідження біохімічних механізмів апоптозу.

УДК 577.1:547.962.9

1. Войцизький В.М., Бабенюк Ю.Д., Рудич В.В., Марченко Ф.С. Общие принципы организации биохимических исследований. – К., 1989.
2. Дмитренко Н.П. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. – К., 1991.
3. Ермолаева Н.В., Водолазкая Н.А. // Радиобиология. – 1980. – Т. 20, вып. 2. – С. 169–172.
4. Кожемякин Л.А., Шелестина Е.П., Антонов В.Г. // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 30, № 1. – С. 87–89.
5. Майданюк А.В., Імедадзе С.П., Дворщенко К.О. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т.Шевченка. – 2003. – Вип. 39–41. – С. 21–22.
6. Хансон К.П., Комар В.Е. Биохимические аспекты действия ионизирующей радиации на живой организм. – Л, 1977.

Надійшла до редакції 17.10.05

Л. Бондаренко, д-р біол. наук, Г. Гайдай, канд. біол. наук

КИСЛОТОРОЗЧИННИЙ КОЛАГЕН ШКІРИ ЩУРІВ, УРАЖЕНИХ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА, ПРИ НАВАНТАЖЕННІ РАЦІОНУ ТРИПТОФАНОМ

В експериментах на щурах-самцях лінії Вістар, уражених карциномою Герена, показана здатність навантаження раціону триптофаном викликати якісні зміни в амінокислотному складі колагену шкіри щурів, уражених цією карциномою, у порівнянні зі складом даного білка як нормальних тварин, так і тварин з карциномою, котрі утримувались на стандартному раціоні.

In experiments on Wistar male rats with Guerin's carcinomas it has been shown that tryptophan load of diet can cause qualitative changes in skin acid soluble collagen amino acid composition of animals with that carcinomas in comparison with this protein's composition of normal animals and animals with carcinomas which were fed with standard diet.

Вступ. Численні дослідження останніх років механізмів запуску та проходження неопластичних процесів дозволили встановити наявність тісних взаємозв'язків між структурою і станом сполучної тканини, основу якої складають колаген-глікопротеїнові комплекси, і ходом формування та розвитком новоутворень [9]. Під час розвитку пухлин різної локалізації в організмі відбуваються кардинальні зміни обміну колагенів: швидкості біосинтезу, співвідношення типів колагенів у різних органах, співвідношення процесів синтезу й розпаду даних білків, рівня активності колагеназ [1, 7]. Зокрема зміни активності специфічної до колагену IV типу колагенази настільки чутливо відображають метастазуючий потенціал гепатоцелюлярної карциноми, що розглядаються як маркер метастазів за даної патології [1]. Слід зазначити, що перебіг неопластичних процесів зумовлює зміни не лише кількісних показників метаболізму колагенів, але і якісні зміни структури даних білків [1, 9].

Однак існує і зворотний зв'язок, оскільки детальне вивчення біологічної ролі колагенів показало наявність регулюючого впливу структури даних білків на перебіг процесів ембріогенезу, проліферації та диференціації клітин [1, 4]. Якісні зміни у структурі колагенів та їхніх комплексів з протеогліканами й глікопротеїнами впливають на проліферативні властивості клітин злоякісних пухлин [6]. Тому в ході пошуку ефективних антипухлинних засобів особливу увагу слід звертати на сполуки, здатні коригувати зміни в колагенових структурах, що супроводжують неопластичний процес.

Оскільки амінокислоти та їхні похідні все більше застосовують як ефективні лікарські засоби широкого спектра дії та відзначаються чітко виявленою активністю щодо регуляції обміну колагенів і структури даних білків [1], актуальною проблемою є вивчення впливу окремих амінокислот на ці показники в умовах розвитку онкологічних захворювань. При цьому необхідно зазначити, що вплив окремих амінокислот на канцерогенез не тільки недостатньо досліджений, але й вже наявні результати часто містять певні протиріччя. Зокрема за даними одних авторів навантаження раціону триптофа-

ном (4,3 %) вело до зниження числа утворюваних пухлин молочних залоз у щурів, а за даними інших – надлишок триптофану в раціоні стимулював формування новоутворень у сечовому міхурі [3].

Метою нашої роботи було вивчення впливу навантаження раціону триптофаном на амінокислотний склад кислоторозчинного колагену шкіри щурів, уражених карциномою Герена. У зв'язку з цим необхідно було виконати такі завдання:

- провести порівняльне вивчення амінокислотного складу кислоторозчинних колагенів щурів у нормі та при карциномі Герена;
- дослідити можливості регуляції *in vivo* якісного складу кислоторозчинних колагенів у нормі та при неопластичному процесі за допомогою навантаження раціону триптофаном.

Об'єкт і методи досліджень. Експерименти проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар (120–150 г маси тіла). Тварини контрольної та I дослідної групи утримувались на стандартному раціоні віварію. Щури II дослідної групи одержували раціон, позбавлений білка, але збалансований за іншими поживними речовинами, вітамінами й мінералами. Тварини III дослідної групи на фоні безбілкового раціону після формування пухлин (на 15-й день експерименту) протягом 6 діб одержували навантаження триптофаном із розрахунку 500мг/100 г маси тіла щура на добу. Щури IV дослідної групи до формування пухлин утримувались на стандартному раціоні віварію. Після формування пухлин тварин даної групи переводили на безбілковий раціон з навантаженням триптофаном (6 діб, 500мг/100 г маси тіла щура на добу). Надалі тварин III та IV дослідних груп утримували на безбілковому раціоні. Термін і дози введення триптофану зумовлені токсичністю даної сполуки [2].

Щурам дослідних груп було прищеплено карциноми Герена. Для цього відбирали пухлину для щеплення розміром приблизно 3 см³, відділяли слиз, некротичні ділянки, подрібнювали та готували 30 %-ву суспензію пухлинних клітин у фізіологічному розчині. Усі процедури проводили при 4 °С. Суспензію вводили тваринам

підшкірно з розрахунку 0,4 мл на 100 г м.т. щура. Через 15 діб було відмічено формування прищеплених пухлин. На 21-й день після появи пухлин тварин забивали декапітацією, відбирали шкіру й одержували кислоторозчинний колаген за методом [5]. Проводили екстракцію білка 0,1 моль/л Na-цитратним буфером (pH 4,0) з наступним діалізом проти 0,01 моль/л Na_2HPO_4 при 4 °C. Кристали білка збирали центрифугуванням при

6000 g 20 хв і перекристалізовували три рази, кожного разу розчиняючи в цитратному буфері. Аналіз амінокислотного складу проводили за допомогою амінокислотного аналізатора AAA-881 (Чехія).

Результати та їх обговорення. Результати визначення впливу навантаження раціону триптофаном на амінокислотний склад кислоторозчинного колагену шкіри щурів, уражених карциномою Герена, наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Амінокислотний склад кислоторозчинного колагену шкіри щурів, уражених карциномою Герена, при різній забезпеченості раціону білком та навантаженнях триптофаном (залишки/1000 залишків, $M \pm m$, $n=6$).

Амінокислота	Контроль	Дослід I	Дослід II	Дослід III	Дослід IV
Лізин	29,80±1,30	29,76±1,37	31,15±1,60	33,70±1,28**	33,16±2,13
Гістидин	4,80±0,20	4,16±0,42	5,26±0,25	5,75±0,36**	5,36±1,87
Аргінін	50,30±0,60	47,64±1,03*	51,43±3,24	46,26±1,67*	49,30±4,73
Гідроксипролін	92,70±2,30	124,40±3,79*	98,87±5,29	100,89±9,21	84,44±7,19*
Аспарагінова кислота	44,70±1,10	37,04±3,53*	36,24±2,36*	41,56±2,38	46,04±2,87***
Треонін	17,80±0,70	19,54±0,18*	22,29±5,33	23,35±0,24*	26,86±0,59**
Серин	35,80±1,10	36,11±0,78	38,51±1,97	39,68±0,84**	41,63±0,54**
Глутамінова кислота	75,20±1,50	77,74±0,67	77,45±2,36	78,64±0,70*	84,64±2,028****
Пролін	130,60±3,00	102,39±11,13*	121,46±6,94	120,54±4,99	110,24±5,30*
Гліцин	324,40±3,70	319,03±3,01	302,23±13,86	310,23±1,70**	292,50±2,90**
Аланін	105,20±2,10	107,10±4,97	114,02±6,81	110,54±4,67*	115,69±5,94
Валін	26,40±0,60	27,00±0,17	38,62±8,32	28,56±1,07	30,06±2,91
Метіонін	6,80±0,20	5,47±0,12*	7,39±1,32	4,57±0,96*	5,59±0,93
Ізолейцин	12,80±0,80	12,53±0,32	18,73±4,00	15,47±1,31*	18,14±0,63**
Лейцин	29,20±1,70	25,68±0,94	30,70±1,64	30,43±0,93*	34,93±0,77****
Тирозин	3,70±0,20	4,32±0,37	5,51±0,58*	5,68±0,31**	7,63±0,52****
Фенілаланін	12,20±0,50	12,45±0,11	12,67±0,48	13,56±0,60	17,38±0,51****
Гідроксилізин	4,30±0,10	4,92±0,20*	4,67±0,05	5,14±0,42	4,87±1,30

* – $p < 0,05$ щодо контролю, ** – $p < 0,05$ щодо дослідної групи II (у групі IV), * – $p < 0,05$ щодо дослідної групи I (у групах III і IV).

Наведені дані свідчать, що за умов формування карциноми у тварин, утримуваних на стандартному раціоні (I дослідна група), синтезується кислоторозчинний колаген, який за своїм амінокислотним складом вірогідно відрізняється від нормального за вмістом 7 амінокислот. У щурів даної групи в амінокислотному складі кислоторозчинного колагену вірогідно підвищувався вміст гідроксипроліну, треоніну та гідроксилізіну при одночасному зниженні вмісту аргініну, аспарагінової кислоти, проліну й метіоніну.

У колагенових білках зміни вмісту гідроксипроліну і проліну можуть привести до порушень форми колагенової спіралі; лізину – ступеня зшитості молекул між собою; аргініну, треоніну, аспарагінової кислоти – поверхневого заряду молекули й кількості доменів, які відповідають за процеси адгезії клітин до колагенових структур [10, 8] і, таким чином, опосередковано вплинути на проліферацію трансформованих клітин і ріст новоутворень [1].

Утримання щурів, уражених карциномою Герена, на безбілковій дієті дозволяє досягти помітної нормалізації амінокислотного складу кислоторозчинного колагену шкіри тварин у дослідній групі II порівняно з дослідною групою I. У даному випадку вірогідні відмінності від норми виявлені лише за вмістом 2 амінокислот: знижувався вміст аспарагінової кислоти і зростав – тирозину. Такі результати узгоджуються і з даними інших авторів, щодо інгібуючого впливу низькобілкових раціонів на розвиток пухлин [1].

З метою чіткого розмежування власне впливу навантаження раціону триптофаном і його можливого комплексного ефекту з безбілковим раціоном було введено дослідні групи III і IV, тварини яких одержували навантаження триптофаном після формування в них пухлин на фоні безбілкового і стандартного раціонів відповідно.

Із даних табл. 1 видно, що введення навантаження раціону триптофаном тваринам III дослідної групи приводило до значних вірогідних відмінностей у амінокислотному складі кислоторозчинного колагену шкіри в порівнянні з нормою. Вірогідно зростав вміст лізину, гістидину, серину, глутамінової кислоти і тирозину, а знижувався – гліцину й метіоніну. Як і у випадку колагену тварин I дослідної групи, відмінені зміни можуть позначитись на ступені зшитості колагенових молекул між собою, на значенні поверхневого заряду молекули, вмісті неколагенових послідовностей і кількості доменів, що відповідають за адгезію клітин до колагенових структур [10, 8]. Однак, на відміну від дослідної групи I, форма колагенової спіралі та ступінь її жорсткості лишаються незмінними. До того ж, за амінокислотним складом кислоторозчинний колаген шкіри тварин III дослідної групи відрізнявся від даного білка щурів I дослідної групи за вмістом восьми амінокислот (лізину, гістидину, треоніну, серину, гліцину, ізолейцину, лейцину, тирозину), яким належить важлива роль у визначенні ступеня зшитості колагенових молекул між собою, значення поверхневого заряду молекули і ступеня її жорсткості [10], а також числа локусів, за якими йде відщеплення специфічних фібрилогенез-стимулюючих пептидів [1].

Порівняння амінокислотних складів кислоторозчинних колагенів шкіри щурів, уражених карциномою Герена, що утримувались на самому лише безбілковому раціоні (дослідна група II) і тварин, які на фоні безбілкового раціону одержували навантаження триптофаном не виявило наявності вірогідних відмінностей між ними. Це свідчить про те, що навантаження триптофаном хоча і послаблює нормалізуючий ефект безбілкового раціону на колаген, утворений у ході розвитку пухлин у дослідних тварин, але не нівелює його.

Із даних табл. 1 видно, що амінокислотний склад кислоторозчинного колагену шкіри тварин, які одержували навантаження триптофаном, після формування у них пухлин на фоні стандартного раціону (дослідна група IV) вірогідно відрізнявся від норми за вмістом 9 амінокислот. Як і в III дослідній групі зростає вміст серину, глутамінової кислоти, тирозину. Крім цих амінокислот, збільшувалась кількість треоніну, ізолейцину, лейцину, фенілаланіну. Вміст проліну і гліцину знижувався. Таким чином, як і в III дослідній групі, виявлені зміни амінокислотного складу можуть у першу чергу позначитись на значенні поверхневого заряду молекули, вмісті неколагенових послідовностей і кількості доменів, які відповідають за адгезію клітин до колагенових структур, а також на ступені жорсткості спіралі молекули [10, 8]. Отже, у загальних рисах специфічний ефект навантаження триптофаном на амінокислотний склад кислоторозчинного колагену шкіри щурів не змінювався за своїм характером незалежно від того, чи відбувалось формування карцином у експериментальних тварин на фоні безбілкового раціону (група III) чи на фоні стандартного раціону (група IV).

У той же час амінокислотний склад колагену IV дослідної групи вірогідно відрізнявся від складу даного білка I дослідної групи за вмістом 10 амінокислот, а від II дослідної групи – лише 5 амінокислот, що може служити ще одним свідченням більш виявленого впливу безбілкового раціону (у порівнянні зі стандартним) на реалізацію ефекту навантаження триптофаном на якісний склад даного сполучнотканинного білка. Аналіз змін амінокислотного складу колагену IV дослідної групи в цілому сві-

дчить про те, що сумація ефектів навантаження триптофаном і стандартної забезпеченості раціону білком (20 %) під час формування пухлин веде до посилення якісних змін у структурі колагену порівняно з нормою.

Висновки. 1. Установлена здатність навантаження раціону триптофаном викликати якісні зміни в амінокислотному складі колагену шкіри щурів, уражених карциномою Герена в порівнянні зі складом даного білка як нормальних тварин, так і тварин з карциномою, що утримувались на стандартному раціоні. 2. Навантаження триптофаном на фоні безбілкового раціону не нівелює нормалізуючого ефекту позбавленої білка дієти на амінокислотний склад колагену шкіри щурів, уражених карциномою Герена. 3. У разі формування карциноми на фоні стандартного раціону сумація ефектів навантаження триптофаном і 20 % білка в дієті веде до посилення якісних змін у структурі колагену порівняно з нормою.

1. Бондаренко Л.Б. // Укр. біохім. журн. – 1998. – Т. 70, № 3. – С. 12–23.
2. Бондаренко Л.Б., Данилюк Т.П., Зінов'єв С.Г. Вплив введення у безбілковий раціон навантаження триптофаном та гліцином на пул вільних амінокислот сироватки крові щурів // П'яті Каришинські читання. – Полтава, 1998. – С. 17–21.
3. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Заїтка М.У., Базеєрхья И.С. Аминокислоты в медицине. – К., 1982.
4. Лебедев Д.А. // Успехи совр. биол. – 1979. – Т. 88, № 1. – С. 36–49.
5. Орехович В.Н., Тустановский А.А., Орехович К.Д. и др. // Биохимия. – 1948. – Т. 13, № 1. – С. 55–62.
6. Dennis J.W., Laferte S., Vanderaelst I. // Biochem. Soc. Trans. – 1989. – Vol. 17, № 1. – P. 29–31.
7. Hashimoto N., Kobayashi A., Tsuji T. // Acta Med. Okayama. – 1988. – Vol. 42, № 1. – P. 1–6.
8. Kornblith A.R., Gutman F. // Biol. Rev. – 1988. – № 63. – P. 465–507.
9. Pnce J.T., Bonovich M.T., Kohn E.C. // Crit. Rev. to Biochem. and Mol. Biol. – 1997. – Vol. 32, № 3. – P. 175–255.
10. Ramachandran G.N. Biochemistry of collagen. – New York, London, 1976.

Надійшла до редакції 22.10.05

УДК 577.322: 537.632.5

В. Мартинюк, канд. біол. наук, Ю. Цейслер, асп.,
М. Мірошниченко, д-р біол. наук

ДІЯ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ НА ПРОЦЕС РЕНАТУРАЦІЇ МЕТГЕМОГЛОБІНУ, НАСИЧЕНОГО НЕПОЛЯРНИМИ ЛІГАНДАМИ

Запропоновано модель гідрофобних взаємодій у білках на прикладі ренатурації метгемоглобіну, яка заснована на доволіному згортанні білкової глобули після її часткової денатурації в умовах навантаження білка низькомолекулярними лігандами неполярної природи – бензолом та хлороформом. Досліджено дію електромагнітного поля на цей процес. Виявлено, що слабке змінне магнітне поле посилює вплив хлороформу та бензолу.

The model of hydrophobic interactions during renaturation of methemoglobin that based on spontaneous folding of protein globules after its denaturation under the loading of low-molecular ligands with non-polar nature, such as benzol and chloroform, was developed. The action of extremely low frequency magnetic field on this process was studied. It was revealed that the magnetic field increases effects caused by chloroform and benzol.

Вступ. Посилення інтересу до біологічної активності мікродоз факторів різноманітної природи є безперечним [1, 6]. Результати досліджень останніх років однозначно свідчать про високу чутливість живих систем до дії слабких магнітних полів як природного, так і антропогенного походження [2]. Дослідження біологічних механізмів впливу електромагнітних факторів є актуальними як у теоретичному плані, так і з точки зору їхнього практичного застосування в медицині, експериментальній біології та біотехнології. Однак молекулярні механізми дії магнітних полів, особливо діапазону наднизьких частот (МП ННЧ), ще й досі досліджено недостатньо.

Аналіз літературних даних свідчить, що білки й вода можуть бути одними з основних сенсорів найслабших впливів, у тому числі й електромагнітних полів [1–3, 6]. Проте ця гіпотеза потребує суттєвої експериментальної перевірки. Проведені нами дослідження на моделі неспецифічного зв'язування низькомолекулярних речовин

неполярної природи з такими білками, як цитохром с та сироватковий альбумін, є ознакою того, що дія МП ННЧ змінює структурно-функціональні властивості білків шляхом впливу на гідрофобні взаємодії [4, 5]. Широко відомо, що гідрофобні взаємодії відіграють головну роль у формуванні просторового згортання біополімерів при їх синтезі, у процесі ренатурації [7], а також у молекулярному розпізнаванні структурно-модифікованих ("дефектних") білкових молекул [10]. Тому для подальшого вивчення молекулярних механізмів дії МП ННЧ (8 Гц 25 мкТл) метою нашої роботи було вивчення впливу даного фактора на ренатурацію молекули метгемоглобіну, тобто на процес спонтанного згортання білкової глобули після її часткової денатурації, в умовах взаємодії цього білка з низькомолекулярними неспецифічними гідрофобними лігандами.

Об'єкт і методи досліджень. Об'єктом дослідження були 0,02 % розчини ліофільного електрофоретично

чистого препарату метгемоглобіну крові бика (Fluka) з молекулярною масою 64 500 Да.

Як експериментальну модель було використано явище ренатурації білкових молекул після часткової кислотної денатурації в поєднанні з насиченням білка низькомолекулярними речовинами гідрофобної природи – хлороформом або бензолом. Ця модель базується на частковому розгортанні білка в розчинах з низьким $pH < 4$ (кислотна денатурація) і на спонтанному згортанні білкової глобули після відновлення нейтральних значень $pH \approx 7$. Розгортання метгемоглобіну супроводжується розкриттям гідрофобних порожнин макромолекули та взаємодією гему з полярними молекулами води. При ренатурації відбувається майже повне повернення структурно-функціональних властивостей білка до нативного стану. Присутність у розчинах інших речовин може змінювати процес ренатурації.

Метгемоглобін попередньо денатурували додаванням до 0,02 % розчинів білка 0,1 Н НСІ в об'ємному

відношенні 50:1 і реєстрували інтегральні спектри біополімеру (рис. 1, А). Одразу після додавання кислоти розчини насичували хлороформом і бензолом у скляних бюксах об'ємом 5 мл шляхом нашарування 3 мл розчину білка на 1,5 мл ліганду з наступною інкубацією зразків при кімнатній температурі. Усі зразки інкубували протягом 1, 2, 4 і 24 год. після чого білок денатурували за допомогою додавання 0,1 мл 0,2 моль/л фосфатного буфера, $pH=7,0$. Процес ренатурації реєстрували за зростанням оптичної густини метгемоглобіну з моменту початку нейтралізації pH розчинів через кожні 20 хв протягом 2 год на спектрофотометрі СФ-16 при довжині хвилі $\lambda=408$ нм, що відповідає піку Соре, тобто максимуму поглинання гему в метгемоглобіні (рис. 1, Б). Точність установки довжини хвилі на спектрофотометрі була 0,2 нм, а фотометричне відтворення – 0,005 одиниць оптичної густини (D).

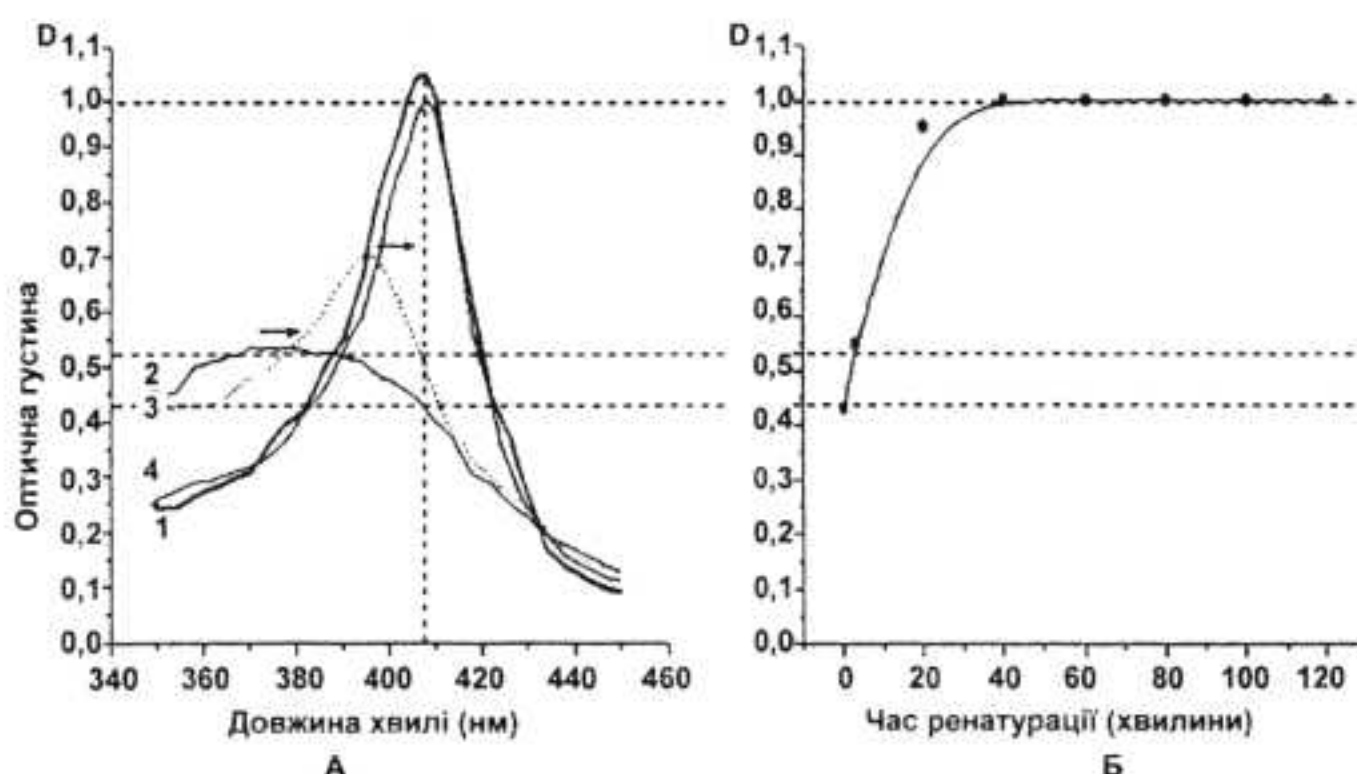


Рис. 1. Оптичні спектри поглинання при різних структурних станах метгемоглобіну (А) та зростання оптичної густини на довжині світлової хвилі 408 нм при ренатурації білка (Б): 1 – контрольний білок; 2 – денатурований білок; 3 – перехідна форма білка в процесі ренатурації через 3 хв; 4 – ренатурований білок

Процес ренатурації білка, який було досліджено в цій серії експериментів, залежить від часу його кислотної денатурації в поєднанні з інкубацією з гідрофобними лігандами (рис. 2). Чим довше процес інкубації метгемоглобіну з хлороформом і бензолом, тим нижче значення оптичної густини при виході кінетичних кривих на плато при ренатурації, тобто ліганди виявляють виражену інгібуючу дію на процес ренатурації білка, при цьому сила впливу на цей процес визначається хімічною природою кожного з лігандів. Таким чином, значення оптичної густини на кінетичному плато, на наш погляд, водночас характеризує як співвідношення денатурованих і ренатурованих форм молекул білка, так і ступінь ренатурації.

Імпульсне магнітне поле, як і в наших попередніх роботах [2, 7], утворювали за допомогою системи кілець Гельмгольца, на які протягом експерименту подавали змінний струм. Джерелом струму був генератор сигналів спеціальної форми Г6-28. Контроль індукції магнітного поля здійснювали за допомогою мікротеслометра Г-79. Імпульси були прямокутної форми та різної полярності. Частота ЕМП складала 8 Гц, індукція

25 мкТл. Вибір частоти магнітного поля був пов'язаний з її екологічною значущістю [8]. Вектор індукції МП був паралельним вектору геомагнітного поля. Експозиція зразків у магнітному полі тривала 1, 2, 4 та 24 год. Контрольні зразки знаходились в умовах фонових значень магнітного поля інтенсивністю 20–65 нТл, що приблизно у 500–1000 разів нижче інтенсивності експериментального МП. Для оцінки можливого впливу відмінностей у рівні фонових МП у місцях розташування дослідних і контрольних зразків додатково проводили експерименти з фіктивним впливом МП. У цьому випадку експериментальні проби поміщали в кільця Гельмгольца, але електричний струм на них не подавали. Таким чином, результати, які були одержані на зразках з дією МП ННЧ, порівнювали як із результатами, отриманими на контрольних зразках, так і на зразках з фіктивним впливом магнітного поля.

Математичний аналіз результатів дослідження проводили згідно із загальноприйнятими правилами варіаційної статистики. Для оцінки достовірності відмінностей застосовували t -критерій Стьюдента.

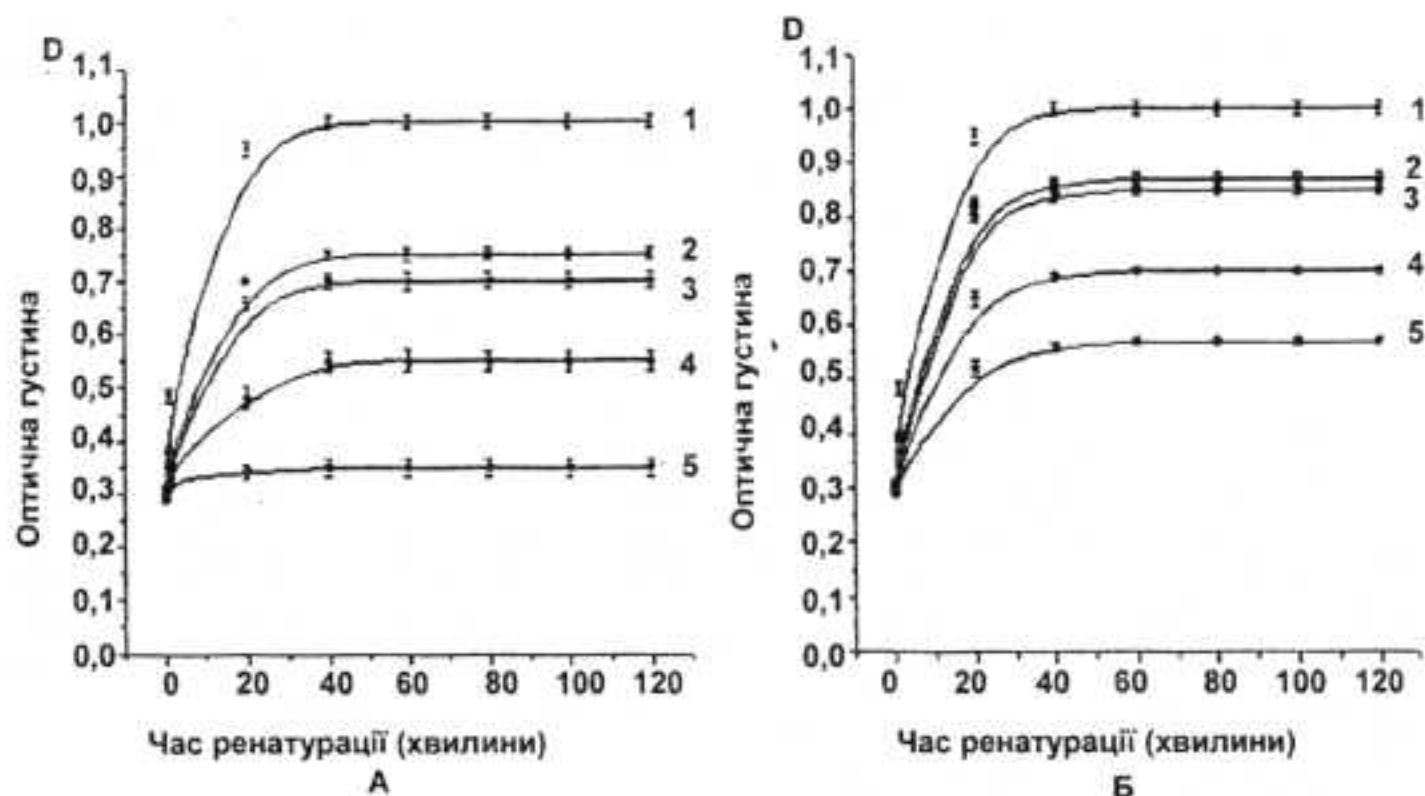


Рис. 2. Кінетичні криві зростання оптичної густини метгемоглобіну на довжині хвилі 408 нм в процесі ренатурації після кислотної денатурації білка та його взаємодії з хлороформом (А) і бензолом (Б): ренатурація білка: 1 – без насичення гідрофобними сполуками; 2, 3, 4, 5 – в умовах насичення гідрофобними сполуками відповідно через 1, 2, 4, 24 год інкубації

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів попередніх досліджень показав, що процес ренатурації метгемоглобіну залежить від часу кислотної денатурації білка та його інкубації з неспецифічними гідрофобними лігандами. Чим довше процес денатурації, тим менша кількість молекул метгемоглобіну повертається до свого первинного стану. При комбінації кислотної денатурації та інкубації білкових розчинів з хлороформом і бензолом кількість молекул метгемоглобіну, здатних до відновлення своєї просторової структури без помітних її змін значно зменшується. При цьому кожен ліганд характеризується своєю специфікою впливу на денатурований білок при відновленні рН до 7. Хлороформ у цілому має більшу денатуруючу дію порівняно з бензолом. Це можна побачити насамперед у більш низькому рівні плато на кінетичних кривих у процесі інкубації (рис. 2, А). Водночас має місце тенденція прискорення ренатурації частини молекул білка, яка залишилась суттєво не зміненою, особливо це відбувається в перші години інкубації метгемоглобіну з хлороформом. Вплив бензолу на денатурований біополімер є м'якшим. У перші години інкубації він виявляє слабку дію, але з часом денатуруючий ефект збільшується, що виявляється у зниженні значень оптичної густини на плато кінетичних кривих. Водночас з цим, на відміну від хлороформу, бензол сповільнює процес ренатурації молекул метгемоглобіну в цілому на 20 хв, тобто бензол контактує та зв'язується з молекулами білка так, що зміни у структурі молекул, які виникають під час цих взаємодій, уповільнюють процес ренатурації (рис. 2, Б). Отже, процес відновлення просторової структури молекул метгемоглобіну залежить від наявності в середовищі неспецифічних низькомолекулярних речовин гідрофобної природи, при цьому специфіка впливу на ренатурацію залежить від їхньої хімічної природи.

Виходячи з усього описаного вище, було цікаво дослідити вплив МП ННЧ на ренатурацію не тільки інтактного білка, а й в умовах його взаємодії з гідрофобними лігандами. Аналіз отриманих результатів показав, що дія МП залежить від гідрофобного ліганду, який контактує з метгемоглобіном.

На початку детального аналізу результатів слід відзначити, що в експериментах з фіктивною дією магнітного поля у відсутності навантаження білка гідрофобними неспецифічними лігандами ніяких достовірних змін не було встановлено. Середні відхилення оптичної густини від контрольних зразків, як правило, були в межах похибки вимірювання спектрофотометра. Це свідчить про добру експериментальну відтворюваність динаміки ренатурації метгемоглобіну.

Аналіз результатів дії МП ННЧ на процес ренатурації метгемоглобіну без навантаження цього білка гідрофобними лігандами показує, що вплив цього фактора незначний. Імовірно, можна говорити лише про тенденції гальмування ренатурації білка при одногодинній і добовій експозиції зразків у магнітному полі. Цей факт у деякій мірі узгоджується з даними, які свідчать про біологічну дію радіовипромінювання мобільних телефонів, яка пригнічує ренатурацію білків [10]. Однак за своїми енергетичними характеристиками електромагнітне випромінювання мобільних телефонів є сильнішим фактором у порівнянні з МП ННЧ. Можливо, саме тому ефекти його впливу на білкові розчини були більшими і були надійно зареєстровані.

Значно більші зміни під впливом МП ННЧ мають місце, якщо навантажити білок гідрофобними низькомолекулярними сполуками. Наприклад, при дії МП на білок, що взаємодіє з хлороформом, відбувається зниження плато кінетичних кривих. При цьому це явище можна спостерігати майже одразу, тобто починаючи з перших годин інкубації (рис. 3, А). Гальмівна дія хлороформом на ренатурацію білка достовірно посилюється при одногодинній експозиції в магнітному полі як у порівнянні з контрольними зразками (рис. 3, А), так і з фіктивно обробленими. Слід зазначити, що при двогодинній магнітно-польовій експозиції теж відбувається посилення дії хлороформу, та якщо порівнювати результати не тільки з контрольними зразками, але й із фіктивно обробленими, то вказане посилення пригнічення ренатурації достовірно є надійно зареєстрованим тільки в перші хвилини процесу ренатурації. За більш тривалих добових впливів МП ННЧ ефекти дії цього фактора не проявляються.

У разі бензолу МП ННЧ достовірно посилює гальмування процесу ренатурації при одно- та чотирьохгодинній експозиції, при цьому вплив магнітного поля протягом 4 год є більш ефективним (рис. 3, Б). Що стосується 20-хвилинної затримки процесу ренатурації білка в умовах його насичення бензолом, то вона зберігається в умовах впливу МП ННЧ.

Таким чином, у цілому МП ННЧ посилює інгібуючу дію гідрофобних лігандів у перші часи експерименту та практично не проявляється при тривалих впливах. Цей феномен також знайдено в інших дослідженнях з різними білками [4, 5], однак його природа поки не відома. Можливо, це пов'язано зі змінами в динаміці переходів молекул білка з одних конформаційних станів у інші [5]. Ураховуючи, що гідрофобні взаємодії є основним фактором у процесі просторового згортання білкової глобу-

ли, у тому числі й при ренатурації, можна припустити, що дія МП ННЧ призводить до появи у клітинах "дефектних" білків, які активують неспецифічну систему клітинного захисту (активація синтезу білків теплового шоку) і піддаються подальшій утилізації в убіквітин-залежній системі протеолізу [9]. Вплив МП ННЧ на процес ренатурації метгемоглобіну при детальному розгляді є суттєвим, але іноді не однозначним для пояснення механізмів дії на молекулярні структури, які в комплексі з водними молекулами є первинними його акцепторами, тому необхідно продовжити вивчення впливу МП ННЧ на молекулярному рівні організації живих систем за допомогою застосування різних методів дослідження, з яких найперспективнішими є флуоресцентна та ЯМР-спектроскопія.

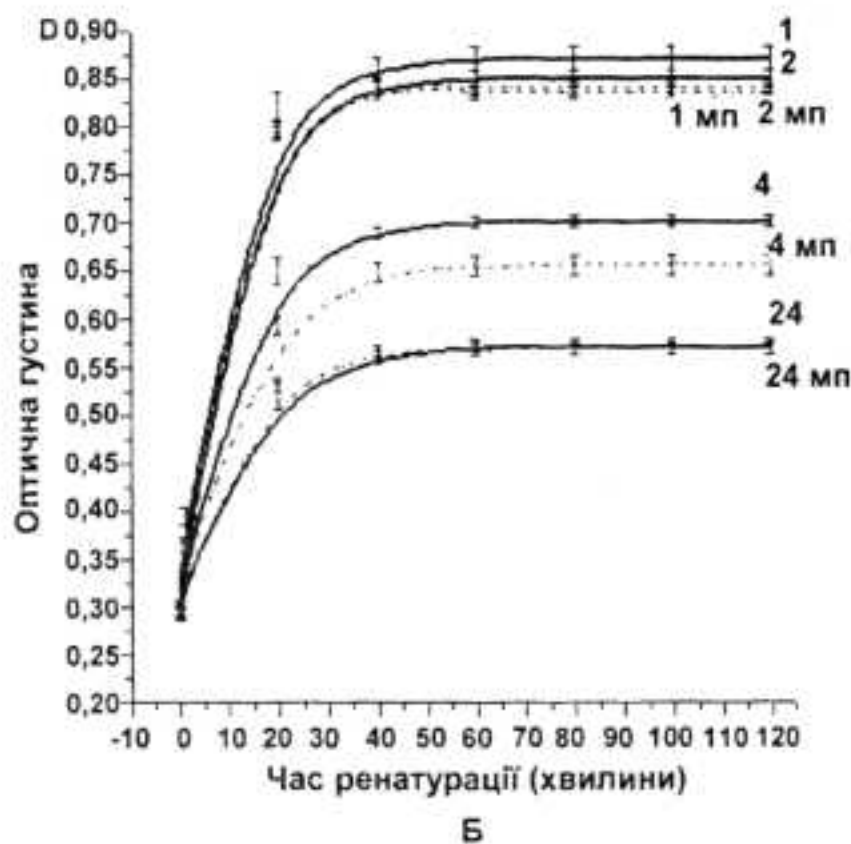
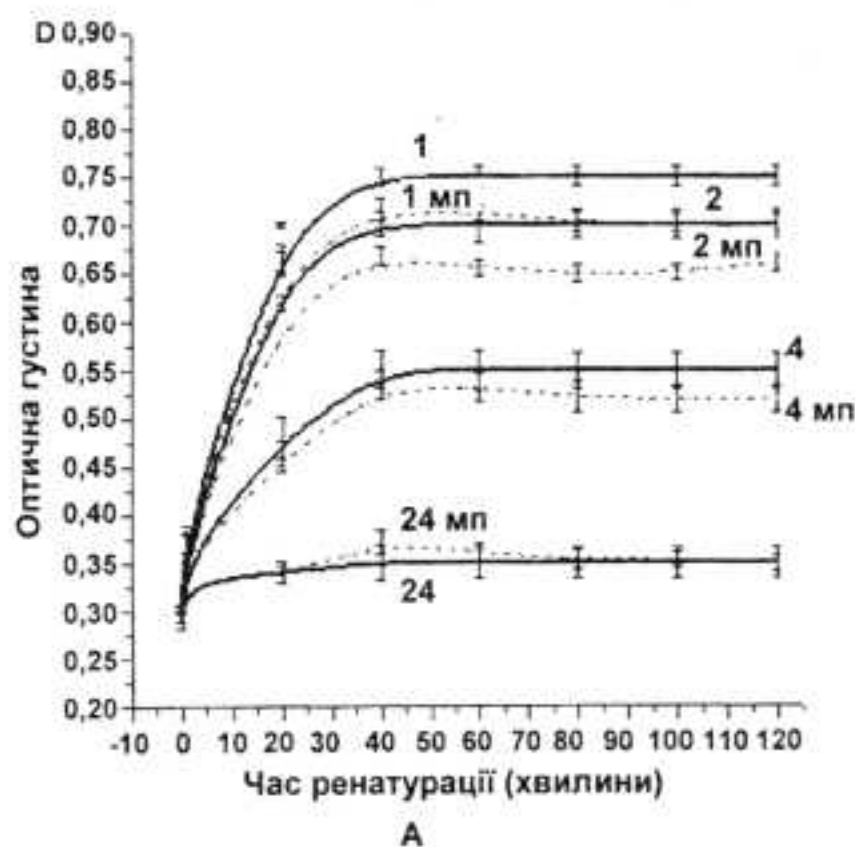


Рис. 3. Вплив МП ННЧ на ренатурацію метгемоглобіну насиченого хлороформом (А) і бензолом (Б): 1, 2, 4, 24 – час насичення неполярними лігандами розчинів білка; мп – вплив МП ННЧ

Висновки. Хлороформ і бензол пригнічують ренатурацію метгемоглобіну, при цьому повернення до початкового структурного стану білка після його кислотної денатурації залежить від часу інкубації білка з даними низькомолекулярними неспецифічними гідрофобними лігандами.

МП ННЧ посилює пригнічувальну дію хлороформу та бензолу на процес ренатурації метгемоглобіну, особливо в перші години інкубації з цими лігандами.

У процесі ренатурації метгемоглобіну при дії МП ННЧ вплив хлороформу зберігає свій більш активно виражений денатуруючий ефект у порівнянні з впливом бензолу.

Дія МП на білок, який контактує з бензолом, виявляється найбільш активно на 4-ту годину впливу магнітного поля зі збереженням здатності до уповільнення виходу кінетичних кривих на плато.

1. Бурлакова Е.Б. // Вестн. РАН – 1994. – Т. 64, № 5. – С. 425–434.
2. Космическая погода и наша жизнь / Владимирский Б.М., Темурьянц Н.А., Мартынюк В.С. – Фрязино, 2004.
3. Магнитобиология: эксперименты и модели / Бинги В.Н. – М., 2002.
4. Мартынюк В.С., Калиновский П.С., Цейслер Ю.В. // Ученые зап. Таврич. нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия "Биология" – 2001. – Т. 14, № 3. – С. 121–128.
5. Мартынюк В.С., Цейслер Ю.В., Калиновский П.С. // Таврич. мед.-биол. вестн. – 2004. – Т. 7, № 1. – С. 86–91.
6. Особенности биологического действия физических факторов малой и сверхмалой интенсивностей и доз / Гатовский С.И., Перов Ю.В. – М., 2000.
7. Физика белка / Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. – М., 2002.
8. Электромагнитные поля при аэро- и гидрофизических процессах / Степанюк И.А. – СПб., 2002.
9. Ciechanover A. // EMBO Journal. – 1998. – Vol. 17, № 24. – P. 7151–7160.
10. Mancinelli F., Caraglia M., Abbruzzese A. et al. // J. of Cellular Biochemistry. – 2004. – Vol. 93. – P. 188–196.

Надійшла до редакції 02.11.05

УДК 577.112.7:616

V. Mykhalchenko, PhD stud., D. Minchenko, res. techn.,
A. Bobarykina, res. techn., O. Minchenko, DSc.

STRUCTURE AND EXPRESSION OF THE 6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE-1 IN THE RAT RETINA

Ген PFKFB-1 кодує синтез ізоферменту 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази, що експресується переважно в печінці та скелетних м'язах. Виявлено експресію даного гена в сітківці ока щурів, а також індукцію експресії мРНК PFKFB-1 в умовах гіпоксії *in vivo*. Аналіз N-кінцевої ділянки мРНК PFKFB-1 із сітківки ока щурів показав наявність замін нуклеотидів і амінокислот порівняно з описаною раніше ізоформі PFKFB-1 із печінки. У виявленій нами ізоформі ферменту PFKFB-1 у N-кінцевій регуляторній ділянці відсутній залишок Ser-33, який є сайтом фосфорилування, що відіграє надзвичайно важливу роль в регуляції активності даного біфункціонального ферменту. Виділена нами із сітківки мРНК PFKFB-1 є новою формою PFKFB-1 із зміненими регуляторними властивостями.

PFKFB-1 gene is encoded an isozyme of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase which originally was found in the liver and skeletal muscle. PFKFB-1 gene expression was observed in rat retina. It was shown that *in vivo* hypoxia induces expression of PFKFB-1 mRNA in the retina. Sequence analysis the N-terminal region of PFKFB-1 cDNA from rat retina reveals several nucleotide and amino acid substitutions as compared to rat liver isoform described previously. Retina PFKFB-1 isozyme does not contain Ser-33 in the N-terminal regulatory region which is an important residue in the regulation of the activities of this bifunctional enzyme via phosphorylation and represents new isoform of PFKFB-1 with differing regulatory properties.

Introduction. The fructose-2,6-bisphosphate is considered to be the major allosteric regulator of 6-phosphofructo-1-kinase, a key regulatory enzyme of glycolysis, and an inhibitor of fructose-1,2-bisphosphatase [1]. Because of the antagonistic effects in these enzymes, fructose-2,6-bisphosphate plays a critical role in the opposing glycolytic and gluconeogenic pathways. A family of bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) enzymes is responsible for maintaining the cellular levels of fructose-2,6-bisphosphate by synthesizing and degrading this compound at distinctive active sites in each enzyme type and controls glycolysis [10]. Several tissue-specific mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase isozymes have been identified. PFKFB isozymes are encoded by four different genes (PFKFB-1-4) in mammalian cells. These genes encode isozymes that differ not only in their tissue distribution but also in their kinetic and regulatory properties [10]. The rat PFKFB-1 gene is located in chromosome X (Xq22-q31) and encoded isozyme of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase which originally was found in the liver and muscle. It is interesting to note, that promoter region and N-terminal part of PFKFB-1 gene in skeletal muscle and liver is different as a result of its tissue-specific structure/function differentiation. There are data that 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase encoded by PFKFB-1 gene in the testis differs from liver isozyme [4]. Moreover, from two to eight isoforms that differ in the C-terminal region have been described for PFKFB-2, PFKFB-3 and PFKFB-4 [2, 9]. These isoenzymes have different kinetic and regulatory properties. It is possible, that existence of multitude isoforms of one bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase with different kinetic and regulatory properties plays a key role in the regulation of glycolysis in different physiological or pathophysiological conditions.

The regulation of gene expression by hypoxia is linked to the activation of a transcriptional complex termed hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) that binds to specific hypoxia-responsive element (HRE) [13]. This element has been identified now in most hypoxia-responsive genes [7, 14]. HIF-1 activation depends on the hydroxylation of specific prolyl and asparaginyl residues in the alpha subunit of HIF-1 that controls the survival and transcriptional activity of the protein. These recently described HIF-hydroxylase enzymes are a series of non-haem iron and oxoglutarate-dependent dioxygenases that define a novel mechanism of protein modification that transduces the oxygen-sensing signal and control hypoxic

gene activation [1, 5]. The hypoxia-responsible element/enhancer mediates hypoxic induction by recruiting the HIF complex and allowing its interaction with other trans-activators and the basal transcriptional machinery [13, 14].

Hypoxia is one of the most potent inducers of genes involved in glycolysis for maintaining cellular energy. Recently we have shown that the expression of all four genes of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB1-4) are responsive to hypoxia *in vivo* and in various cell lines *in vitro* but regulation of the expression of these PFKFB isozymes following hypoxic treatment is different and can occur in an organ-specific and possibly cell-specific manner [6, 8].

Here, we present studies that show the expression and hypoxic induction of the PFKFB-1 mRNA in rat retina. Furthermore, we have found differences in the nucleotide sequence of retina PFKFB-1 cDNA from Wistar rats as compared to the liver PFKFB-1.

Subject and methods of investigation. Male Wistar rats (200–250 g body weight) were used. For hypoxia *in vivo* rats were placed for six hours in a modular incubator chamber and flushed with a gas mixture, containing 7,5 % oxygen and 92,5 % nitrogen. Rats were killed immediately following extraction from the hypoxic chamber and both retinas as well as liver were rapidly dissected and frozen in the liquid nitrogen. Total RNA was extracted from retina using Trizol reagent according to manufacturer protocols (Invitrogen, USA). RNA pellets were washed with 75 % ethanol and dissolved in nuclease-free water. Reverse transcription/polymerase chain reaction (RT/PCR) analysis was used for the study of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-1 mRNA expression in the retina and liver of Wistar rats. For first-strand cDNA synthesis was used Sensiscript RT Kit (QIAGEN, Germany) and oligo(dT). PCR amplification was performed with the following oligonucleotide primers: 5'-GATGTCTCGAGAGATGGGAG-3' (forward) and 3'-GTGCTATGAGATCAACTACC-5' (reverse) using Hot Star Taq Master Mix Kit (QIAGEN). These oligonucleotides correspond to nucleotide sequences 202–221 and 796–815 of human PFKFB-1 mRNA (GenBank accession number NM_012621). PCR fragments were analyzed in 1,5 % agarose gel and cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen). The β -actin was used to evaluate total RNA. Sequence analysis of cloned fragment of rat retina PFKFB-1 mRNA was performed using ABI Prism (Model 3100, version 3.7).

Results and discussion. To examine the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-1

gene in the retina of Wistar rats, the levels of PFKFB-1 mRNA were measured by reverse transcription/polymerase chain reaction (RT/PCR) analysis. As shown in Fig. 1, the transcripts of PFKFB-1 isozyme are present in the retina from normal (normoxic) rats. Thus, PFKFB-1 gene is expressed in rat retina. Moreover, in vivo hypoxia increases the expression of PFKFB-1 mRNA in the retina.

These results conform to our previous data [8]. Thus, we have shown that in vivo hypoxia induced the expression of PFKFB-1 mRNA in the liver, skeletal muscle and testes but did not change significantly in some other organs from mice [8].

The N-terminal region of retina PFKFB-1 mRNA from male Wistar rats was cloned and sequenced. Nucleotide sequence of PFKFB-1 mRNA from rat retina was sent to GenBank and has GenBank accession number AY707861. As shown in Fig. 2, the N-terminal region of retina PFKFB-1 mRNA from male Wistar rats contains several nucleotide and amino acid substitutions as compared to the similar region of liver isoform PFKFB-1 mRNA from Sprague-Dawley rats (GenBank accession number NM_012621).

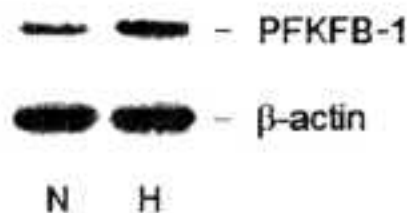


Fig 1. Reverse transcription/polymerase chain reaction (RT/PCR) analysis of PFKFB-1 mRNA expression in the retina of Wistar rats. The rats were exposed 6 hours under hypoxia (H), normoxic (control) animals (N). First-strand cDNA was synthesized using Sensiscript RT Kit (QIAGEN, Germany). PCR amplification was performed with the following oligonucleotide primers: 5'- GATGTCTCGAGAGATGGGAG-3' (forward) and 3'-GTGCTATGAGATCAACTACC-5' (reverse) using Hot Star Taq Master Mix Kit (QIAGEN, Germany). The amplified DNA fragments were separated on a 1,5 % agarose gel and that visualized by ethidium bromide staining. Representative agarose gel employed in a typical (from four independent) RT-PCR analysis of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-1 mRNA expression in the retina from control (N) and hypoxic (H) rats. The β -actin was used to standardize total RNA quantity

Nucleotide sequence of PFKFB-1 mRNA

```

1 atgtctcgag agatgggaga actcactcaa accagggttac agaagatctg gattccacac – AY707861
***** – NM_012621

61 agcagttcga gctcgtgct gcaacggcga aggggcgcat ccataccaca gttcactaat – AY707861
***** – NM_012621

121 tctccacga tggatcat ggtgggttta ccagctcgag gcaagaccta catctctacg – AY707861
***** – NM_012621

181 aagctcacac gctatctcaa ctggatagga acaccaacta aagtgtttaa ttaggtcag – AY707861
***** – NM_012621

241 tatcgacgag aggcagtgag ttacaggaac tatgaattct ttcgccaga caacacagag – AY707861
***** – NM_012621

301 gccagctta tcaggaagca gtgtgctcta gcagccctaa aggatgtcca taagtatctc – AY707861
***** – NM_012621

361 agccgcgagg aaggatcatg tcgggtttt gatgccacca acactaccag agaacgacga – AY707861
***** – NM_012621

421 tcgttgattc tacagtttgc taaggaacat ggttataagg tctctttat tgagtctatt – AY707861
***** – NM_012621

481 tgtaatgacc ccgaaatcat tcagaaaac atcaagcaag tgaaacttgg tagtctgat – AY707861
***** – NM_012621

541 tacatagact gtgaccaaga aaagggtttg gaagactttc ta – AY707861
***** – NM_012621
    
```

Amino acid sequence of PFKFB-1 mRNA

```

AY707861 MSREMGELTQTRLQKIWIHSSSSSVLQRRRGASIPQFTNSPTMVIMVGLPARGKTYISTKLTRY
NM_012621 MSREMGELTQTRLQKIWIHSSSSSVLQRRRGSSIPQFTNSPTMVIMVGLPARGKTYISTKLTRY

AY707861 LNWIGTPTKVFNLGQYRREAVSYRNYEFFRPDNTAQLIRKQCALAALKDVHKYLSREEGHVAVF
NM_012621 LNWIGTPTKVFNLGQYRREAVSYRNYEFFRPDNTAQLIRKQCALAALKDVHKYLSREEGHVAVF

AY707861 DATNTTRERRSLILQFAKEHGYKVFFIESICNDPEIIAENIKQVKLGSPDYIDCDQEKVLEDFL
NM_012621 DATNYTRERRSLILQFAKEHGYKVFFIESICNDPEIIAENIKQVKLGSPDYIDCDQEKVLEDFL
    
```

Fig. 2. Nucleotide (upper part) and amino acid (bottom part) sequence analysis of PFKFB-1 mRNA from the retina of Wistar rats (GenBank accession number AY707861) as compared to PFKFB-1 mRNA from the liver of Sprague-Dawley rats (GenBank accession number NM_012621)

However, the retina PFKFB-1 mRNA contains 15 nucleotide substitutions but only three of them leads to two amino acid substitutions. Most of nucleotide substitutions are located in the N-terminal regulatory region of retina PFKFB-1 mRNA. One of them is responsible for replacement Ser-33 to alanine. Thus, retina PFKFB-1 isozyme does not contain Ser-33 in the N-terminal regulatory region which is an important residue in the regulation of the activities of this bifunctional enzyme via phosphorylation and represents new isoform of PFKFB-1 with differing regulatory properties. Ser-33 is a site for cAMP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation [3, 12]. Similar isozyme was created from rat liver PFKFB-1 by site-specific Ser-33-Ala mutation for studying the significance of Ser-33 phosphorylation [3]. The kinetic properties of the Ser-33-Ala mutant, which is similar to retina PFKFB-1 isozyme, were identical with the dephosphorylated wild-type isoform of this bifunctional enzyme. The phosphorylated liver wild-type enzyme had greatly decreased affinities for fructose-6-phosphate and decreased maximal velocities [3]. The catalytic efficiency of 6-phosphofructo-2-kinase of Ser-33-Ala mutant was essentially identical with that of the dephosphorylated wild-type enzyme, while the phosphorylated wild-type enzyme was decreased [3]. Moreover, phosphorylated wild-type enzyme had much higher fructose-2,6-bisphosphatase activity as compared with that of the dephosphorylated wild-type enzyme or Ser-33-Ala mutant. Thus, our results clearly demonstrated the expression of a new isoform of PFKFB-1 enzyme in the retina which is similar to Ser-33-Ala mutant of liver PFKFB-1 enzyme. It is possible that the expression of this new isoform is specific for retina cells

and plays a role in the regulation of glycolysis in this tissue in different physiological or pathophysiological conditions.

Conclusions. PFKFB-1 gene expresses in rat retina. In vivo hypoxia increases the expression of PFKFB-1 mRNA in the retina. The N-terminal region of retina PFKFB-1 mRNA from male Wistar rats contains several nucleotide and amino acid substitutions as compared to the liver isoform from Sprague-Dawley rats (GenBank accession number NM_012621). Retina PFKFB-1 isozyme does not contain Ser-33 in the N-terminal regulatory region which is an important residue in the regulation of the activities of this bifunctional enzyme via phosphorylation and represents new isoform of PFKFB-1 with differing regulatory properties.

1. Appelhoff R.J., Tian Y.-M., Raval R.R. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, № 37. – P. 38458–38465.
2. Kessler R., Eschrich K. // Mol. Brain Res. – 2001. – Vol. 87. – P. 190–195.
3. Kurland I.J., el-Maghrabi M.R., Correia J.J., Pilikis S.J. // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267, № 7. – P. 4416–4423.
4. Lee Y.H., Li Y., Uyeda K., Hasemann C.A. // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, N 1. – P. 523–530.
5. Min J.-H., Yang H., Ivan M. et al. // Science. – 2002. – Vol. 296, № 5574. – P. 1886–1889.
6. Minchenko A.G., Leshchinsky I., Opentanova I. et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, № 8. – P. 6183–6187.
7. Minchenko A., Caro J. // Mol. Cell. Biochem. – 2000. – Vol. 208, № 1. – P. 53–62.
8. Minchenko O., Opentanova I., Caro J. // FEBS Lett. – 2003. – Vol. 554. – P. 264–270.
9. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Ochiai A. et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2005. – Vol. 280, №1–2. – P. 227–234.
10. Okar, D. A., Manzano, A., Navarro-Sabate, A. et al. // Trends Biochem. Sci. – 2001. – Vol. 26. – P. 30–35.
11. Pilikis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J., Lange, A. J. // Annu. Rev. Biochem. – 1995. – Vol. 64. – P. 799–835.
12. Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D. et al. // Biochem. J. – 2004. – Vol. 381. – P. 561–578.
13. Semenza G.L. // J. Appl. Physiol. – 2004. – Vol. 96, № 3. – P. 1173–1177.
14. Wenger R.H. // FASEB J. – 2002. – Vol. 16, № 10. – P. 1151–1162.

Надійшла до редколегії 15.10.05

УДК 617.751

I. Тарасенко, асп., М. Макаруч, д-р біол. наук,
Т. Куценко, канд. біол. наук

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ТЕМНОВОЇ АДАПТАЦІЇ ТА ГОСТРОТИ ЗОРУ ПРИ РОБОТІ З МОНІТОРОМ КОМП'ЮТЕРА Й ПАПЕРОВИМИ НОСІЯМИ

Вимірювались зміни порогів темнотної адаптації та гостроти зору до і після півгодинного читання тексту з монітора комп'ютера і читання друкованого тексту. Виявлено кореляційні зв'язки між гостротою зору вдаль і показниками темнотної адаптації після зорового навантаження, зумовленого читанням тексту з паперового носія, тоді як при роботі з монітором комп'ютера таких зв'язків не встановлено.

Were examined by methods of dark adaptation thresholds measurement and measurement of the visual acuity before and after 30 minutes of reading text from computer monitor and printed on paper text. There were detected correlations between visual acuity and dark adaptation values after visual load, consisted in reading printed on paper text, while after work with computer monitor such differences are not obtained.

Вступ. На сьогодні накопичено значний практичний досвід роботи оператора з електронно-обчислювальною технікою, зокрема з основним пристроєм виводу інформації сучасних комп'ютерів – ЕПТ-монітором. Хоча багатьма авторитетними спеціалістами вважається, що рівні рентгенівського, ультрафіолетового та інших електромагнітних випромінювань, включно з електричним полем, що спричиняється статичним електричним зарядом на екрані у сучасних комп'ютерних ЕПТ-моніторів, не перевищують біологічно-небезпечний рівень і значно менші за відповідні максимально допустимі рівні, визначені стандартами різних країн [2, 4], багато користувачів персональних комп'ютерів скаржаться на зорове та загальне стомлення, що є ознаками синдрому, який у вітчизняній літературі отримав назву синдрому астенопії. Відчуття втоми часто супроводжується відчуттям "сухих очей", відчуттям різі чи болю

в очах, головними болями. Дослідження показали залежність прояву таких симптомів від багатьох факторів, таких як рівень інформаційного навантаження, частота мерехтіння дисплея, чіткість і контрастність зображення, взаємне розташування дисплея та оператора, наявність відблисків відбитого світла на моніторі, освітлення тощо [1]. Проте механізми виникнення та розвитку синдрому астенопії при роботі з ЕПТ-монітором досі не з'ясовані, хоча деякі дослідники пов'язують прояви цього синдрому передусім зі змінами на центральному та рецепторному рівнях зорового аналізатора [3]. Виходячи з цього, вважаємо доцільним визначення інформативності методу вимірювання порогів світлової чутливості щодо оцінки можливих змін на рецепторному рівні зорового аналізатора внаслідок роботи за комп'ютером.

Об'єкт і методи досліджень. У дослідженнях брали участь 26 осіб. Проводилося визначення гостроти зору

© I. Тарасенко, М. Макаруч, Т. Куценко, 2006

вдалечинь з використанням таблиці Сівцева, а також вимірювання порогів світлочутливості зорового аналізатора за умов темної адаптації. Пороги світлочутливості зорового аналізатора за таких самих умов досліджувалися за допомогою адаптометра АРП. Для стандартизації початкового стану зорового аналізатора обстежувані адаптувалися до світла інтенсивністю 1200 кд/м^2 у камері адаптометра протягом 2,5 хв. Такі характеристики преадаптуючого світла дозволяли впевнено розділити фотопічну (ковбочкову) і скотопічну (паличкову) фази темної адаптації. Як навантаження використовувалося 30 хв читання тексту з монітора комп'ютера. Використовувався 15-дюймовий монітор, роздільна здатність якого була налаштована на 800×600 точок при частоті вертикальної розгортки в 75 Гц. Також проводилося контрольне обстеження тих самих людей, де навантаженням застосовували півгодини читання друкованого тексту. Зміни досліджуваних параметрів оцінювалися за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона.

Результати та їх обговорення. Для аналізу використовувалися значення порогів темної адаптації за 1–2-гу, 4–5-ту й 6–7-му хвилини адаптації. Такі проміжки часу були обрані після візуального аналізу кривих адаптації обстежуваних таким чином, щоб вони були відповідними фотопічній, плато та скотопічній фазам темної адаптації більшості обстежуваних (потрібно сказати, що за обраної інтенсивності та тривалості преадаптуючого світла

фаза плато між скотопічною і фотопічною фазами адаптації у деяких обстежуваних була слабо вираженою за рахунок скорішого початку скотопічної фази).

Порівняння показників адаптації до та після адаптації в експерименті та контролі не показало достовірних змін. Гострота зору також вірогідно не змінювалась, що говорить про те, що обрана тривалість роботи з комп'ютером (30 хв) є недостатньою.

Незважаючи на те, що достовірні зміни у показниках адаптації не спостерігались, були отримані значимі кореляційні зв'язки між показниками адаптації після навантаження та гостротою зору (табл. 1). Як показники темної адаптації для кореляційного аналізу були використані середні значення порогів світлочутливості за 1–2-гу, 4–5-ту та 6–7-му хв адаптації, а також загальне – за весь період темної адаптації. Причому, якщо в контролі показники адаптації після навантаження мали виражену обернену кореляцію з показниками гостроти зору, то в експерименті така картина зникла. В експерименті коефіцієнти кореляції між гостротою зору та показниками адаптації після навантаження значно нижчі й здебільшого не вірогідні, хоча знаку свого не змінюють. Це може бути свідченням прояву якоїсь особливості системи, функціонування котрої виявляється після зорового навантаження, обумовленого читанням друкованого тексту з паперового носія і не виявляється за умов адаптації до роботи з монітором комп'ютера.

Таблиця 1. Коефіцієнти кореляції між показниками гостроти зору та середніми значеннями показників адаптації у експерименті та контролі (N=23)

Робота з монітором комп'ютера (експеримент)		Значення показників адаптації							
		До навантаження				Після навантаження			
		загальне	2–3 хв	4–5 хв	6–7 хв	загальне	2–3 хв	4–5 хв	6–7 хв
До навантаження	праве око	-0,21406	-0,4019	-0,21935	-0,0714	-0,38002	-0,39715	-0,4015	-0,2816
	ліве –"	0,098212	-0,0932	0,1111	0,13498	-0,02019	-0,08581	-0,0385	0,03779
Після навантаження	праве –"	-0,15135	-0,3882	-0,08703	-0,11166	-0,3433	-0,33596	-0,3248	-0,3163
	ліве –"	-0,21712	-0,3956	-0,1665	-0,21368	-0,35873	-0,44239	-0,3295	-0,3146
Читання тексту з паперового носія (контроль)		Значення показників адаптації							
		До навантаження				Після навантаження			
		загальне	2–3 хв	4–5 хв	6–7 хв	загальне	2–3 хв	4–5 хв	6–7 хв
До навантаження	праве –"	-0,07582	0,1406	-0,1005	-0,064	-0,52944	-0,51382	-0,5428	-0,4807
	ліве –"	-0,1686	-0,045	-0,1537	-0,170	-0,60695	-0,56947	-0,5910	-0,5902
Після навантаження	праве –"	-0,03631	0,101	-0,0519	-0,024	-0,54059	-0,57079	-0,5373	-0,4898
	ліве –"	-0,3168	-0,154	-0,3255	-0,284	-0,6221	-0,566	-0,609	-0,669

Примітка: Значимі ($p < 0,05$) коефіцієнти кореляції виділено жирним шрифтом.

Усі обстежувані були поділені на групи за гостротою зору. До групи обстежуваних із поганим зором були включені ті, чий зір був нижче 0,9 за Сівцевим. У групи з поганим і нормальним зором увійшло 10 і 16 обстежуваних відповідно. Аналіз за методом ANOVA виявив різницю у значеннях порогів темної адаптації для обстежуваних групи з нормальним зором і для таких із групи з поганим зором в експерименті. Ця різниця спостерігалась як до, так і після навантаження упродовж перших п'яти хвилин темної адаптації, що відповідає фотопічній фазі темної адаптації та фазі плато. Причому, значення порогів адаптації для обстежуваних групи з поганим зором були достовірно нижчі за такі в обстежуваних групи з нормальним зором, що говорить про більшу швидкість адаптації в обстежуваних першої групи. Значення порогів адаптації, отримані для обстежуваних досліджуваних груп у паличкову фазу адаптації, вірогідно не відрізнялися. За даними літератури, саме у фотопічну фазу темної адаптації найбільше виявлені нервові механізми адаптації (збільшення просторової та часової сумачії), тоді

як у скотопічну фазу вплив таких механізмів на результуючу криву темної адаптації практично відсутній [5].

У контролі достовірних відмінностей між обстежуваними групами з поганим і нормальним зором відмічено не було, хоча тенденція до більш швидкої адаптації в обстежуваних групи з поганим зором залишалася. Недостовірність відмінностей може бути пов'язана з малим об'ємом вибірки, адже і в експерименті рівень достовірності (число p) наближався до 0,05 і був майже на межі достовірності. Можливо, тут доцільно було б говорити про тенденцію до скорішої темної адаптації в її фотопічну фазу в людей з низькою гостротою зору.

Висновки. 1. Півгодинна тривалість роботи за сучасним комп'ютерним монітором замала для виникнення достовірних змін, які можна дослідити методами вимірювання порогів темної адаптації та вимірювання гостроти зору вдалечинь за допомогою таблиці Сівцева.

2. Виявлено кореляційні зв'язки між гостротою зору вдалечинь і показниками темної адаптації після зорового навантаження, обумовленого читанням тексту

з паперового носія, тоді як при роботі з монітором комп'ютера таких зв'язків не виявлено.

3. Існує тенденція до швидшої темної адаптації в її фотопічну фазу у людей з низькою гостротою зору.

1. Кураев Г.А., Бабенко В.В. Здоровье и образование – СПб. – С. 177–179. 2. Савельев О.Н., Астахова Н.Н., Гайдуков В.А. и др.

// Врач. дело – 1995. – № 8. – С. 86–87. 3. Сауткин В.С., Потапов И.И. // Офтальмолог. журн. – 2000 – С. 74–76. 4. Фатхутдинова Л.М. Изучение особенностей нарушений функционального состояния у работающих с видеодисплейными терминалами и разработка способов их профилактики : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Казань, 1995. 5. Rashton W.A.H. // J. Physiol. (engl.) – 1961. – P. 156–166.

Надійшла до редколегії 29.09.05

УДК: 616.12-089:126

Є. Настенко, канд. техн. наук, Л. Білик, асп.,
П. Янчук, д-р біол. наук

ЗВ'ЯЗОК МІЖ ПЕРИФЕРИЧНИМ ОПОРОМ СУДИН І ПОКАЗНИКАМИ КИСНЕВОГО ГОМЕОСТАЗУ Й ГЕМОДИНАМІКИ У ЛЮДИНИ

Завдяки аналізу показників постачання та споживання кисню у людей з вадами серця в ранньому післяопераційному періоді встановлено, що залежно від виду вад спостерігається різна насосна здатність серця. У ході дослідження визначено, що усунення вад клапанів серця з великою насосною здатністю в деяких випадках призводить до розвитку післяопераційної гіпердинамії, що характеризується надлишковим серцевим викидом, який не відповідає кисневому запиту тканин.

Analized the oxygen delivery and consuming indices at early postoperation period was suggested the correlation between a species of heart vice and different heart pumping ability. By investigations was suggested that eliminating of heart portals (mitral valves) vice with high pumping ability at a number of events derived to developing of postoperation hyperdynamic effects characterized by excessive heart holste, that didn't correspond to tissues oxygen requirement.

Вступ. З'ясування механізмів регуляції кровообігу та кисневого гомеостазу в організмі людини є однією з найактуальніших проблем сучасної фізіології. Відомо, що регуляція системного транспорту кисню в організмі спрямована на більш адекватне забезпечення потреб його тканин в цьому елементі [3]. Оскільки дослідження механізмів транспортування та споживання кисню в організмі здорових людей є непростим з етичних і методологічних причин, вчені використовують результати обстежень людей, які змушені були піддаватись хірургічним втручанням, складним методам інвазійної діагностики тощо. У людей із серцевими вадами в ранньому післяопераційному періоді спостерігається різна насосна здатність серця, тому що після усунення вади воно, як і весь організм, адаптується до роботи в новому для нього режимі [5]. При проведенні паралелі між високим та зниженим рівнями працездатності серця можлива наявність деякої зони оптимуму, якій (за визначених гемодинамічних умов, вмісті кисню в артеріальній крові та певному рівні судинного тону) відповідає максимальне споживання кисню [4]. Метою дослідження було визначити роль загального периферичного судинного опору в оптимізації системного транспорту кисню у людей з набутими вадами серця після протезування його клапанів та/або аортокоронарного шунтування.

Об'єкт і методи дослідження. Використано результати обстеження 719 хворих з набутими вадами серця (НВС) та/або ішемічною хворобою серця (ІХС) протягом 1–2-ої доби після протезування клапанів серця та/або аортокоронарного шунтування. Для оцінки ефективності транспортування та споживання кисню в обстежуваних людей вимірювали й аналізували такі показники: хви-

линний об'єм кровообігу; частоту серцевих скорочень (HR); гемоглобін крові (Hb); парціальний тиск кисню в артеріальній (pO_{2a}) і венозній (pO_{2v}) крові; насичення киснем артеріальної (SO_{2a}) і венозної (SO_{2v}) крові. Розраховували: вміст кисню в артеріальній (cO_{2a}) і венозній (cO_{2v}) крові; серцевий індекс (CI); індекси доставки (IDO_2) і споживання (IVO_2) кисню.

Для статистичної обробки даних використовували: систему розпізнавання образів на основі спеціальних алгоритмів кластер-аналізу, методи варіаційної статистики, кореляційного та регресійного аналізу.

Результати та їх обговорення. Індекси системної доставки (IDO_2) і споживання (IVO_2) кисню, розраховували за формулами (1) і (2), запропонованими [2, 3]:

$$IDO_2 = cO_{2a} \cdot CI; \quad (1)$$

$$IVO_2 = (cO_{2a} - cO_{2v}) \cdot CI, \quad (2)$$

Концентрація кисню в артеріальній і венозній крові визначається наступними виразами:

$$cO_{2a} = SO_{2a} \cdot Hb \cdot 1,39 + (100 \cdot a)/P_{атм} \cdot pO_{2a}; \quad (3)$$

$$cO_{2v} = SO_{2v} \cdot Hb \cdot 1,39 + (100 \cdot a)/P_{атм} \cdot pO_{2v}, \quad (4)$$

де a – коефіцієнт, що залежить від температури, за якої вимірювались показники вмісту кисню в крові (при t тіла – 37°C він дорівнює 0,023), $P_{атм}$ – атмосферний тиск.

Для інтактної системи кровообігу в ранньому післяопераційному періоді за вказаним методом кластеризації отримано такі залежності системної доставки (IDO_2) і споживання (IVO_2) кисню в обстежуваних людей:

$$\text{гіподинамія} - IVO_2 = 0,317 \cdot IDO_2 - 64,05; r = 0,89; p < 0,001 \quad (5)$$

$$\text{нормодинамія} - IVO_2 = 0,578 \cdot IDO_2 - 57,27; r = 0,89; p < 0,001 \quad (6)$$

$$\text{гіпердинамія} - IVO_2 = 0,456 \cdot IDO_2 - 75,90; r = 0,90; p < 0,001 \quad (7)$$

Для орієнтовної оцінки характеру регуляторних зв'язків у таблиці наведено середні значення показників газового складу крові за залежностями при синдромах гіподинамії, нормодинамії та гіпердинамії.

Ці результати свідчать про те, що зміни індексу загального периферичного судинного опору спрямовані на підтримання середньодинамічного тиску крові на деякому сталому рівні, при цьому серцевий індекс (CI) та

індекс загального периферичного судинного опору (SVRI) жорстко зв'язані між собою залежністю: ріст SVRI призводить до зниження CI і навпаки. За різної насосної здатності серця, що має місце в ранньому післяопераційному періоді, регуляція системного транспорту кисню спрямована на якомога більш адекватне задоволення потреб організму. У даному випадку регуляторні реакції призводили до підвищення екстракції кисню з артеріальної крові при зниженні серцевого викиду. Низький рівень артеріального тиску (АТ) може призводити до зменшення екстракції кисню клітинами організму внаслідок зменшення градієнта пре-

і посткапілярного тиску крові, а за умов підвищеного рівня продуктивності серця – ще й завдяки занадто швидкому проходженню еритроцитів по мікросудинах. З іншого боку, виражений спазм периферичних судин при зниженні рівня продуктивності серця призводить до зменшення кровотоку в тканинах і зниження системного споживання кисню завдяки зменшенню його доставки.

Отже, між двома зазначеними режимами кровообігу можна очікувати існування деякої зони оптимуму, якій, за визначених гемодинамічних умов, вмісті кисню в артеріальній крові та певному рівні судинного тону, відповідає максимальне споживання кисню.

Таблиця 1. Середні значення показників центральної гемодинаміки та газового складу крові за залежностями при гіпердинамічній, нормальній і гіподинамічній насосних функціях серця

№	Показники	Залежність					
		Насосна здатність серця					
		Гіподинамія, N = 293		Нормодинамія, N = 317		Гіпердинамія, N = 76	
		M	± m	M	± m	M	± m
1	CI, л/хв/ м ²	1,77	0,03	2,26*	0,03	3,02*	0,09
2	SVRI, дин*с*см ⁵ *м ²	3580	74	2708*	46	1996*	63
3	MAP, мм рт. ст	78,5	0,7	78,0	0,7	77,7	1,2
4	CVP, мм рт. ст	5,8	0,1	6,0	0,1	5,9	0,3
5	cO _{2a} , мл/дл	16,8	0,1	17,4*	0,1	17,9	0,2
6	cO _{2v} , мл/дл	10,6	0,1	13,1*	0,1	15,1*	0,1
7	ΔcO _{2av} , мл/дл	6,2	0,1	4,4*	0,1	2,8*	0,1

* – відмінність показника порівняно з попередньою залежністю статистично достовірна (p<0,05).

Спираючись на результати досліджень деяких науковців [2, 6], у нашому "робочому" діапазоні фізіологічно припустимих значень, залежності cO_{2a} і cO_{2v} між собою лінійно зв'язані. Згідно наших даних, залежності cO_{2v} і cO_{2a} ми можемо представити у вигляді сімейства лінійних рівнянь регресії, яке має вигляд:

$$cO_{2v} = A \cdot cO_{2a} + B \quad (8)$$

де A, B – відповідні коефіцієнти регресії, розраховані за допомогою методу найменших квадратів. При цьому коефіцієнти A і B кожної з гілок сімейства корелюють із SVRI:

$$A = f_1(SVRI) \quad (9)$$

$$B = f_2(SVRI) \quad (10)$$

Використання розробленого нами алгоритму кластеризації для кожної з трьох отриманих нами залежностей IVO₂ (IDO₂) (1)–(3) показало, що спряження пари значень cO_{2a}, cO_{2v} утворюють (згори донизу) три, дві та одну залежності типу (8), коефіцієнти A, B корелюють із SVRI.

Аналогічний результат був отриманий шляхом побудови залежностей типу (8) під час розділення всього інтервалу змін SVRI 1500 і 4500 дин*с*см⁵*м² на інтервали кроком 500 дин*с*см⁵*м². Для кожного з інтервалів SVRI ми розраховували параметри рівнянь регресії – залежності (9) і (10). Зазначимо, що при виконанні цих обчислень зберігався природний взаємозв'язок між SVRI і CI, обчислення проводились без фіксації на постійному рівні CI. Як виявилось, залежності (9) і (10) коефіцієнтів A та B від SVRI найкраще описуються гіперболічними функціями такого вигляду:

$$A = A_1 / (SVRI + 1) + B_1 \text{ і } B = A_2 / (SVRI + 1) + B_2;$$

$$A = (-664,1 / (SVRI + 1) + 1,146);$$

$$r = -0,817, N' = 3; p < 0,001 \quad (11)$$

$$B = 20901 / (SVRI + 1) - 10,556;$$

$$r = -0,782, N' = 3; p < 0,001 \quad (12)$$

Крім того, за показниками вихідного масиву спостережень (не враховуючи показники ЦБТ) ми побудували гіперболічне рівняння регресії, яке зв'язує CI та SVRI:

$$CI = f_3(SVRI) = A_3 / (SVRI + 1) + B_3;$$

$$CI = 4125,9 / (SVRI + 1) + 0,58;$$

$$r = -0,882, N' = 717; p < 0,001 \quad (13)$$

За допомогою (11)–(13) перетворимо рівняння (2) до:

$$IVO_2 = (cO_{2a} - (cO_{2a} \cdot f_1(SVRI) + f_2(SVRI))) \cdot f_3(SVRI) \quad (13a)$$

Рівняння, що пов'язують IVO_{2max} та SVRI мають такий вигляд:

$$IVO_{2max} = -0,1995 \cdot SVRI + 726,6;$$

$$r = 0,994, p < 0,001 \quad (14)$$

$$IVO_{2max} = 835056,0 / (SVRI + 1) - 116,3;$$

$$r = 0,998, p < 0,001 \quad (14a)$$

Отже нами отримано модель, яка пов'язує споживання кисню в організмі з рівнем периферичного судинного опору. Вважаючи cO_{2a} рівним 5, 10, 15, 20 мл/дл, при цьому змінюючи SVRI, отримаємо сімейство залежностей, що мають точки максимального споживання кисню IVO_{2max} при cO_{2a}, які дорівнюють 10, 15 та 20 мл/дл.

Порівнюючи форму сімейства залежностей IVO₂(SVRI), отриманого в результаті моделювання з відтвореним завдяки кластеризації, можна перекоонатися в їхній досить близькій відповідності одне одному. Рівняння (14), (14a) і (15) демонструють схожі значення IVO_{2max} при конкретних значеннях SVRI. При цьому їхнє відносне відхилення не перевищує 10–15 %. Ця різниця може бути меншою, якщо пов'язати вміст кисню в артеріальній крові (cO_{2a}) з гемодинамічними показниками, оскільки вона залежить і від рівня серцевого викиду (CI). Проте cO_{2a} = f(CI) утворює замість

однієї залежності їхнє сімейство, яке може формуватися деякими показниками малого кола кровообігу.

Отримані результати дають можливість припустити такі механізми максимальних значень споживання кисню (IVO_2), які пов'язані зі змінами індексу загального периферичного судинного опору (SVRI):

- активація звуження мікросудин м'язового типу при зменшенні серцевого викиду [2, 6] призводить до збільшення кровопостачання ділянок тканин з найбільшою кисневою недостатністю;

- збільшення віддачі кисню еритроцитами в прекапілярних артеріолах і капілярах при помірному підвищенні SVRI відбувається за рахунок більшого градієнта вмісту кисню всередині та ззовні капіляра [1].

Завершуючи, слід зазначити, що завдяки проведенням дослідженням нами був виявлений зв'язок між показниками периферичного судинного опору, системного споживання кисню та системної гемодинаміки. Нам вдалося створити модель, яка пов'язує споживання кисню з рівнем периферичного судинного опору.

Висновки. Зміни загального периферичного опору судин дозволяють оптимізувати системне споживання кисню в організмі при різних рівнях насосної функції

серця. За умов початкового стабільного кисневого запиту тканин, збільшення периферичного судинного тону призводить спочатку до тимчасової максимізації показників споживання кисню, завдяки зменшенню частки шунтового кровотоку в тканинах, а потім до зниження показників кисневого запиту внаслідок зменшення серцевого викиду. Залежності споживання кисню від його доставки і від загального периферичного опору судин можуть бути використані як номограми для спрощеної оцінки частки шунтового кровотоку.

1. Аничков М.Н., Лев И.Д. // Арх. анат., гистол. и эмбриол. – 1962. – Т. 43, № 10. – С. 36–54. 2. Банкл Г. Врожденные пороки сердца и крупных сосудов. – М., 1980. 3. Беленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М., 1989. 4. Книшов Г.В., Палец Б.Л., Настенко Е.А., Максименко В.Б. // Фізіол. журн. – 1996. – № 6. – С. 3–18. 5. Настенко Е.А., В.Б.Максименко, Б.Л.Палец и др. // Щорічник наук. праць асоц. серцево-судинних хірургів України. – 2000. – Вип. 8. – С. 142–144. 6. Atouyel P. // Eur. Heart J – 2000. – Vol. 2 (Suppl. D). – P. 2–4.

Надійшла до редколегії 27.09.06

УДК 612.821:612.821.83

С. Федорчук, інж. I кат., Т. Мірошнік, канд. біол. наук,
Ю. Садовська, канд. біол. наук, Ю. Горго, д-р біол. наук

ЗВ'ЯЗКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ОПЕРАТОРСЬКОЇ ДІЯЛЬНОСТІ ЗІ СТРУКТУРОЮ ІНТЕЛЕКТУ

Досліджено структуру інтелекту в операторів теплових електростанцій у зв'язку з ефективністю діяльності. Виявлено взаємозв'язки ефективності діяльності операторів із розрахунково-математичними здібностями, здатністю до визначення закономірностей, індуктивними характеристиками мислення та зі здібностями до просторового параметрування. У цілому ефективність операторської діяльності за результатами дослідження була пов'язана із загальним рівнем здібностей, що визначався на основі аналізу якості оперування графічним, словниковим і цифровим матеріалом.

The frame of intelligence at operators of thermal power stations was investigated in connection with efficiency of operator activity. Interrelations of efficiency of activity with settlement – mathematical abilities, ability to definition of laws, by inductive characteristics of intellection and with abilities to perception of parameters of space are revealed. As a whole efficiency of operator activity by results of research was connected to the general level of abilities which was defined on the establishment of analysis of quality of operating by a graphic, dictionary and digital stuff.

Вступ. Важливе значення для оцінки ефективності діяльності людини відводиться рівню інтелектуального розвитку [4, 6]. Деякі дослідники вважають самостійним фактором здатність людини до навчання [3, 7].

Метою дійсного дослідження було визначення взаємозв'язків структури інтелекту з ефективністю операторської діяльності. З цією метою досліджувалася структура інтелекту в операторів теплових електростанцій. Ефективність операторської діяльності визначалася за оцінками експертів (середнім балом – СБ) під час проведення професійного тестування на повномасштабному тренажері пульту управління технологічними процесами теплових електростанцій.

Об'єкт і методи досліджень. У дослідженні як обстежувані брали участь оператори теплових електростанцій – 57 осіб чоловічої статі віком 22–40 років.

Визначення структури інтелекту проводилося за тестом Амтхауера [2], який складається з дев'яти субтестів. Час виконання кожного з них обмежений: I, II – 6 хв, III, VII – 7 хв, IV – 8 хв, V, VI – 10 хв, VIII – 9 хв, IX – 3 хв на запам'ятовування та 6 хв на відтворення. Загальний час виконання тесту – близько 1,5 год.

Перший субтест допомагав виявити здібності до логічного мислення, індукції, відчуття мови. Другий складався з визначення загальних рис певних понять і робив можливим установити здатність до абстрагування. Третій субтест – це визначення схожості, аналогії на вербальному матеріалі (тестувалися комбінаторні здібності). Четвертий – класифікація на вербальному матеріалі, тестувалася здатність до визначення загальних рис різних явищ (предметів). П'ятий – розрахунково-математичний. Шостий – установлення закономірностей, тестувалися індуктивні характеристики мислення. Сьомий – це вибір фігур, тестувалося просторове мислення в умовах геометричного комбінування на площині. Восьмий – задачі з кубиками, тестування просторового мислення. За допомогою дев'ятого субтесту тестувалася оперативна зорова пам'ять, об'єм і концентрація уваги.

Оцінка результатів тестування проводилася відповідно з ключами до окремих субтестів. За вірні відповіді зараховувався 1 бал (субтести I–III, V–IX), 1 або 2 бали (IV субтест). Рівень розвитку інтелекту визначався як сума оцінок за субтестами I–IX. Рівень розвитку вербального інтелекту – як сума оцінок за I–VI та IX субте-

© С. Федорчук, Т. Мірошнік, Ю. Садовська, Ю. Горго, 2006

стами. Рівень розвитку невербального інтелекту – як сума оцінок за VII і VIII субтестами.

Результати та їх обговорення. Отримані дані за субтестом 2–6, 8–9 склали вибірку, яка не підкоряється закону нормального розподілу (помилка першого роду $\alpha < 0,01$), а дані за субтестом 1, 7 і результати за показниками вербального інтелекту (VI), невербального інтелекту (HVI) та коефіцієнта інтелекту (KI) склали вибірку, що підкоряється закону нормального розподілу. Статистичну обробку даних проводили за допомогою методів непараметричної статистики.

За результатами виконання тесту Амтхауера визначався інтегральний показник інтелекту KI у балах. Цей показник відображав загальний рівень здібностей на основі аналізу якості оперування не тільки графічним матеріалом, але й словниковим і цифровим у поєднанні з різними засобами пред'явлення завдань (завдання "відкритого" та "закритого" типів). Тому показник KI визначав ефективність як вербального так і невербального мислення. Крім того, на відміну від широко застосовуваного тесту Айзенка, тест Амтхауера дозволяє визначати структуру інтелекту обстежених.

Для детальнішого аналізу результатів тестування нами було використано два додаткові показники – VI та HVI. Перший визначав інтелектуальні здібності при оперуванні інформацією у словниковій і цифровій формі подання. Другий було використано як критерій здатності пошуку взаємовідносин і закономірностей при оперуванні інформацією в невербальній формі подання.

Проведений кореляційний аналіз отриманих результатів (див. табл. 1) виявив вірогідний зв'язок показника ефективності операторської діяльності з інтегральним показником інтелекту KI ($r_s = 0,31$, $p < 0,05$), а також з показником вербального інтелекту VI ($r_s = 0,31$, $p < 0,05$) та з показником невербального інтелекту HVI ($r_s = 0,27$, $p < 0,05$). Це свідчить про взаємозв'язок ефективності операторської діяльності із загальним рівнем здібностей, що визначався на основі аналізу якості оперування графічним, словниковим і цифровим матеріалом.

Але показник VI та інтегральний показник KI, на відміну від показника HVI, корелювали з віком обстежених операторів (відповідно $r_s = 0,25$, $p < 0,05$ та $r_s = 0,22$, $p < 0,05$). Можливо це свідчить про те, що професійні здібності операторів більшою мірою були пов'язані з невербальним інтелектом. Крім того, вік обстежуваних був пов'язаний з кількістю балів за I та IV субтестами (відповідно $r_s = 0,30$, $p < 0,01$ та $r_s = 0,29$, $p < 0,01$).

Кореляційний аналіз отриманих результатів виявив достовірний взаємозв'язок СБ з показником здібностей до логічного мислення, індукції, відчуття мови (I субтест), показником розрахунково-математичних здібностей (V субтест), з кількістю балів, отриманих обстежуваними за VI субтестом (визначення закономірностей, індуктивні характеристики мислення) та за VIII субтестом (тестування просторового мислення).

Таблиця 1. Кореляційні зв'язки вимірюваних показників інтелекту із середнім балом у обстежуваних ($n = 57$)

Показники	Середній бал
Субтест 1 (логічне мислення)	0,39**
Субтест 5 (розрахунково-математичний)	0,38**
Субтест 6 (визначення закономірностей)	0,38**
Субтест 8 (просторове мислення)	0,31*
Показник вербального інтелекту (VI)	0,31*
Показник невербального інтелекту (HVI)	0,27*
Інтегральний показник інтелекту (KI)	0,31*

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Проведений кореляційний аналіз отриманих результатів не виявив вірогідного зв'язку показника ефективності операторської діяльності з кількістю отриманих балів за II, III, IV, VII і IX субтестами. Тобто ефективність операторської діяльності не була пов'язана з такими здібностями обстежених, як здатність до узагальнення, до абстрагування, до аналогії, комбінаторні здібності, здатність до класифікації. Крім того, за результатами проведених досліджень ефективність операторської діяльності не була пов'язана з оперативною зоровою пам'яттю обстежуваних, об'ємом і концентрацією уваги, що не у всьому узгоджується з результатами наших попередніх досліджень [5] і з літературними даними [1].

Висновки. Ефективність діяльності операторів теплових електростанцій була пов'язана із загальним рівнем здібностей, що визначався на основі аналізу якості оперування графічним, словниковим та цифровим матеріалом. Щодо структури інтелекту, виявлено взаємо-

зв'язки ефективності діяльності операторів із здібностями до логічного мислення, індуктивними характеристиками мислення, розрахунково-математичними здібностями, здатністю до визначення закономірностей та зі здібностями до просторового параметрування.

1. Макаренко Н.В. Психофизиологические функции человека и операторский труд. – К., 1991. 2. Садовська Ю.Я. Физиологические обоснования оздоровчої ефективності впливів рухів у формі ритмічної гімнастики. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 1999. 3. Стрелю Я. Роль темперамента в психическом развитии. – М., 1982. 4. Федорчук С., Чікіна Л., Богданов В., Горго Ю. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2003. – Вип. 40. – С. 83–85. 5. Федорчук С., Тараненко В., Горго Ю. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2004. – Вип. 43. – С. 71–72. 6. Чайченко Г.М. // Проблемы физиологии гипоталамуса. – 1992. – Вып. 26. – С. 24–30. 7. Vernon P.A. // Neurophysiology of individual differences. – 1985. – P. 125–150.

Надійшла до редколегії 27.09.05

УДК 591. 543. 43

О. Мартюшева, асп., В. Серебряков, д-р біол. наук

ВЕСНЯНА МІГРАЦІЯ БЕРЕГОВОЇ ЛАСТІВКИ (*RIPARIA RIPARIA* L.) В УКРАЇНІ ЗА ДАНИМИ ФЕНОЛОГІЧНИХ СПОСТЕРЕЖЕНЬ

Проаналізовано багаторічні дані стосовно строків початку весняної міграції берегової ластівки. Побудовано авіфенологічну карту прильоту берегової ластівки в Україну. Показано основні перелітні шляхи.

The long-term data of the beginning of Sand martin's spring arrival terms were analyzed. As a result the ornithophenological map of Sand martin's spring arrival to Ukraine was built. The main migration ways in Ukraine are shown.

Вступ. Берегова ластівка (*Riparia riparia* L.) є звичайним перелітним гніздовим птахом в Україні. Цей птах гніздиться колоніально, у норах, які робить зазвичай поблизу водойм в уривчастих берегах, схилах, насипах тощо. Тому завдяки високому ступеню оводненості нашої країни вид широко зустрічається по всій її території. Разом з тим, останнім часом спостерігається зниження чисельності берегової ластівки в більшості європейських країн, у тому числі й в Україні, що у великій мірі пояснюється посухами в областях зимівлі [3]. За допомогою кільцювання було з'ясовано, що берегові ластівки, які гнізяться в Україні, зимують у різних частинах тропічної та Східної Африки [4], тобто є дальніми мігрантами. Високі енергетичні потреби цих птахів вимагають постійного харчування, тому вони летять вдень і порівняно невисоко. Існують різні методи вивчення міграцій птахів, але лише шляхом авіфенологічного картування можна детально прослідкувати хід

та напрямки міграції на території окремих областей. Такі карти були складені нами для початку весняної міграції берегових ластівок в Україні.

Об'єкт і методи досліджень. Матеріалом для даної статті узяті спостереження, проведені в 1991–2005 рр. авторами та кореспондентською мережею кафедри зоології Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Також були використані й літературні дані за цей період [1]. Фенологічні карти будували шляхом проведення ізоліній (методом лінійної екстраполяції). У даному випадку ізолінії сполучають точки з однаковими строками появи ластівок весною. Вигини на карті (рис. 1) показують основні напрямки міграції та перелітні шляхи [2]. Ластівки, як і більшість мігруючих птахів, летять широким фронтом, але не суцільним, а певними перелітними шляхами, розташування яких визначається так званими екологічними руслами.

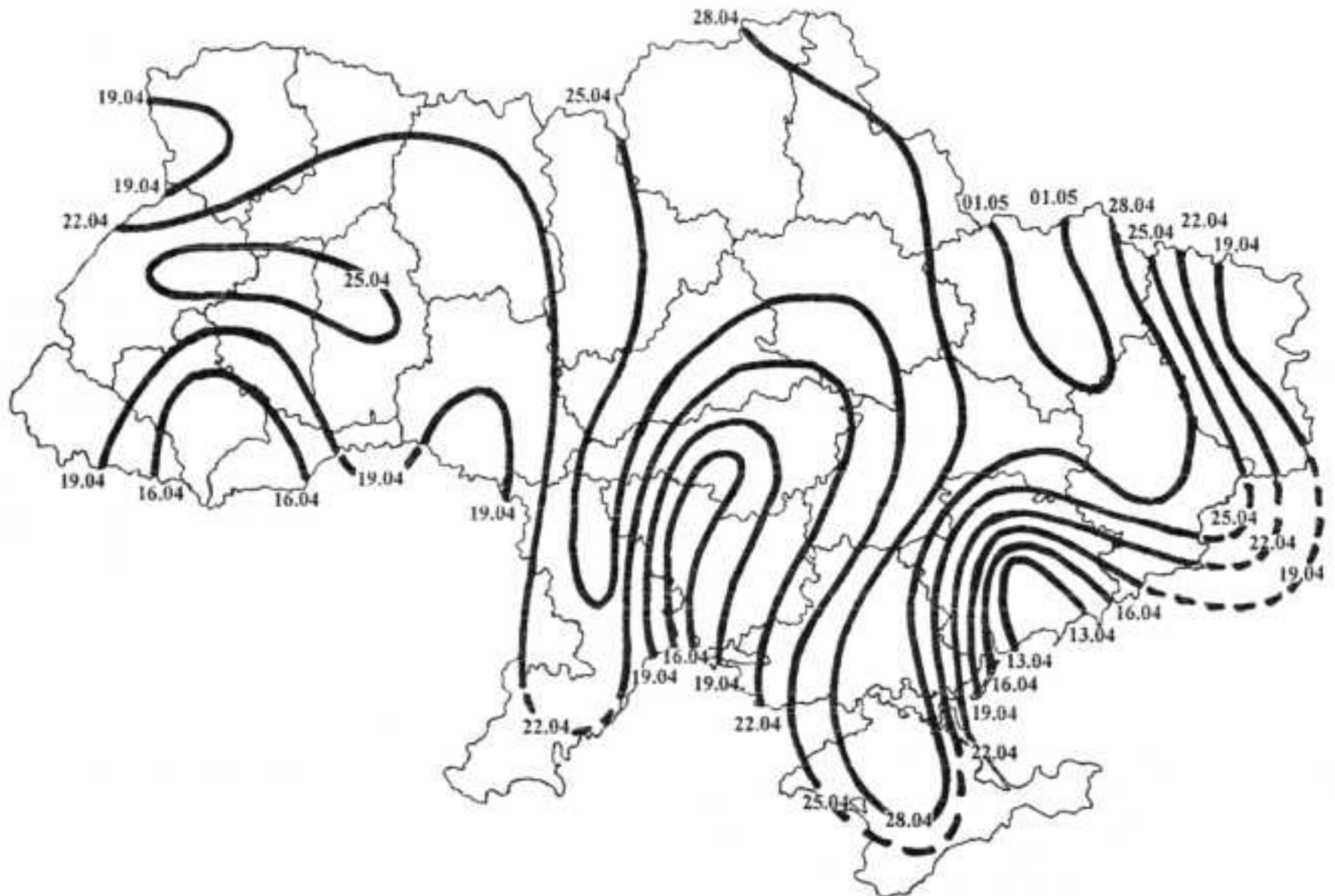


Рис. 1. Фенологічна карта весняного прильоту ластівки берегової на території України в 1991–2005 рр.:
— — ізофена прильоту; - - - — імовірна ізофена прильоту

Результати та їх обговорення. Весняна міграція ластівки берегової в Україні відбувається у квітні й травні. Середні строки прильоту цих птахів у більшості областей припадають на третю декаду квітня. Варіація (стандартне відхилення) строків прильоту в Україні в середньому становить $8,96 \pm 0,58$ днів. У різних областях вона коливається в межах від 3,79 до 16,50 днів.

Як видно з рис. 1, основний весняний міграційний шлях берегової ластівки починається в Миколаївській області та охоплює більшу частину території України. На території Хмельницької, Тернопільської та Львівської областей спостерігається запізнення прильоту, також пізно ластівки прилітають у Харківську область. У Запорізькій області приліт птахів спостерігається раніше, ніж будь де в Україні, створюючи таким чином окремий фронт прильоту на сході.

Висновки. Приліт берегових ластівок в Україну починається у третій декаді квітня. Міграція відбувається нерівномірно, в основному проходячи по перелітних шляхах. Отже, згідно з екологічними особливостями ластівок формуються три перелітні шляхи: основний – з південного заходу України, який розділяється на два потоки, другий – з південного сходу та третій – із заходу.

1. Белик В.П., Москаленко В.М. Фенологія весеннього прильоту птахів в Сумському Поліссі // Сезонні міграції птахів на території України. – К, 1992.
2. Серебряков В.В. // Вестн. зоол. – 1976. – № 6. – С. 75–78.
3. Birds in Europe: their conservation status // Mead C. Sand martin – Cambridge, U. K., 1994.
4. The Birds of the Western Palearctic / Ed. By S. Cramp. – Oxford, New York, 1988. – Vol. V.

Надійшла до редакції 08.10.05

УДК 615.076:615.355:615.099+576.3

О. Трохименко, канд. біол. наук, І. Дзюблик, д-р мед. наук,
Л. Коршун, асп., К. Білоткач, асп.

ЗАСТОСУВАННЯ РЕЗАЗУРИНУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ПОВЕРХНЕВОЗАЛЕЖНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН І ОЦІНКИ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Запропоновано об'єктивний, простий у виконанні метод визначення життєздатності культур клітин і оцінки цитотоксичності лікарських препаратів із застосуванням окисно-відновного індикатора резазурину.

We have suggested objective, idle time in performance a method of definition of viability of cell culture and ratings cytotoxicity medical products with use of the oxidation-reduction indicator resazurin.

Вступ. Одним з обов'язкових етапів доклінічного вивчення потенційних лікарських засобів (ЛЗ) є визначення їх цитотоксичності у культурі клітин. Проте до цього часу не існує уніфікованого методу оцінки цитотоксичності речовини у культурі клітин [2]. З цією метою застосовують різні методи, кожен з яких має свої переваги та недоліки. При виявленні цитотоксичності ЛЗ за дією на моношар клітин останні досліджують у світловому мікроскопі при малому збільшенні, виявляючи порушення цілісності клітинного моношару та появу осередків дегенерованих клітин. Цей метод простий у виконанні, але достатньо суб'єктивний. Тому вважають, що більш об'єктивним є визначення цитотоксичності речовини за пригніченням життєздатності клітин. При виконанні цього методу ЛЗ додається до культури клітин, що перебуває на початку логарифмічної фази росту. Обробка клітин препаратом триває протягом 24–72 год. Щодня визначають кількість життєздатних клітин у культурі, а через 3 дні обробки – концентрацію, в якій ЛЗ зменшує кількість життєздатних клітин на 50 % (CD_{50}) щодо контролю. Для визначення кількості життєздатних клітин моношар клітин обробляють розчином трипсину або Версена, знімаючи клітини з поверхні росту, фарбують мортальним (трипановий синій) або вітальним (нейтральний червоний) барвниками і підраховують кількість мертвих або живих клітин у гемоцитометрі. Суттєвим недоліком цього методу є його трудомісткість і можливість похибки при визначенні життєздатних клітин, оскільки вони можуть ушкоджуватись не лише під дією ЛЗ, а й унаслідок таких операцій, як обробка розчинами детергентів або ферментів (розчини Версену, трипсину) при знятті клітин з поверхні росту. Життєздатність клітин можна визначити і при використанні 3-(4-5-диметилтриазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду (MTT). При цьому клітини вирощують у мікро-

планшетах, через 72 год живильне середовище видаляють і вносять фізіологічний розчин з визначеним рН з МТТ, інкубують до появи блакитного кольору. Після цього розчин МТТ видаляють і в кожну лунку вносять ізопропанол. Визначають оптичну густину розчину в лунках мікропланшета при 570 нм. Концентрацію ЛЗ, при якій оптичну густину розчину зменшується на 50 % відносно контролю, беруть за CD_{50} . Проте, незважаючи на досить високу точність цього методу, значним його недоліком є використання такої дуже токсичної та екологічно-небезпечної речовини, як МТТ [2, 7]. Деякі препарати проявляють так звану приховану цитотоксичність, виявити яку неможливо при мікроскопії живих чи фіксованих клітин, оскільки це явище полягає у пригніченні синтезу ДНК клітин під впливом ЛЗ. Тому для визначення прихованої цитотоксичності застосовують метод включення радіоактивних ізотопів, найчастіше [метил- 3H]-тимідину, а потім установлюють радіоактивність препаратів з використанням сцинтиляційних лічильників і розраховують величину CD_{50} [6]. Очевидно, що недоліками описаного методу є використання радіоактивної сполуки й потреба у спеціалізованій лабораторії, спеціальному обладнанні та посуді.

В основу запропонованого нами методу покладено дані про можливість визначення кількості життєздатних клітин, що відновлюють індикатор резазурин, шляхом вимірювання оптичної густини культурального середовища, до якого цей індикатор додається. У США розроблено комерційні тест-системи, які містять указаний індикатор у буферному розчині (Alamar Blue™, CellTiter-Blue™) [5; 6; 8]. Проте ці тест-системи не зареєстровані в Україні й мають високу вартість, а тому не доступні для вітчизняних лабораторій.

Метою даного дослідження була розробка простого, ефективного, об'єктивного й доступного методу визна-

© О. Трохименко, І. Дзюблик, Л. Коршун, К. Білоткач, 2006

чення кількості життєздатних клітин у культурі, а також оцінки цитотоксичності ЛЗ у поверхневозалежних культурах клітин із застосуванням резазурину.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проводили в перещеплюваній поверхневозалежній культурі клітин фібробластів ембріону миші L-929, одержаній з банку клітинних культур ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького АМН України. Як середовище культивування при пасажуванні культури використовували ростове живильне середовище RPMI-1640 ("Фармбіотек", Україна) з додаванням 5 % сироватки крові ембріонів корів ("Perbio Science", Бельгія) та антибіотиків: 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину ("Київмедпрепарат", Україна). Клітини знімали з поверхні росту 0,02 % розчином Версена ("Біо-Тест-Лабораторія", Україна).

Визначення проліферативної активності L-929 та цитотоксичності ЛЗ проводили мікрометодом у 96-лункових культуральних мікропланшетах ("Sarstadt", Німеччина).

Оптичну густину зразків у лунках визначали на автоматичному зчитувальному спектрофотометрі Multiscan M-700 при довжинах хвилі 570 та 600 нм.

Резазурин (НВФ "Синбіас", Україна, ТУ 6-09-15-276) до кінцевої концентрації 0,006 % розчиняли у фосфатно-сольовому буфері з рН 7,25–7,35. Після повного розчинення речовин розчин стерилізували фільтруванням через шприцевий міліпоровий фільтр ("Sarstadt", Німеччина) з діаметром пор 20 мкм і розливали на аликвоти по 5 мл. Для запобігання руйнуванню резазурину, його розчин зберігали при температурі -40°C у захищеному від світла місці.

Для вивчення проліферативної активності культури клітин L-929 готували суспензію клітин у посівних концентраціях 0,25; 0,5 та $1 \cdot 10^6$ клітин в 1 мл ростового живильного середовища вказаного вище складу. Для визначення цитотоксичності ЛЗ готували суспензію клітин у посівній концентрації $0,5 \cdot 10^6$ клітин у 1 мл ростового живильного середовища. По 0,1 мл суспензії клітин вносили в кожен лунку (крім А1) культурального мікропланшета і культивували протягом 24 год при 37°C в атмосфері 5 % CO_2 . У лунку А1 вносили 0,1 мл ростового живильного середовища зазначеного складу (бланк-лунка).

З метою визначення діапазону тривалості інкубації клітин з резазурином, у межах якого зберігався лінійний характер залежності "оптична густина – тривалість інкубації" виконували наступні маніпуляції. Через 24, 48, 72 год культивування в кожен лунку мікропланшета та в бланк-лунку А1 додавали по 0,02 мл робочого розчину резазурину й перемішували вміст лунок, струшуючи планшет. Після цього щогодини вимірювали оптичну густину розчину в кожній лунці при довжині хвилі 570 нм і довжині референс-хвилі 600 нм на спектрофотометрі Multiscan M-700.

Паралельно визначали кількість живих клітин, підраховуючи їхню кількість у гематометрі. Для цього моношар клітин, вирощених за таких самих умов, обробляли розчином Версена, фарбували трипановим синім і підраховували кількість клітин у гематометрі за стандартною методикою [4].

Запропонований метод використовували для визначення цитотоксичності цис-дихлородіаміноплатини(II) (ДДП) ("Sigma", США) та його комплексної сполуки з поліаніоном ДНК полі(гексакис[хлороаміноакваплатина(II)]- μ -дезоксирибонуклеату (МКП), одержаної, як описано в роботі [3].

ДДП і МКП розчиняли в підтримуючому середовищі так, щоб кінцева концентрація досліджуваної речовини становила 2000 мкг/мл.

В окремому стерильному планшеті на 96 лунок готували серійні дворазові розведення досліджуваних препаратів з концентрацією 2000 мкг/мл від 2^{-1} до 2^{-10} , що відповідало концентраціям досліджуваних речовин від 1000 мкг/мл до 1,95 мкг/мл.

Після видалення ростового живильного середовища у відповідні лунки культурального планшета на клітинні моношари наносили розчини ДДП і МКП, використовуючи по чотири клітинні моношари на кожне розведення. Не менше чотирьох таких моношарів залишали для контролю клітин.

Культивування клітин у присутності зразків ДДП і МКП продовжували за тих самих умов ще 48 год. За 3 год до закінчення часу культивування клітинних моношарів з досліджуваними зразками в кожен лунку планшета вносили по 0,02 мл робочого розчину резазурину, злегка перемішували вміст лунок струшуванням планшета та інкубували протягом 3 год за тих самих умов. Після цього вимірювали оптичну густину, як описано вище. За величини CD_{50} вважали ті концентрації ДДП і МКП, що призводили до зниження рівня оптичної густини розчину в лунках на 50 % щодо контролю.

Результати та їх обговорення. Резазурин є окисно-відновним індикатором блакитного кольору, який відновлюється живими клітинами до резорурфіну, що має рожевий колір та іншу довжину хвилі абсорбційного максимуму. Так, абсорбційний максимум для резазурину дорівнює 605 нм, а абсорбційний максимум для резорурфіну – 573 нм. Тому при проведенні дослідження потрібно визначати оптичну густину при довжині хвилі 570 нм і використовувати 600 нм як референс довжину хвилі для нівелювання впливу резазурину, що не відновився. Вважають, що процес відновлення резазурину відбувається всередині живих клітин унаслідок дії кількох окисно-відновних ферментів, оскільки відновлена форма індикатора була знайдена в цитоплазмі та в ядрах живих і мертвих клітин [5; 6; 8].

Важливою умовою правильного виконання описуваного методу є визначення тривалості інкубації культури клітин з резазурином, у межах якого зберігається лінійний характер залежності оптичної густини від тривалості інкубації. У цьому випадку лінійний характер залежності дозволяє знехтувати тим, що клітини мають різну метаболічну активність. Відомо, що при роботі з поверхнево-залежними культурами клітин загальна кількість клітин на одиницю використовуваного об'єму середовища культивування залежить від площі для прикріплення і росту клітин. Нами було показано, що при дослідженні проліферативної активності L-929 у посівних концентраціях 0,25 і $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл, за умов їхнього культивування протягом 24–72 год, лінійний характер залежності зберігався до 5 год інкубації клітин з розчином резазурину. Разом з тим, при збільшенні посівної концентрації клітин до $1 \cdot 10^6$ кл/мл і тривалості їхнього культивування протягом 24–48 год, лінійний характер залежності оптичної густини середовища з додаванням резазурину від тривалості інкубації зберігався на протязі 4 год, а при 72-годинному культивуванні – до 3 год. Тому для стандартизації досліджень нами було обрано тривалість інкубації моношару клітин з резазурином протягом 3 год, оскільки в цей проміжок часу зберігався лінійний характер залежності для всіх застосовуваних посівних концентрацій клітин.

На рис. 1 зображено криві росту культури клітин L-929, побудовані при підрахунку клітин у гематитометрі (рис. 1, а) і при вимірюванні оптичної густини (рис. 1, б) при довжинах хвиль 570 нм і 600 нм після інкубації з розчином резазурину протягом 3 год. Показано, що в обох випадках спостерігаються однакові функціональні залежності – "кількість клітин – тривалість культивування" та "оптична густина – тривалість культивування".

Якщо порівняти приріст кількості клітин і збільшення оптичної густини на 72 години культивування у порівнянні з 24 годинами, то вони становили відповідно: 2,91 і 2,75 раза при посівній концентрації $0,25 \cdot 10^6$ кл/мл; 4,71 і 4,32 раза при посівній концентрації $0,5 \cdot 10^6$ кл/мл та 3,18

і 3,02 раза для посівної концентрації $1 \cdot 10^6$ кл/мл. Розбіжності дорівнювали 2,75; 8,02 і 2,59 % для тих самих посівних концентрацій, тобто були меншими за 10 %. Проте відомо, що при підрахунку клітин у гемоцитометрі відхилення кожної з варіант від їхнього значення загального середнього може досягати ± 20 % [1]. При вимірюванні оптичної густини на автоматичному зчитувальному спектрофотометрі відхилення кожної з варіант від загального середнього вкладалися в межі ± 5 %, що свідчить про вищу точність запропонованого методу.

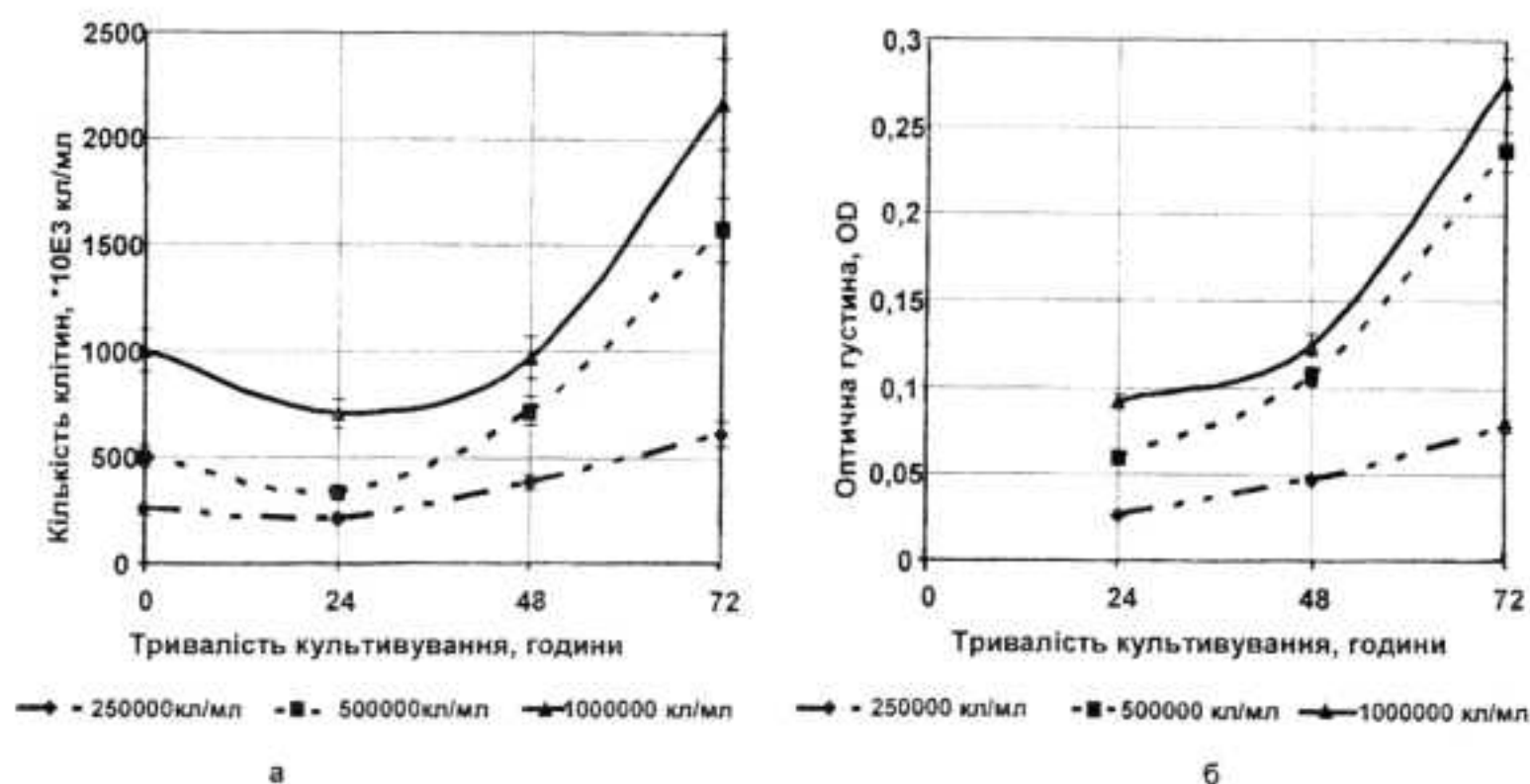


Рис. 1. Динаміка росту культури клітин L-929: залежність від посівної концентрації та тривалості культивування кількості клітин (а); оптичної густини (б)

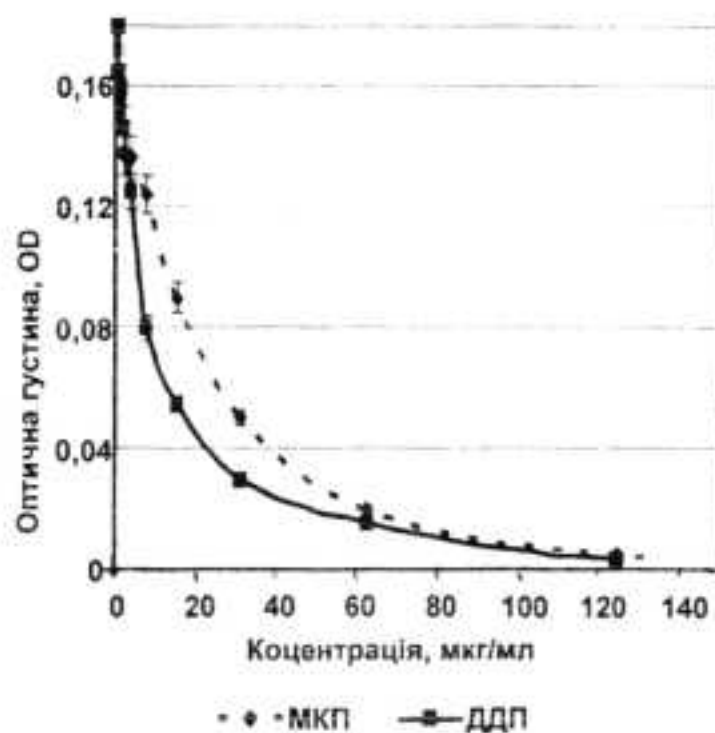


Рис. 2. Визначення CD_{50} для цис-дихлородіаміноплатини(II) (ДДП) та макромолекулярного комплексу платини з ДНК (МКП) за ступенем відновлення резазурину

Зважаючи на те, що як підрахунок кількості клітин у гемоцитометрі, так і вимірювання оптичної густини середовища культивування з розчином резазурину давали аналогічні результати, а також і на те, що відтворюваність результатів була вищою у випадку застосування оптичного методу, описаний метод був використаний нами для визначення цитотоксичності фармакологічних препаратів на прикладі протипухлинних хіміо-

препаратів цис-дихлородіаміноплатини(II) (ДДП) і макромолекулярного комплексу платини з ДНК (МКП) (рис. 2). Так, оптична густина середовища культивування з додаванням резазурину в лунках планшета з не обробленими культурами клітин була $0,188 \pm 0,009$ OD (контроль). Зменшення оптичної густини на 50 % (до 0,094 OD) при дослідженні цитотоксичності ДДП відповідало концентрації діючої речовини 6,5 мкг/мл,

що складало величину CD_{50} для ДДП. Аналогічно для МКП – CD_{50} дорівнювало 16,5 мкг/мл.

Висновки. Таким чином, запропонований нами метод визначення життєздатності культур клітин простий у виконанні, об'єктивний, має високу відтворюваність результатів, тому його можна рекомендувати для оцінки цитотоксичності лікарських засобів у культурах клітин на етапі доклінічного вивчення.

1. Бондаренко Т.П., Волкова Н.А., Савченко И.И. и др. // Лабораторная диагностика. – 2001. – № 4. – С. 44–46. 2. Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів: Методичні рекомендації, схвалені на засіданні Фармакологічного комітету МОЗ України. – К., 2000.

3. Волченкова И.И., Майданевич Н.Н., Бударин Л.И., Кейсевич Л.В., Трохименко Е.П., Шалимов С.А. Производные платины (II) с полианиондезоксирибонуклеиновой кислоты, способ их получения и лекарственный препарат противоопухолевого действия на их основе. EP 0374267 A1. Междунар. заявка PCT WO 89/11861, 14.12.89. 4. Посібник з медичної вірусології / За ред. В.М. Гіріна. – К., 1995. 5. CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay. Instructions for use of products G8080, G8081 and G8082. Promega Corporation // Technical Bulletin. – 2002. – № 31. 6. Fries R. de, Mistuhashi M. // J. Clin. Lab. Anal. – 1995. – Vol. 9. – P. 89–95. 7. Mosmann T. // J. of Immunological Methods. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63. 8. O'Brien J., Wilson I., Orton T. et al. // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267. – P. 5421–5426.

Надійшла до редколегії 04.02.06

УДК 578.81

О. Андрійчук, канд. біол. наук, Л.Семчук, канд. біол. наук,
С. Ромашев, пров. інж., Т. Ігнатенко, пров. інж.,

АНАЛІЗ ЧАСТОТИ РЕКОМБІНАЦІЙ ФАГІВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА ЇХНЯ РОЛЬ У ПРИРОДІ

Проведено виділення фагів із природи. Частина ізолятів після пасажів втратили свою біологічну активність. Досліджено рекомбінанти таких фагів до чотирьох культур (*P. syringae* pv. *tabaci* 8646, *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *P. alliiicola* 8494). Із випробуваних у 54 % варіантах виявлено літичну активність.

Isolation of phages from the environment has been carried out. After passages some of them has lost the biological activity. We investigated the recombinants of such phages to four cultures (*P. syringae* pv. *tabaci* 8646, *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *P. alliiicola* 8494). 54 % of them revealed lytic activity.

Вступ. Бактеріофаги є широко розповсюдженими та важливими агентами, що впливають на чисельність бактеріальної мікрофлори в екосистемі. Відповідно до своєї природи, фаги найефективніше виявляються в умовах високої щільності бактерій з активним метаболізмом. Однією з таких систем є фітоценози, які підтримують широку розмаїтість бактеріальних видів.

Асоціації фітопатогенних бактерій у певних екологічних нішах взаємопов'язані та перебувають у збалансованих умовах з бактеріофагами, які контролюють чисельність бактерій.

Виявляючи пластичність, фаги освоюють нових господарів, при цьому часто еволюція не обмежується рамками окремої систематичної групи [7]. Такі процеси зумовлені високою швидкістю репродукції фагів та, відповідно, великим числом генерацій, що приводить до значного зменшення популяції бактерії-хазяїна. Тому збереження генофонду популяцій фагів у природі має важливе еволюційне значення.

Спонтанні мутації та природний відбір сприяють виживанню тих популяцій, зміни в яких адекватні змінам навколишнього середовища [3]. При цьому виживання залежить від щільності господарів і фагів в екосистемі [10]. Широкий спектр літичної активності фагів, на перший погляд, сприяв би такому збереженню. На практиці часто вони є вузькоспецифічними, що зумовлює важливість розвитку інших механізмів їхнього збереження, зокрема рекомбінації [9].

Вірусна популяція взагалі та фагова зокрема практично завжди гетерогенна не тільки за широким діапазоном властивостей окремих віріонів, але й у тому розумінні, що популяція має у своєму складі дефектні часточки [8]. Дослідження бактеріофагів у лабораторних умовах проводять традиційно на чистих лініях фагів, які отримують методом пасажів і на певних штаммах бактерій. На наш погляд, важливою є задача встановлення особливостей поведінки фагів у природних системах. Такі системи є

багатофакторними та включають у себе широкий спектр нативних і дефектних фагів. Вони не обмежені окремими штамми бактерій, як у лабораторних умовах. Усе це зумовлює актуальність досліджень природних ізолятів та їхніх рекомбінантів для розуміння шляхів збереження популяцій і виникнення нових варіантів фагів як факторів обмеження чисельності фітопатогенних бактерій у природі. Зокрема, фаги бактерій *Pseudomonas* та *Xanthomonas* мають значну питому вагу серед збудників багатьох захворювань рослин і впливають на фітосанітарний стан природних екосистем.

Метою роботи було встановлення особливостей поведінки фагів у природних системах.

Об'єкт і методи досліджень. Виділення вірулентних і помірних ізолятів фагів проводили з бурякових фітоценозів України з відбором і аналізом великої кількості проб. Досліджувані фаги виділені або безпосередньо з проб, відібраних з рослин цукрового буряка, або шляхом індукції лізогенної мікрофлори висіяної з указанного агроценозу.

Використано дванадцять ізолятів фагів до відповідного штаму: 8494 *P. alliiicola*; 8494, 4013(в), 4013(д) *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*; 4013, 8653 *P. syringae* pv. *syringae* 8653; 8545 до *P. syringae* pv. *aptata* 8545; 185(1), 185(15) *P. syringae* pv. *aptata* 185; 8646 *P. syringae* pv. *tabaci* 8646; 8612 *P. clororophis* 8612; 8867 *P. viridiflava* 8867; 4228(10), 4228(15) *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4228.

Після виділення фагів проводили ряд послідовних пасажів. При цьому частина зразків втратила інфекційність після другого пасажу. У такому випадку ізоляти з першого пасажу використовували для досліджень з рекомбінації.

Для аналізу наявності біологічної активності інактивованих ізолятів використовували чотири бактеріальні культури (*P. syringae* pv. *tabaci* 8646, *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013,

© О. Андрійчук, Л.Семчук, С. Ромашев, Т. Ігнатенко, 2006

P. alliicola 8494). Використані бактерії отримані з музею фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології НАН України. Бактерії в лабораторії підтримували й розмножували на скошеному 1,5 %-му поживному м'ясному агарі. Інкубували їх у термостаті при температурі 25 °С. Виявлення фагів проводили методом двох шарового агару за Граціа за локальними зонами лізису на чутливих культурах [1].

Результати та їх обговорення. При виділенні з агроценозів частина фагів (41 %) після другого пасажу втрачали інфекційність. Такі фаги не виявляли біологіч-

ної активності до жодного з випробуваних штамів індикаторних бактерій.

У дослідженнях використовували чотири бактеріальні культури (*P. syringae* pv. *tabaci* 8646, *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *P. alliicola* 8494), для яких не було виділено із природи активних фагів.

Використовували комбінації фагів до кожної із чотирьох культур, указаних вище, що становило 84 варіанти (табл. 1).

Таблиця 1. Літична активність при змішаній інфекції на штамх *P. syringae* pv. *tabaci* 8646, *P. syringae* pv. *aptata* 8545, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* 4013, *P. alliicola* 8494 фагів, виділених із природи

Індикаторні культури	Загальна кількість використаних пар фагів при змішаній інфекції	Кількість виявлених літично-активних пар ізолятів фагів при змішаній інфекції	Пари ізолятів фагів, перевірених на біологічну активність
<i>P. alliicola</i> 8494	20	14	4013м+8545*• 4013м+8646*• 4013м+4228(15)*• 8653+4013м*• 8653+8545*• 8653+185(1)*• 4013м+185(15)*• 8653+185(15)*• 8653+8646*• 8653+4228(15)*• 4228(15)+185(1)*• 228(15)+185(15)*• 8494+4013м*• 8653+4013м*• 8612+4013м*• 4228(10)+4013м*• 8612+8653*• 4228(10)+8653*• 8612+4228(15)*• 8545+4228(15)*•
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> 8646	29	16	8494+8867*• 4013м+185(1)*• 4013м+8867*• 8653+185(1)*• 8653+8846*• 4228(15)+8867*• 4228(15)+185(1)*• 4228(15)+8646*• 8494+8646*• 4013м+8646*• 8653+8646*• 8653+4013м*• 8653+4228(15)*• 185(15)+4013м*• 4228(15)+8646*• 8494+4013м*• 8653+8494*• 185(1)+8494*• 8612+8494*• 8494+4228(10)*• 8494+4228(15)*• 8653+4013м*• 8612+4013м*• 4228(10)+4013м*• 8612+8653*• 4228(10)+8653*• 8612+4228(15)*• 8545+4228(15)*• 4013м+4228(15)*•
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4013	20	12	8653+185(1)*• 8653+8646*• 8653+8867*• 4228(15)+8653*• 4228(15)+185(1)*• 4228(15)+8867*• 4228(15)+8646*• 4228(15)+4228(10)*• 8545+4013м*• 185(15)+4013м*• 8494+4013м*• 8653+8494*• 185(1)+8494*• 8612+8494*• 8494+4228(10)*• 8494+4228(15)*• 8612+8653*• 4228(10)+8653*• 8612+4228(15)*• 8545+4228(15)*•
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> 8545	16	4	4013м+8646*• 8653+8646*• 185(15)+8646*• 4228(15)+8646*• 8494+4013м*• 8653+8494*• 185(1)+8494*• 8612+8494*• 8494+4228(10)*• 8494+4228(15)*• 8653+4013м*• 8612+4013м*• 4228(10)+4013м*• 8612+8653*• 4228(10)+8653*• 8612+4228(15)*• 4013м+4228(15)*•
Усього	85 (100 %)	46 (54 %)	

* Пари ізолятів, які виявили літичну активність при змішаній інфекції.

Як видно з табл. 1, після змішаної інфекції на відповідній бактеріальній культурі біологічну активність для інактивованих фагів виявлено в 46 випадках, що становить 54 %. Таку "пластичність" фагів з утраченою літичною здатністю можна розглядати як певний механізм швидкої адаптації популяцій фагів до нових умов виживання [4]. Очевидно, у досліджуваних випадках спостерігається сайт-специфічна рекомбінація [2].

У результаті генетичної рекомбінації утворюються нові форми фагів. В деяких випадках вони виявляли літичну здатність до раніш не чутливих бактерій. Втрата біологічної активності могла бути зумовлена їхньою дефектністю, викликаною в непермісивних умовах репродукції, або вони підлягали впливу системи рестрикції – модифікації клітин бактерій [5, 6]. Аналогічні процеси в природі можуть приводити до загибелі популяцій фагів.

У результаті рекомбінації отримано "нові" літичноактивні фаги. Очевидно геноми таких фагів можуть бути утворені "мозаїкою" двох або більше вихідних батьківських форм. При цьому в природі такі процеси при змішаній інфекції не обмежені парою фагів чи окремими штамми бактерій. А встановлені показники можуть бути вищі у разі участі в таких процесах широкого кола бактерій.

Висновки. Отримані результати закладають основу тривалих досліджень по вивченню поширення окремих представників вірусів мікроорганізмів у природі, установленню їхніх взаємозв'язків у біоценозах. Це дозволить розробити моделі, які пояснюють вплив фагів на збудників епіфітотій рослин у природі. Використання фагів на практиці відкриває перспективи попередження таких процесів шляхом штучного внесення антагоністів фітопатогенної мікрофлори.

1. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961. 2. Айала Ф., Дж. Кайгер. Современная генетика : В 3 т. – М., 1988. – Т. 2. 3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М., 1976. 4. Семчук Л.І., Ігнатенко Т.О., Ромашев С.А. та ін. // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – Вип. 38. – 2002. – С. 54–56. 5. Семчук Л.І., Степанова О.А., Бойко А.Л. та ін. // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2003. – № 41. – С. 160–162. 6. Токач Ф.И. // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 1. –

С. 82–88. 7. Цилинский Я.Я. Популяционная структура и эволюция вирусов. – М., 1988. 8. Garro A. J., Martur J. // J. Cell Physiol 76. – 1970. – P. 253–263. 9. Levin B.R. & Lenski R.E. Coevolution. Sunderland, Massachusetts, 1983. 10. Marsh H., Toth I.K., Wellington E.M.H // Mikrobiol. Ecol. (ISME-6). – 1992. – Abstr. – P. 215.

Надійшла до редколегії 21.07.05

УДК 616.9. 578. 828 :578. 891

Н. Бабій, асп., О. Молчанець, канд. біол. наук,
А. Щербінська, д-р мед. наук

РЕПЛІКАТИВНА АКТИВНІСТЬ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ 1 ТИПУ В ОСІБ, КОІНФІКОВАНИХ ВІРУСНИМ ГЕПАТИТОМ С

Досліджено реплікативну активність ВІЛ-1 за показниками вірусного навантаження в плазмі крові ВІЛ/ВГС-коінфікованих пацієнтів залежно від рівня реплікації та генотипної приналежності ВГС. Не встановлено прямий зв'язок між показниками вірусного навантаження ВІЛ-1 і ВГС в досліджуваних зразках плазми.

Results of replicate activity of HIV-1 research by levels of viral load in samples of plasma of HIV/HCV-infected patients in relation to the level of replication and genotype of HCV are represented here. A relationship between levels of viral loads HIV-1 and HCV in investigated samples of plasma have been not established.

Вступ. Однією з особливостей інфекційного процесу при ВІЛ-інфекції є маніфестація інфекцій вірусного генезу, які характеризуються тривалою персистенцією збудника в організмі та є причиною смерті майже 80 % хворих на СНІД [5].

Дослідження, проведені в Інституті епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України, показали, що у ВІЛ-інфікованих споживачів ін'єкційних наркотиків провідну роль серед вірусних інфекцій відіграють вірусні гепатити: у 79,9 % шприцевих наркоманів виявлено маркери вірусного гепатиту С, у 64,6 % – маркери вірусного гепатиту В [3].

Патогенез вірусного гепатиту С, як і ВІЛ-інфекції, безпосередньо пов'язаний з імунопатологічними процесами в організмі людини, зумовленими впливом вірусів. Обидва віруси мають ефективні механізми захисту від дії факторів імунітету, а саме: резистентність до цитокінів, високу мінливість, яка не дозволяє імунній системі ефективно виявляти та знешкоджувати антигени цих збудників та ін. [2].

Коінфекція ВІЛ/ВГС в організмі людини характеризується взаємопотенціюючою дією вірусів: високі темпи прогресування ВІЛ-інфекції корелюють з більш високим ризиком розвитку цирозу печінки й гепатоцелюлярної карциноми [7]. Причини швидкого ураження печінки у пацієнтів з коінфекцією ВІЛ/ВГС до кінця не з'ясовані. Показано, що ВІЛ може сприяти компартменталізації та проліферації віруссpezifічних Т-лімфоцитів у печінці хворих на хронічний гепатит С, що призводить до погіршення стану хворих [6].

Вивчення клінічного перебігу коінфекції ВІЛ/ВГС показало, що в більшості хворих відсутні симптоми продромального періоду вірусного гепатиту. Гепатит С протікає в безжовтяничній та інапарантній формах, що дозволяє припустити розвиток первинно-хронічного гепатиту на фоні імунологічного мовчання. У той же час, за наявності ВГС у ВІЛ-позитивних осіб нерідко спостерігається більш тяжкий перебіг ВІЛ-інфекції. Вірогідно, вірус гепатиту С може діяти як основний кофактор прогресу ВІЛ-інфекції, і лікування хронічного гепатиту С у таких хворих може опосередковано покращувати їхній стан [8].

Порівняльний аналіз біологічних властивостей ізолятів ВІЛ-1 показав, що віруси, які були виділені від ВІЛ-

позитивних пацієнтів із хронічним гепатитом С, мають вищу цитотидну та інфекційну активність у порівнянні з вірусами, отриманими від серонегативних до ВГС ВІЛ-інфікованих осіб [1].

З огляду на це, метою дослідження було вивчення реплікативної активності ВІЛ-1 за рівнем вірусного навантаження (ВН) у плазмі крові ВІЛ/ВГС-коінфікованих осіб, що мають маркери реплікативної активності вірусу гепатиту С.

Об'єкт і методи досліджень. Було отримано 20 зразків плазми від ВІЛ-інфікованих осіб у I клінічній стадії захворювання (за класифікацією ВООЗ) [4], в яких у анамнезі були імунологічні маркери вірусного гепатиту С (ВГС), на момент обстеження клінічних проявів гепатиту не було.

Для виявлення реплікативно активних форм ВГС у плазмі крові ВІЛ-інфікованих використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Постановку ПЛР здійснювали за стандартними методиками на тест-системах "АмплиСенс" (Росія), відповідно до інструкцій виробника. Детекцію ампліконів проводили методом електрофорезу у 2 %-му агарозному гелі з бромистим етидієм в УФ-світлі при довжині хвилі 302 нм.

Визначення вірусного навантаження ВІЛ-1 у плазмі крові ВІЛ-інфікованих осіб проводили за стандартною методикою. Дослідження здійснювали на тест-системі AMPLICOR HIV-1 MONITOR™ Test, version 1.5 ("Roche", США).

Кількісне визначення РНК вірусу гепатиту С у плазмі крові виконували за стандартною методикою на тест-системі "АмплиСенс HCV Монитор" (Росія). Генотипування ВГС здійснювали на тест-системі "АмплиСенс" (Росія) відповідно до інструкцій виробника.

Результати та їх обговорення. Зразки плазми, отримані від ВІЛ/ВГС-коінфікованих осіб, були досліджені на наявність генетичного матеріалу вірусу гепатиту С. На основі результатів ПЛР серед 20 зразків виявлено 8, де було визначено присутність РНК ВГС. Тобто 40 % пацієнтів мали інфекційно-активну форму вірусного гепатиту С без клінічних проявів.

Наступним етапом роботи було визначення рівня вірусного навантаження ВІЛ-1 у відібраних зразках плазми. За результатами ПЛР-аналізу досліджувані зразки плазми були поділені на дві групи: I – з високим рівнем

реплікації ВІЛ-1, де кількість РНК-копій перевищувала 5×10^4 в 1 мл. (3 зразки), II – з низьким рівнем – менше 5×10^4 копій/мл (4 зразки) (табл. 1). Найвищий показник

вірусного навантаження ВІЛ-1 становив $7,1 \times 10^4$ РНК-копій ВІЛ-1/мл плазми, найменший – $1,1 \times 10^4$ копій/мл.

Таблиця 1. Результати визначення вірусного навантаження ВІЛ-1 у зразках плазми, отриманих від осіб з коінфекцією ВГС

№ групи	№ зразка	Вірусне навантаження ВІЛ-1, РНК-копій в 1мл плазми	Рівень вірусного навантаження ВІЛ, log 10
I група	1	$7,1 \times 10^4$	4,85
	2	$6,2 \times 10^4$	4,79
	3	$5,8 \times 10^4$	4,76
II група	4	$4,8 \times 10^4$	4,68
	5	$3,5 \times 10^4$	4,54
	6	$2,8 \times 10^4$	4,45
	7	$2,5 \times 10^4$	4,40
	8	$1,1 \times 10^4$	4,04

У подальшому було проведено кількісне визначення РНК вірусу гепатиту С у відібраних зразках плазми. За результатами ПЛР-аналізу в усіх зразках відмічався досить високий рівень концентрації РНК ВГС. (табл. 2). Значення показників вірусного навантаження коливались у межах від $3,2 \times 10^5$ РНК-копій/мл до $3,3 \times 10^4$ РНК-копій/мл. Слід зазначити, що показники ВН ВГС у першій групі зразків були значно вищими, ніж у другій групі. Так, у зразку №1 з найбільшим вірусним навантаженням ВІЛ-1 було виявлено найвищу концентрацію РНК ВГС. Найменше вірусне навантаження ВГС визначено в зразку плазми № 8, де кількість РНК-копій ВІЛ-1 була також найнижчою.

Високі показники вірусного навантаження ВГС у плазмі ВІЛ/ВГС-коінфікованих пацієнтів, ймовірно,

пов'язані з недостатністю імунної відповіді внаслідок її пригнічення сумісною дією обох вірусів.

Як відомо, у пацієнтів, інфікованих ВГС, що належить до генотипу 1b, хронічний гепатит має більш агресивний перебіг. Тому доцільно було провести дослідження щодо можливої кореляції між показниками вірусного навантаження ВГС та ВІЛ-1 і генотипною приналежністю ВГС у вибраних зразках плазми. У зв'язку з цим, на наступному етапі було проведено генотипування ВГС на тест-системі, яка дозволяє визначити його належність до одного з чотирьох найрозповсюдженіших генотипів – 1a, 1b, 2, 3a. Для 4-х із 8 досліджуваних зразків був встановлений генотип 1b, для 3-х – генотип 3a і для 1-го – генотип 2 (табл. 2).

Таблиця 2. Результати кількісного визначення РНК і генотипування вірусу гепатиту С у плазмі крові

№ групи	№ зразка	Вірусне навантаження ВГС, РНК-копій у 1 мл плазми	Генотип ВГС
I	1	$3,2 \times 10^5$	1b
	2	$2,8 \times 10^5$	2
	3	$9,1 \times 10^4$	1b
II	4	$7,3 \times 10^4$	3a
	5	$7,8 \times 10^4$	1b
	6	$5,7 \times 10^4$	1b
	7	$5,9 \times 10^4$	3a
	8	$3,3 \times 10^4$	3a

Обидві групи зразків були неоднорідні за генотипною приналежністю ВГС, однак у першій групі зразків переважно виявлявся генотип 1b, а в другій – 3a. Превалювання генотипів 1b і 3a ВГС та їхні співвідношення в досліджуваних зразках практично збігається з результатами інших досліджень, які охоплювали більш чисельні групи пацієнтів [3].

На основі отриманих нами результатів досліджень для вибраної групи пацієнтів достовірної різниці між показниками рівня вірусного навантаження ВІЛ-1 у ВІЛ/ВГС-коінфікованих пацієнтів залежно від генотипу ВГС не було виявлено (різниця індексів lg 10 ВН не перевищувала 0,81). Можна припустити, що існує кореляція між рівнями реплікативної активності обох вірусів, оскільки найвищий показник вірусного навантаження ВГС був визначений у зразку крові пацієнта з найбільшим вмістом РНК ВІЛ-1 порівняно із зразком крові, де був зареєстрований низький рівень вірусного навантаження ВІЛ-1. Зв'язок між цими двома величинами скоріше за все не прямий, а опосередкований станом імунної системи пацієнта, зокрема рівнем CD4-клітин. Так, у

літературі зустрічаються дані про корелятивний зв'язок між активністю апоптозу Т-лімфоцитів і кількістю РНК-копій ВГС у плазмі ВІЛ/ВГС-коінфікованих пацієнтів [9].

Висновки. Дослідження реплікативної активності ВІЛ-1 у ВІЛ/ВГС-коінфікованих пацієнтів показало, що найвищий рівень вірусного навантаження ВІЛ-1 спостерігався у пацієнтів з високою концентрацією РНК ВГС у плазмі крові. Достовірної різниці між показниками вірусного навантаження ВІЛ-1 у пацієнтів залежно від генотипу ВГС не встановлено, але для підтвердження відсутності певного кореляційного зв'язку між цими ознаками необхідно провести дослідження серед більшої кількості пацієнтів.

Виявлено, що в досліджуваній групі пацієнтів інфекційно-активна форма вірусного гепатиту С (при високих показниках рівня РНК ВГС) проходила безсимптомно. Отримані дані підтверджують необхідність проведення діагностичних досліджень на ВГС у хворих на ВІЛ-інфекцію з метою своєчасної терапії безманіфестних форм вірусного гепатиту С.

1. Антоненко С.В., Барбашева О.В., Мурашко О.В., Щербинська А.М. Структурно-функціональні зміни в генетичному апараті лімфоїдних клітин при змішаній (ВІЛ/ВГС) інфекції // Матеріали 2-ї Міжнарод. конф. "Біоресурси та віруси", Київ, 7-10 верес. 1998 р. – К., 1998. 2. Волянський Ю.Л., Телелінова Л.Г. // Червона стрічка. – 2000. – № 2. – С. 25-27. 3. Люльчук М.Г. Характеристика епідемічного процесу ВІЛ-інфекції в Україні в залежності від шляху інфікування: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 2005. 4. Посібник з хіміотерапії вірусних інфекцій / За ред. І.В. Дзюблик. – К., 2004. 5. Щербинская А.М., Вовк А.Д., Антоняк С.Н. // Русс. журн. ВИЧ/СПИД и родств. проблемы. – 1999. – Т. 3, № 1. – С. 126-127. 6. Aggrati C., Poccia F., Narciso P. T Cell activation by HIV infection may contribute to intrahepatic V1 compartmentalization and progression of hepatitis C independently of HAART // 8th Conference of

Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, february 4-8, 2001. – Chicago, 2001. – P. 212. 7. Berggren R., Jain M., Hester J. et al. Negative hepatitis antibody is associated with low CD4 cellcounts in HIV/HCV-coinfected patient // 8th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, february 4-8, 2001. – Chicago, 2001. – P. 212. 8. Martin J., Lopez M., Arrantz R. et al. Impact of hepatitis C in HIV-infected individuals in an Urban Center in Madrid, Spain // 8th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, february 4-8, 2001. – Chicago, 2001. – P. 215. 9. Nunez M., Benito J.M., Lopez M. et al. XV International AIDS Conference, Bangkok 11-16 July, 2004. – Bangkok, 2004.

Надійшла до редакції 04.10.05

УДК 576.8

О. Радченко, канд. біол. наук, Л. Степура, канд. техн. наук,
В. Собко, студ.

ДЕЯКІ ЗАКОНОМІРНОСТІ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Показано, що адгезія *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 на чистій поверхні залежала від часу експозиції та зростала з $2,4 \cdot 10^6$ до $6,7 \cdot 10^6$ кл/см² протягом 5-60 хв. Для поверхні, яка була попередньо оброблена МПБ, час експозиції практично не впливає на кількість адгезованих клітин. Кількість інокульованих клітин впливала на формування біоплівки лише протягом перших 24 год.

It was shown, that adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 cells on the clean surface depended of the exposure time and increased from $2,4 \cdot 10^6$ до $6,7 \cdot 10^6$ cells/cm² during 5-60 minutes. Exposure time was not influenced on the number of adhesive cells for the surface treated with Nutrient Broth. The quantity of inoculated cells influenced on the biofilm formation only during first 24 hours.

Вступ. Деякі мікроорганізми при контакті з твердим субстратом здатні формувати біоплівки. Сформована біоплівка – це комплекс мікробних клітин і екстрацелюлярного матриксу, якому властива чітка архітектура будови, що забезпечує оптимальні умови живлення, росту й обміну генетичним матеріалом [4]. Прикладів біоплівок у природі чимало. Це поверхні каміння і окремих твердих часток у водному середовищі, частки ґрунту та осади, листя й коріння, епітелій рубця тварин, поверхні медичних інструментів, корпуси кораблів, свай морських або річкових споруд, внутрішня поверхня ферментерів тощо. З одного боку, мікроорганізми, що утворили біоплівку на поверхнях, широко використовуються в біотехнологічних процесах – очищенні стічних вод, синтезі біологічно активних речовин, у харчовій промисловості. Біоплівки з нормальної мікрофлори захищають епітелій слизових оболонок і поверхні шкіри макроорганізму від патогенних бактерій. З іншого боку, наявність біоплівок прискорює процеси корозії металу та бетону, сприяє карієсу зубів, утруднює дезінфекцію промислового обладнання та медичного інструментарію. Фізіологічна активність біоплівок досить висока, бо кількість мікроорганізмів на 1 см² поверхні принаймні у 200 разів вища, ніж у 1 см³ рідини, яка оточує цю поверхню. Цілком зрозуміло, що біоплівки мають для людини важливе практичне значення як позитивне, так і негативне [2].

Формування біоплівки відбувається у кілька етапів: модифікація поверхні, первинна (зворотна) адгезія мікробних клітин, вторинна (незворотна) адгезія мікробних клітин, утворення глікокаліксу, підселення вторинних колонізаторів [3]. Адгезія мікроорганізмів до субстрату – це складний, комплексний процес, кінцевий результат якого залежить від багатьох чинників: структури й фізико-хімічних властивостей поверхні (гідрофобності, полярності, заряду, наявності полімерів), гідродинамічних характеристик потоку рідини, що омиває тверду повер-

хню, фізико-хімічних властивостей водного середовища (рН, концентрації поживних речовин, іонної сили, температури), властивостей мікробних клітин (наявності війок і джгутиків, рухливості, заряду, здатності синтезувати екзополісахариди) [1].

Метою даної роботи було вивчити вплив чистоти поверхні та кількості інокулюма на формування біоплівки культурою *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961.

Об'єкти й методи дослідження. Дослідження проводилися на культурі *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961. Як посівний матеріал використовували добуву культуру, що виросла на МПА. Густину суспензії у стерильному поживному МПБ визначали за допомогою КФК-2-УХЛ-42 при λ 540 нм у кюветі 5,068. Для вивчення динаміки формування біоплівки готували суспензії клітин з густиною 0,02; 0,13 та 0,18 одиниць. Кількісну характеристику біоплівки визначали за допомогою мікротитраційного методу з барвником кристалічним фіолетовим [5]. Суспензію клітин по 200 мкл вносили в лунки стерильної 96-лункової планшети для імуноферментного аналізу й культивували 48 год при 32 °С, замінюючи вміст лунок свіжим середовищем через кожні 4 год. Результати враховували кожні 4 год. Для цього з частини лунок видаляли культуральну рідину з планктонними клітинами, їх двічі промивали стерильною дистильованою водою і заповнювали 200 мкл 0,3 %-го водного розчину кристалічного фіолетового. Барвник витримували протягом 5 хв при 20 °С, після чого його видаляли з лунок, які 4 рази промивали дистильованою водою і вносили по 150 мкл 96 %-го етанолу. Спирт витримували 5 хв, періодично перемішуючи вміст лунок круговими рухами планшети. Інтенсивність забарвлення етанолу кристалічним фіолетовим, яка залежить від кількості клітин у біоплівці, визначали колориметрично на приладі "Диагност". Контролями були чистий етанол і розчин барвника в етанолі в лунці з МПБ без клітин. Кожне вимірювання виконували по три рази.

Вплив чистоти поверхні на швидкість адгезії *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 вивчали наступним чином. Відмиті у хромовій суміші предметні скельця занурювали в суспензію клітин (оптична густина 0,13 одиниць) добової культури у стерильному фізіологічному розчині, що виросла на МПА. Скельця витримували в суспензії 5, 10, 20, 30 та 60 хв при 20 °С. Рідину зі скельця струшували, скельця сушили на повітрі, фіксували жаром і фарбували водним розчином фуксину протягом 2 хв. Підраховували кількість клітин у 30 квадратах окуляра-мікрометра. Площа 1 квадрата сітки окуляр-мікрометра при об'єктиві х100 становила 100 мкм². Для визначення кількості клітин в 1 см² середню кількість клітин в 1 квадраті множили на 10⁶. Для визначення впливу білкового забруднення на швидкість адгезії клітин, скельця попередньо витримували у МПБ протягом 30 хв (не промивали, не сушили). Результати підрахунків обробляли статистично.

Результати та їх обговорення. Було показано, що доза інокулюма *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 впливає на швидкість формування біоплівки лише протягом перших 24 год культивування (рис. 1).

Так, на 16-ту годину культивування інтенсивність забарвлення розчину кристалічного фіолетового в лунках, які були засіяні найменшою кількістю клітин (суспензія з

оптичною густиною 0,02) становила 0,06; у лунках, засіяних суспензією з оптичною густиною 0,13 була 0,09; у лунках, які були засіяні найбільшою кількістю клітин (суспензія з оптичною густиною 0,18) дорівнювала 0,1. Аналогічна тенденція спостерігалася й на 24-ту годину культивування. Протягом наступної доби в лунках з вихідною суспензією клітин 0,13 і 0,18 приросту біоплівки практично не відбувалося, а з суспензією 0,02 біоплівка продовжувала збільшуватися до 0,16 одиниць.

Отримані результати свідчать про те, що для остаточного формування біоплівки кількість клітин, які контактують з поверхнею, істотного значення не має.

При вивченні динаміки адгезії клітин *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 на склі було показано, що чистота поверхні має суттєве значення для цього процесу (рис. 2).

Так, на чистому склі через 5 хв контакту адгезувалося, кл/см²: $(2,38 \pm 0,28) \times 10^6$, через 10 хв – $(3,32 \pm 0,25) \times 10^6$, через 30 хв – $(4,19 \pm 0,36) \times 10^6$, а через 60 хв – $(6,68 \pm 0,5) \times 10^6$. Тобто за цих умов час експозиції суттєво впливав на кількість адгезованих клітин. На скельцях, які попередньо оброблялися МПБ і містили білкове забруднення, уже після 5 хв контакту з біомасою адгезувалося $(5,18 \pm 0,29) \times 10^6$ кл/см² і подальша експозиція суттєво не впливала на кількість адгезованих клітин

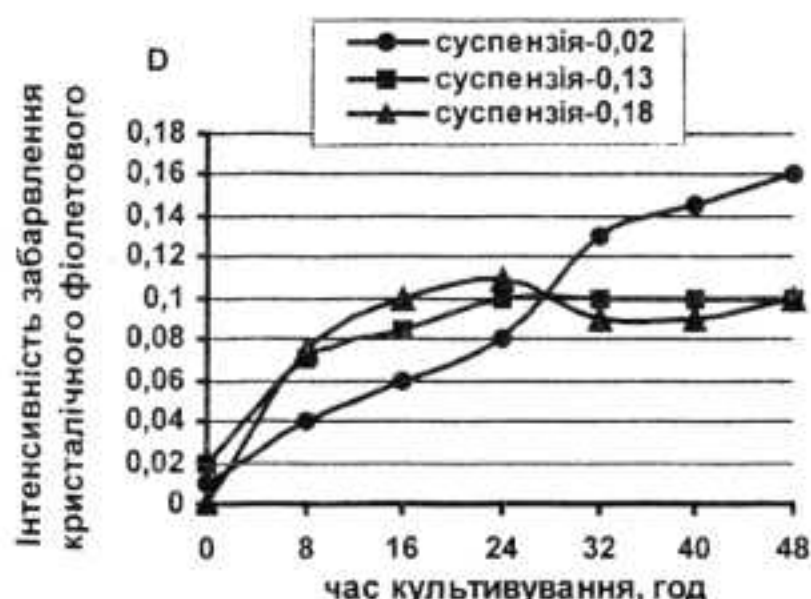


Рис. 1. Динаміка формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 при різних дозах інокулюма

Висновки. У результаті проведеної роботи було показано, що *Pseudomonas aeruginosa* CCM Ac-1961 легко утворювала біоплівку на склі та пластмасі. Кількість клітин, що адгезувалися на чистій поверхні залежала від часу експозиції і зростала з $2,4 \cdot 10^6$ до $6,7 \cdot 10^6$ кл/см² протягом 5–60 хв експозиції. Для поверхні, яка була попередньо оброблена МПБ, час експозиції практично не впливав на кількість адгезованих клітин. Протягом 5–60 хв експозиції їхня кількість зросла лише з $5,2 \cdot 10^6$ до $6,7 \cdot 10^6$ кл/см². Так само не мала суттєвого значення на формування біоплівки й кількість інокульованих клі-

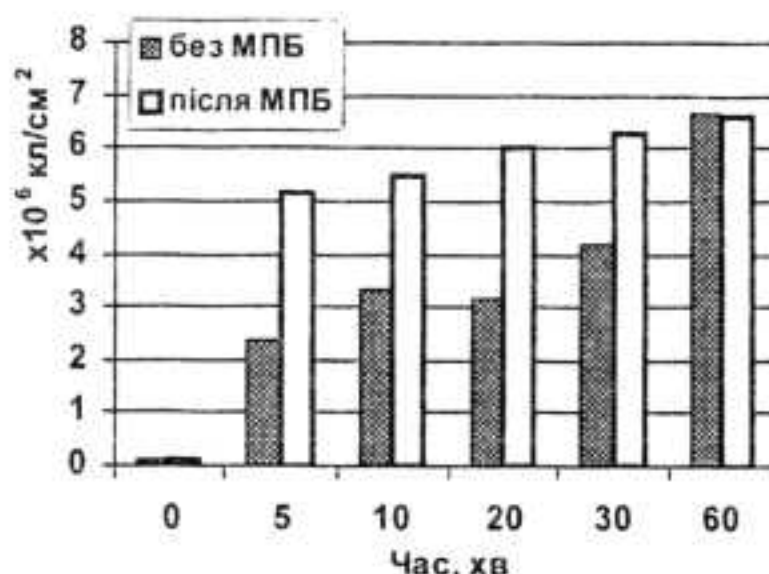


Рис. 2. Адгезія клітин *Pseudomonas aeruginosa* CMM 1961 на склі з попередньою обробкою поверхні й без неї

тин: незалежно від густини інокулюма через 24 год рости щільність біоплівки була практично однаковою.

1. Corpe W.A. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. – New York, 1980.
2. Costerton J.W. // J. Ind. Microbiol. – 1995. – Vol. 15. – P. 137–140.
3. Davey M.E., O'toole G.A. // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2000. – Vol. 64, № 4. – P. 847–867.
4. Hausner M., Wuertz S. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – P. 3710–3713.
5. Pitts B., Hamilton M.A., Zelter N., Stewart P.S. // Journal of Microbiological Methods. – 2003. – Vol. 54. – P. 269–276.

Надійшла до редакції 17.10.05

УДК 612.43; 591.147, 611.018.591.8, 612.017 1:57.052

О. Горелікова, асп., М. Держинський, д-р біол. наук,
А. Пустовалов, канд. біол. наук, І. Тормасов, студ.

ЗВ'ЯЗОК ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЕПІФІЗА В ІМУНІЗОВАНИХ ПТАХІВ

Вивчено взаємодії щитоподібної залози та епіфіза під впливом розвитку імунної реакції на птахів *Gallus domesticus* 5-тижневого віку було встановлено, що імунізація призводить до активації щитоподібної залози нестатевозрілих птахів, пік функціональної активності якої припадає на 7-му добу після імунізації; мелатонін не здійснює безпосереднього впливу на щитоподібну залозу, проте може підвищувати її чутливість до активуючих впливів факторів імунної системи.

The scientific research is dedicated to the interaction of thyroid and epiphysis affected by immune reaction development in 5-weeks old birds *Gallus domesticus*. We came to the conclusion that immunization led to the activation of the thyroid gland of non-pubescent birds. The peak of the thyroid functional activity took place on the 7-th day after the immunization had been done. Melatonin did not affect the thyroid directly, but it enhanced the sensibility of the thyroid gland toward activated effects of the immune system factors.

Вступ. Проблема взаємовпливу й взаємоузгодження функцій ендокринної, нервової та імунної систем є одним із пріоритетних питань сучасної науки.

Відомо, що щитоподібна залоза, яка є життєво важливим органом, стимулює всі види обміну речовин в організмі: білковий, вуглеводний, енергетичний, водний, мінеральний [3]. Тироксин і трийодтиронін стимулюють метаморфоз у тварин, контролюють ріст і розвиток усіх тканин і органів, підсилюють окиснювальні процеси й теплопродукцію в тканинах, впливають на функціональний стан нервової системи, серця, статевих залоз та інших органів [1, с. 24–30, 57–63]. Увагу багатьох дослідників прикуто до проблеми регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-ендокринного комплексу тварин насамперед завдяки появі нових методів дослідження, які відкривають широкі можливості для вивчення, а надалі – і впливу на механізми, що регулюють ендокринні процеси в організмі тварин і людини [2; 4; 5, с. 635–656; 8]. Гормони щитоподібної залози активують усі ланцюги імунної системи: клітинний, гуморальний імунітет, NK і К-клітини, систему моноцитів-макрофагів. Узагалі, при гіпофункції щитоподібної залози спостерігається зниження активності імунної системи [6].

Метою дослідження було вивчення взаємодії щитоподібної залози та епіфіза під впливом розвитку імунної реакції.

Об'єкт і методи дослідження. Стан щитоподібної залози вивчали на 192 самцях *Gallus domesticus* 5-тижневого

віку, які характеризуються функціонально зрілим гіпоталамо-тироїдним комплексом [2].

Птахи були розділені на 3 серії по 64 тварини: 1) контроль; 2) мелатонін – серія, якій протягом 1 тижня вводили мелатонін; 3) седуксен – серія, якій протягом 1 тижня вводили антагоніст мелатоніна седуксен. Через тиждень по 32 тварини в кожній серії піддавали імунізації еритроцитами людини. Розвиток реакції щитоподібної залози в часі розглядали, вивчаючи по 8 представників кожної групи на 1, 3, 7 та 9 добу після імунізації. Відбір органів проводили у термін, який відповідав середині темної фази для тварин.

Для аналізу одержаних результатів були використані класична гістологічна методика та сучасна морфометрична і статистична обробка. У щитоподібній залозі визначали висоту секреторного епітелію та зовнішній діаметр фолікулів, а в епіфізі досліджували діаметр ядер пінеалоцитів. Фактичний матеріал оброблений статистично за критерієм Стюдента за допомогою програми Statistica 5.0.

Результати та їх обговорення. Діаметр ядер пінеалоцитів епіфіза. На 7-му добу в імунованих тварин спостерігається достовірне збільшення діаметра ядер пінеалоцитів, що вказує на підвищення синтетичної активності епіфіза. Це збігається з даними літератури про розвиток імунної реакції [7]. Як показали наші дослідження (табл. 1), явище активації епіфізу зберігається на тлі введення як мелатоніну, так і седуксену.

Таблиця 1. Результати морфометричних вимірювань

Вимірюваний параметр	Група/час після імунізації	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба	9-та доба
Діаметр ядер пінеалоцитів, мкм	Контроль	5,53 ± 0,07	4,39 ± 0,09	4,43 ± 0,09	5,80 ± 0,16
	Мелатонін	5,66 ± 0,14	4,92 ± 0,08*	5,32 ± 0,09	6,53 ± 0,15*
	Седуксен	4,33 ± 0,09*	6,10 ± 0,11*	6,12 ± 0,08*	6,76 ± 0,13*
	Контроль + імунізація	5,30 ± 0,12	5,57 ± 0,13	9,17 ± 0,22*	6,74 ± 0,14*
	Мелатонін + імунізація	5,51 ± 0,12	5,25 ± 0,10*	9,28 ± 0,21*	6,04 ± 0,15*
	Седуксен + імунізація	4,77 ± 0,13*	4,27 ± 0,08*	8,17 ± 0,23*	4,95 ± 0,13*
Висота секреторного епітелію щитоподібної залози, мкм	Контроль	5,70 ± 0,15	6,01 ± 0,12	5,39 ± 0,11	5,07 ± 0,10
	Мелатонін	5,71 ± 0,14	5,89 ± 0,13	5,35 ± 0,10	5,31 ± 0,11
	Седуксен	5,57 ± 0,15	5,45 ± 0,11*	5,13 ± 0,10	4,91 ± 0,11
	Контроль + імунізація	5,47 ± 0,11	5,86 ± 0,15	8,18 ± 0,19*	7,29 ± 0,17*
	Мелатонін + імунізація	5,79 ± 0,12	6,10 ± 0,16	8,12 ± 0,22*	7,27 ± 0,16*
	Седуксен + імунізація	5,35 ± 0,12	5,49 ± 0,13*	5,83 ± 0,15*	6,42 ± 0,17*
Внутрішній діаметр фолікулів, мкм	Контроль	21,24 ± 0,94	19,69 ± 0,74	23,99 ± 0,83*	23,37 ± 1,05
	Мелатонін	22,44 ± 0,72	21,55 ± 0,74	23,59 ± 0,80	22,17 ± 0,71
	Седуксен	20,98 ± 0,68	20,34 ± 0,63	22,40 ± 0,79	21,07 ± 0,59
	Контроль + імунізація	21,78 ± 0,84	26,15 ± 0,95*	27,03 ± 0,87*	25,70 ± 0,77*
	Мелатонін + імунізація	26,68 ± 0,90*	26,68 ± 0,96*	25,20 ± 0,79*	26,89 ± 0,88*
	Седуксен + імунізація	23,09 ± 0,78	25,29 ± 0,65*	21,46 ± 0,73	23,03 ± 0,58

* Достовірні відмінності від контрольної групи 1-ї доби

Висота секреторного епітелію щитоподібної залози. Для визначення активності щитоподібної залози було використано такі параметри, як висота секреторного епітелію та внутрішній діаметр фолікулів. Серед птахів контрольної серії, а також при введенні мелатоніну або седуксену не спостерігається достовірних змін протягом експерименту. До того ж мелатонінова та седуксенова групи не демонструють достовірних відмінностей від контролю. Імунізація викликала збільшення досліджуваного параметра на 7-му добу і меншою мірою на 9-ту добу. Уведення мелатоніну суттєво не змінює вплив імунізації. Проте введення седуксену значною мірою зменшує вплив імунізації. При цьому пік реакції спостерігається лише на 9-ту добу й не досягає значень, властивих для попередніх груп (контроль+імунізація та мелатонін+імунізація) (табл. 1).

Внутрішній діаметр фолікулів. Аналогічних змін зазнає і такий параметр, як внутрішній діаметр фолікулів. Імунізація та імунізація з введенням мелатоніну викликає максимальну реакцію на 7-му добу. Уведення седуксену гальмує вплив імунізації. Відмітимо, що під дією мелатоніну розвиток реакції щитоподібної залози помітний уже на 1-шу добу й досягає максимуму на 7-му та 9-ту добу (табл. 1).

Підсумовуючи результати наших досліджень можна запропонувати таку модель взаємодії імунної системи, епіфізу та щитоподібної залози у нестатевозрілих самців *Gallus domesticus*.

Імунна система має безпосередню активуючу дію на щитоподібну залозу, проте цей вплив вимагає наявності певного рівня синтезу мелатоніну в епіфізі, який під час імунної відповіді забезпечується активуючим впливом на епіфіз з боку імунної системи. Можли-

вий механізм дії мелатоніну в цьому випадку полягає у збільшенні чутливості щитоподібної залози до факторів імунної системи.

Уведення екзогенного мелатоніну принципово не змінює картину, однак дещо прискорює процес активації щитоподібної залози.

Уведення антагоніста мелатоніну седуксену значною мірою запобігає активуючому впливу імунної системи на щитоподібну залозу.

Висновки. Імунізація призводить до активації щитоподібної залози нестатевозрілих птахів, пік функціональної активності якої припадає на 7-му добу після імунізації.

Мелатонін безпосередньо не діє на щитоподібну залозу, проте може підвищувати її чутливість до активуючих впливів факторів імунної системи.

1. Балаболкин М.И. Эндокринология. – М., 1998.
2. Дзержинський М.Е. Нейроендокринна регуляція сезонного циклу розмноження птахів. – К., 1996.
3. Држевецкая И.А. Основы физиологии обмена веществ в эндокринной системе. – М., 1994.
4. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. – СПб., 2001.
5. Чипенс Г.И. Иммунофизиология / Под ред. Е.А. Корнева. – СПб., 1993.
6. Markowska M., Bialecka B., Ciechanowska M. et al. // Neuroendocrinology letters. – 2000. – Vol. 21 – P. 367–373.
7. Markowska M., Waloch M., Skwarlo-Sonta K. // J. Pineal. Res. – 2001. – Vol. 30, № 4 – P. 220–226.
8. Pierpaoli W., Regelson W. Cud melatoniny. – Lodz, 1996.

Надійшла до редколегії 13.09.05

УДК 579.695

О. Радченко, канд. біол. наук, Л. Степура, канд. техн. наук,
В. Войціцький, д-р біол. наук

РОЗПОВСЮДЖЕННЯ У ҐРУНТАХ АНТАРКТИДИ МІКРООРГАНІЗМІВ, РЕЗИСТЕНТНИХ ДО ГІАМІНУ ТА АНТИБІОТИКІВ

Показано, що у зразках ґрунтів Антарктиди міститься велика кількість (3,8–6,8 lg КУО/г ґрунту) бактерій, резистентних до гіаміну 1622 в концентрації 75 мг/л. Виділені штами виявляли також мультирезистентність до 6–9 антибіотиків.

It was shown that samples of soil from Antarctica contained 3,8– 6,8 lg CFU/g bacteria wich were resistant to 75 ppm xenobiotic Hyamine 1622. Isolated strains also were multidrug resistant to 6–9 antibiotics.

Вступ. Формування у мікроорганізмів резистентності до антибіотиків і пов'язані з цим ускладнення при лікуванні багатьох інфекційних хвороб є сьогодні надзвичайно актуальною проблемою [7]. Більшість мультирезистентних штамів виділяються при обстеженні хворих людей до і після лікування антибіотиками [8].

Появу та розповсюдження у мікроорганізмів антибіотикорезистентності пояснюють трьома факторами: масштабним промисловим виробництвом цих речовин, широким застосуванням їх у медичній практиці та перенесенням генетичної інформації між мікроорганізмами. Перші два фактори сприяють появі антибіотикорезистентних штамів, а останній – розповсюдженню цієї ознаки в природі [5; 9].

До речовин, які мають виражену антимікробну дію, крім антибіотиків належить і більшість синтетичних хімічних сполук – ксенобіотиків. Нашими попередніми роботами [2; 3] було показано, що, незважаючи на відсутність виробництва та широкого застосування четвертинної амонійної сполуки гіаміну, у ґрунтах України час-

то зустрічаються мікроорганізми, резистентні до цього ксенобіотика.

Метою даної роботи було дослідити ґрунти екологічно чистого регіону Землі Антарктиди на наявність у них мікроорганізмів, резистентних до гіаміну.

Об'єкти й методи дослідження. Зразки ґрунтів відбирали в Антарктиді біля Української антарктичної станції на острові Галіндез. У них визначали загальну кількість гетеротрофних мезофільних мікроорганізмів за загальноприйнятим методом і частку мікроорганізмів, резистентних до четвертинної амонійної сполуки – гіаміну 1622 (бензалконіум хлорид). Для цього зразки ґрунту висівали на картопляний агар без ксенобіотика та з гіаміном у концентрації 75 мг/л і культивували при 28 °С [2]. Усі типи колоній, що виростили в присутності ксенобіотика, реізолювали, мікроскопіювали та визначали їхню чутливість до антибіотиків диск-дифузійним методом на середовищі АГВ. У роботі використовували такі антибіотики: β-лактами – меропенем, азтреонам, ампіцилін, оксацилін; аміноглікозиди –

гентаміцин, стрептоміцин, канаміцин, амікацин; макроліди – еритроміцин; циклічні – поліміксин; ароматичні – левоміцетин; тетрацикліни – тетрациклін; лінкозаміни – лінкоміцин; нітрофурани – фурагін; протигрибкові антибіотики – амфотерицин В і флуконазол.

Результати та їх обговорення. Зразки ґрунтів, відібраних в Антарктиді містили 4,55–7,8 lg КУО/г гетеротрофних мезофільних бактерій. Серед них більшість (рис. 1) виявилися резистентними до гіаміну 1622 у концентрації 75 мг/л. Чотири зразка (17, 19, 30, 33) практично повністю склалися з резистентних до гіаміну клітин. У 10 зразках кількість резистентних бактерій становила 3,8–6,8 lg КУО/г ґрунту. Лише один зразок ґрунту з 15 досліджених не містив резистентних клітин. Якщо врахувати той факт, що Антарктида є екологічно чистою зоною Землі, то присутність у її ґрунтах такої вели-

кої кількості бактерій, резистентних до ксенобіотика, видається дуже цікавою. Зазначимо, що у ґрунтах України, які постійно відчувають на собі антропогенний тиск у вигляді контамінації пестицидами, мінеральними добривами, важкими металами, радіонуклідами, продуктами хімічного синтезу, кількість резистентних до гіаміну 1622 клітин при концентрації ксенобіотика 75 мг/л коливалася від 4 до 5,5 lg КУО/г ґрунту при загальній кількості гетеротрофних бактерій 6,5–8,5 lgКУО/г, а в зразках, відібраних у заповідниках Криму та Прикарпаття – резистентні клітини були відсутні [3].

28 резистентних до гіаміну ізолятів, були представлені, в основному, грамнегативними паличками різної довжини, що не утворювали спори. 15 з них були перевірені на чутливість до антибіотиків. Одержані результати наведено в табл. 1.

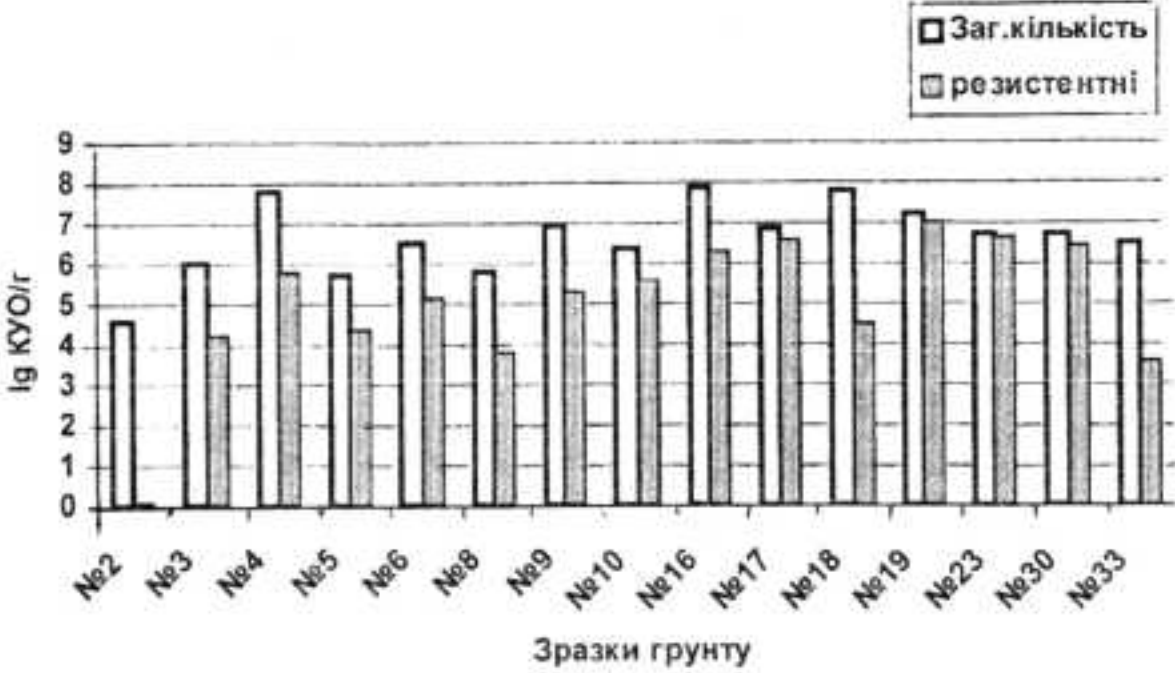


Рис. 1. Розповсюдження бактерій, резистентних до гіаміну 1622, у ґрунтах Антарктиди

Таблиця 1. Чутливість до антибіотиків штамів, виділених із ґрунтів Антарктиди

Антибіотики	Чутливі штами		Слабкочутливі		Резистентні	
	кількість	%	кількість	%	кількість	%
Меропенем	14	93,3	0	0	1	6,7
Азтреонам	9	60	2	13,3	4	26,7
Ампіцилін	2	14,3	0	0	12	85,7
Оксацилін	1	6,7	0	0	14	93,3
Гентаміцин	15	100	0	0	0	0
Стрептоміцин	3	50	2	33,3	1	16,7
Канаміцин	7	87,5	0	0	1	12,5
Амікацин	14	93,3	1	6,7	0	0
Еритроміцин	3	20	1	6,7	11	73,3
Поліміксин	11	78,6	1	7,1	2	14,3
Левоміцетин	9	60	4	26,7	2	13,3
Тетрациклін	15	100	0	0	0	0
Лінкоміцин	4	26,7	2	13,3	9	60
Фурагін	2	13,4	5	33,3	8	53,3
Амфотерицин В	2	14,3	0	0	12	85,7
Флуконазол	2	14,3	1	7,1	11	78,6

Як видно з табл. 1, стійкі до гіаміну 1622 штами виявляли досить високу резистентність і до деяких антибіотиків. Так, до ампіциліну нечутливими було 85,7 % штамів, до оксациліну – 93,5, до еритроміцину – 73,3, до фурагіну 53,3, до лінкоміцину – 60 %. Стрептоміцин інгібував зростання лише 50 % виділених штамів, а 33,3 % з них були слабкочутливими до цього антибіотика. Левоміцетин сильно впливав на 60 % штамів, а 26,7 % були слабкочутливими до нього. Що стосується амфотерицину В та флуконазолу, то їхню слабку дію на ізоляти можна пояснити тим, що це є антифунгальні антибіотики.

Серед виділених 15 штамів деякі виявляли мультирезистентність: так, штам 2А був нечутливим до дев'яти антибіотиків, штам 23Д – до восьми, а штами 19В, 10В, 9Е – до семи антибіотиків і 5 штамів (4А, 8Д, 10В, 17А, 19С) – до шести антибіотиків.

Кореляція між резистентністю бактерій до ксено- та антибіотиків загальновідома. Механізми формування резистентності до них часто бувають схожими [7, 8]. У літературі також є дані про виділення антибіотикорезистентних штамів з екологічно чистих регіонів. Так, згідно з Торрес [9] мікрофлора кишечника риб, тюленів

і пінгвінів, що мешкають в екологічно чистому регіоні Землі, а саме біля антарктичної станції Мак Мердо, була високочутливою до тетрацикліну, стрептоміцину, пеніциліну G, нітрофурантіону, полідіксової кислоти канаміцину, гентаміцину, хлорамфеніколу, цефалотину та ампіциліну. Залишається нез'ясованою причина появи бактерій, резистентних до ксенобіотиків і мультирезистентних до антибіотиків у ґрунтах Антарктиди.

Висновки. Показано, що у ґрунтах Антарктиди міститься значна кількість бактерій, резистентних до четвертинної амонійної сполуки гіаміну 1622 у концентрації 75 мг/л, які характеризуються мультирезистентністю до 6–9 антибіотиків.

УДК 579.61

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВОСИНТЕЗОВАНИХ ГЕТЕРОБІМЕТАЛЕВИХ Cu/M ($M = Zn, Cd$) КОМПЛЕКСІВ З ЕТИЛЕНДІАМІНОМ

Продemonстровано бактерицидну та фунгіцидну активність новосинтезованих гетеробіметалічних Cu/M ($M = Zn, Cd$) комплексів з етилендіаміном перспективних для створення нових протимікробних препаратів.

Present paper demonstrates an investigation of bactericidal and fungicidal activities of the heterobimetallic Cu/M ($M = Zn, Cd$) complexes with ethylenediamine, which are perspective for the creation of the antimicrobial preparations.

Вступ. Інфекційні захворювання є постійними супутниками людини протягом усього періоду її існування. Незважаючи на сучасні засоби гігієни та величезний арсенал новітніх протимікробних засобів [1] кількість захворювань бактеріальної етіології зростає в геометричній прогресії. Так, за даними МОЗ України, протягом 2003 р. в Україні зареєстровано близько 10 млн випадків інфекційних захворювань, що на 9 % більше порівняно з 2002 р. [2]. Причин такому явищу досить багато – це й незадовільний стан екології і, як наслідок, зниження реактивності імунної системи, неконтрольоване використання антибіотиків, надзвичайна пластичність і мінливість патогенної та умовно-патогенної мікробіоти тощо [3; 4]. Усе це призводить до того, що зростає агресивність захворювань, які, здавалося б, були переможені. Розширення спектра хімотерапевтичних препаратів також рано чи пізно призводить до зменшення їхньої ефективності. Тому актуальним завданням є дослідження синтетичних органічних хімічних речовин, до яких повільно формується стійкість патогенної мікробіоти та наявність протимікробної активності.

Об'єкт і матеріали досліджень. Об'єктом досліджень були координаційні сполуки, синтезовані на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка: PO 39 – $[Cu(en)_2ZnCl_4] \cdot dmsO$; PO 172 – $[Cu(en)_2ZnCl_4] \cdot dmf$; PO 80 – $[Cu(en)_2Zn(CH_3COO)_4]$; PO 252 – $[Cu(en)_2CdBr_4] \cdot dmsO$; PO 244 – $[Cu(en)_2][Cd_2(CH_3COO)_6]$ де en – етилендіаміном, dmsO – диметилсульфоксид, dmf – диметилформамід.

Досліджували їхню бактерицидну та фунгіцидну активність до ряду тест-культур. Як тест-культури використовували: *Staphylococcus aureus* Wood 46, *S. aureus* 2593, *S. aureus* 209, *S. aureus* 6538, *Escherichia coli* RP 4, *E. coli* K12 W, *E. coli* UKM 028, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* (клінічно виділений), *Salmonella abony*, *S. derby*, *S. typhi*,

1. Карасевич Ю.Н. Экспериментальная адаптация микроорганизмов. – М., 1982. 2. Радченко О.С., Степура Л.Г., Фуртат І. М., Михальський Л.О. // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2004. – Вип. 9. – С. 50–52. 3. Радченко О.С., Степура Л.Г., Фуртат І. М., Михальський Л.О. // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. "Біологія". – 2001. – № 10. – С. 143–145. 4. Aono Rikizo, Kobayashi M., Nakajima H. et al. // Bios., Biotechnol. – 1995. – Vol. 59, № 2. – P. 213–218. 5. Burger S.J., Burke J.P. // Am. J. Infec. Control. – 1994. – Vol. 22, № 4. – P. 193–194. 6. Howington J., Kelly B., Smith J.J. et al. // Antart. J. US. – 1993. – Vol. 28, № 5. – P. 119–120. 7. Mazel D., Davies J. Antibiotics, present and future / Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of 8-th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society of Microbial Ecology. – Halifax, Canada, 2000. 8. Rasaily R., Dutta P., Saha M.R. // Eur. J. Epidemiol. – 1994. – Vol. 10, № 1. – P. 41–46. 9. Torres M.A. // Bios (USA). – 1994. – Vol. 65, № 4. – P. 215–218.

Надійшла до редколегії 17.10.05

Н. Яворська, інж. III кат., Т. Фурзікова, канд. біол. наук,
О. Нестерова, канд. хім. наук, В. Позур, д-р біол. наук,

S. typhimurium, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* 885, *C. albicans* тест, *C. albicans* 690, *C. albicans* 1518. Культури люб'язно надані інститутом мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, а також запозичені з музею лабораторії мікробіологічних та імунологічних проблем біотехнології Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) зазначених сполук визначали методом двократних послідовних розведень [5; 6] на рідкому поживному бульйоні. Добову культуру мікроорганізмів вносили з розрахунку 10^7 КУО/мл. Через 24 год ураховували, що МІК відповідає концентрації речовини в останній прозорій пробірці.

Для більш точного визначення МІК і встановлення того має досліджувана сполука бактериостатичну чи бактерицидну дію здійснювали висів з рідкого середовища з речовиною на щільне середовище без неї.

Результати та їх обговорення. Однією з причин, через які виникають труднощі в лікуванні інфекційних захворювань, є змішаний (вірусно-бактеріальний) характер їхнього походження. У клінічній практиці майже не існує препаратів, які з однаковим успіхом застосовувалися б як при бактеріальних, так і вірусних захворюваннях. Оскільки було показано, що новосинтезовані гетеробіметалеві сполуки мають виражений протівірусний ефект [7], є доцільним перевірити їхні антибактеріальні та фунгіцидні властивості.

При визначенні впливу новосинтезованих металовмісних хімічних сполук на бактерії родів *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* і грибів роду *Candida* встановлено, що найбільший бактерицидний і фунгіцидний вплив здійснюють комплекси Cu/Cd (PO 252 і PO 244). Причому, серед цих сполук більш активним є комплекс PO 244 (МІК 0,02–1,25 мг/мл), до складу якого входить ацетатна група (табл. 1).

Таблиця 1. Мінімальні інгібуючі концентрації (мг/мл) гетеробіметалевих Cu/M (M = Zn, Cd) комплексів з етилендіаміном

Тест-культури	Досліджувані речовини				
	252	244	39	80	172
<i>Staphylococcus aureus</i> Wood 46	0,08	0,02	0,08	0,08	0,08
<i>S. aureus</i> 25923	0,02	0,02	0,08	0,08	0,08
<i>S. aureus</i> 209	0,04	0,04	0,08	0,08	0,08
<i>S. aureus</i> 6538	0,04	0,04	0,16	0,16	0,16
<i>Escherichia coli</i> RP 4	0,63	0,32	0,63	0,32	0,32
<i>E. coli</i> K12 W	0,63	0,32	0,63	0,32	0,32
<i>E. coli</i> UKM 028	0,16	0,08	0,16	0,16	0,16
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,16	0,04	0,16	0,08	0,04
<i>E. coli</i> (клін. вид)	0,63	0,16	0,32	0,63	0,63
<i>Salmonella abony</i>	1,25	0,63	0,32	0,32	0,63
<i>Salmonella derby</i>	1,25	0,63	1,25	0,63	1,25
<i>Salmonella typhi</i> 11	0,32	0,16	0,32	0,32	0,32
<i>Salmonella typhimurium</i>	1,25	0,63	0,63	0,32	0,63
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,04	0,04	0,16	0,16	0,16
<i>Proteus vulgaris</i>	1,25	1,25	–	–	1,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,5	1,25	–	2,5	–
<i>Candida albicans</i> 885	0,63	0,16	0,63	1,25	2,5
<i>Candida</i> test	0,63	0,16	2,5	2,5	2,5
<i>Candida albicans</i> 690	0,16	0,08	2,5	0,63	0,32
<i>Candida albicans</i> 1518	0,16	0,16	2,5	2,5	2,5

Що стосується сполук Cu/Zn, то вони також виявляли бактерицидний і фунгіцидний вплив на досліджувані тест-культури, але їхні мінімальні інгібуючі концентрації були дещо вищі (0,08–2,5 мг/мл).

Аналізуючи чутливість різних родів мікроорганізмів до зазначених сполук встановлено, що найчутливішими були бактерії виду *Staphylococcus aureus*. Серед чотирьох досліджених штамів суттєвих відмінностей у МІК виявлено не було. Так, МІК комплексів Cu/Cd становила від 0,02 до 0,04 мг/мл, а комплексів Cu/Zn – від 0,08 до 0,16 мг/мл.

Незначні відмінності спостерігались при визначенні мінімальних інгібуючих концентрацій до різних штамів *E. coli*, серед яких був і клінічно виділений. Більш чутливими були штами *E. coli* UKM 028 та *E. coli* ATCC 25922 (МІК 0,04–0,16 мг/мл). Мінімальні інгібуючі концентрації досліджуваних сполук до клінічно виділеної *E. coli* та штамів *E. coli* RP 4 і *E. coli* K12 W становили від 0,32 до 0,63 мг/мл.

Бактерії роду *Salmonella* виявляли помірну чутливість до всіх досліджуваних сполук. Серед досліджуваних штамів сальмонел *S. typhi* виявляла найбільш виражену чутливість до зазначених хімічних речовин (МІК 0,16–0,32 мг/мл).

Високочутливою до дії досліджуваних хімічних сполук була також культура *Klebsiella pneumoniae*, причому відмічали збереження раніш зазначеної тенденції, тобто найменшу МІК (0,04 мг/мл) спостерігали при внесенні в поживне середовище Cu/Cd комплексів.

Цікаву особливість мали грамнегативні бактерії видів *Proteus vulgaris* і *Pseudomonas aeruginosa*. Бакте-

рицидний вплив помітний був лише при внесенні досить високих концентрацій кадмієвмісних речовин (МІК 1,25–2,5 мг/мл). Цинковмісні сполуки зовсім не здійснювали бактерицидного впливу в тих концентраціях, що вивчались. Був лише помірний бактериостатичний вплив при концентрації речовини в середовищі від 0,32 до 2,5 мг/мл.

Виражену фунгіцидну активність мали новосинтезовані Cu/Cd комплекси до грибів роду *Candida* (МІК 0,08–0,63 мг/мл). Сполуки Cu/Zn також здійснювали бактерицидний вплив на гриби роду *Candida*, але в дещо вищих концентраціях. Високочутливим до всіх тестованих координаційних сполук був штам *Candida albicans* 690 (МІК 0,08–1,25 мг/мл).

Цікаво було також визначити через який час речовина в мінімальній інгібуючій концентрації починає згубно діяти на популяцію чутливих мікроорганізмів. З цією метою було проаналізовано дію Cu/Cd комплексу PO244 до одного з найчутливіших штамів мікроорганізмів *S. aureus* 209.

Як видно з рис. 1, на той час, коли культура *S. aureus* 209 у контролі на п'яту-шосту годину починає переходити зі стаціонарної фази розвитку у фазу прискореного росту, кількість життєздатних клітин у дослідній групі падає майже вдвічі – з 10^7 до 10^3 КУО/мл. Стрімке зниження життєздатних клітин спостерігали з третьої години культивування *S. aureus* 209 у середовищі з концентрацією речовини 0,04 мг/мл.

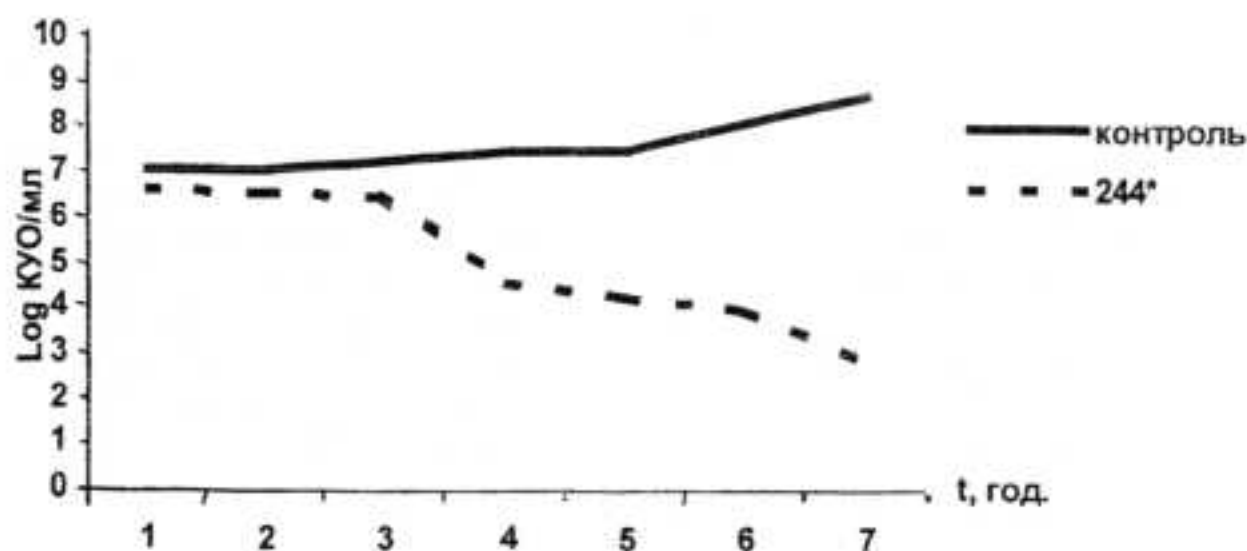


Рис. 1. Визначення бактеріцидної дії сполуки PO 244 до *S. aureus* у динаміці

Таким чином, новосинтезовані координаційні сполуки крім протівірусного впливу мають ще й виражений антибактеріальний і фунгіцидний ефект. Вони є перспективними для подальшого дослідження в комплексній терапії вірусно-бактеріальних інфекцій.

1. Гудзь О.В. // Дезинфекционное дело. – 2000. – № 2. – С. 26–29.
2. Проданчук М.Г. // СЕС Профілактична медицина. – 2005. – № 2.

– С. 14–19. 3. Бароян О.В. Эпидемиология. Вчера, сегодня, завтра. – М., 1985. 4. Покровский В.И., Онищенко Г.Г., Черкаский Б.П. // ЖМЭИ. – 2002. – № 3. – С. 16–23. 5. Про уніфікацію методів визначення чутливості мікроорганізмів до хімотерапевтичних засобів. Наказ МОЗ СРСР № 150. – М., 1985. 6. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. Биргера М.О. – М., 1982. 7. Харіна А.В., Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Вступ до хімотерапії вірусних інфекцій. – К., 2003.

Надійшла до редколегії 30.09.05

УДК 547.96: 582.4

Н. Карпенко, канд. біол. наук

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАПАСНИХ БІЛКІВ НАСІННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ ТРИБИ *CORONILLEAE* (ADANS.) BOISS

Наведено дані з результатів електрофорезу запасних білків насіння представників триби *Coronilleae* в поліакриламідному гелі. Досліджено насіння 13 видів триби. Отримані дані підтвердили доцільність перенесення виду *C. emeroides* Boiss. et Sprun. до роду *Hippocrepis*, а *Coronilla varia*, *C. cretica*, *C. parviflora* та *C. elegans* – до роду *Securigera*.

The data from storage proteins electrophoresis of *Coronilla* L. species' samples in PAAG were presented. The 13 species were investigated. Obtaining data were confirmed expediency to transfer *C. emeroides* Boiss. et Sprun. into the genus *Hippocrepis* and *Coronilla varia*, *C. cretica*, *C. parviflora*, *C. elegans* into the genus *Securigera*.

Вступ. Ідентифікація видів і сортів – найважливіший елемент у роботі ботаніка, генетика та селекціонера. Вона необхідна для точного й об'єктивного визначення видової та сортової належності рослини, створення досконалої номенклатури видів і внутрішньовидових таксонів, а також для документації генофонду культурних рослин та їхніх диких родичів з метою обліку, збереження й ефективного використання в селекції. Для вирішення цих питань необхідним є використання біохімічних методів, серед яких – метод електрофоретичного фракціонування білків у поліакриламідному гелі [5; 7].

Як ефективні молекулярно-генетичні маркери в систематиці та сортовій ідентифікації рослин можуть бути використані поліморфні системи запасних білків рослин [4]. Для розв'язання проблем систематики критичних груп за допомогою електрофоретичних систем запасних білків використовуються порівняльні оцінки електрофореграм за рухливістю фракцій, інтенсивністю їхнього прояву та значеннями молекулярних мас. Основними запасними білками представників *Fabaceae* є глобуліни [3, С. 97–116]. Ефективність використання глобулінів як системи молекулярних маркерів у таксономічних дослідженнях була продемонстрована під час ревізії роду *Medicago* L. флори України [6] та інших родів родини *Fabaceae* [1; 2; 9; 10]. Метою нашої роботи було з'ясування місця критичних таксонів (*C. varia* L., *C. elegans* Panc., *C. parviflora* Willd., *C. cretica* L., *C. emeroides* Boiss. et Sprun.) у системі триби й тим самим – уточнення об'єму родів, які входять до її складу.

Об'єкти й методи досліджень. Нами досліджено насіння 13 видів триби *Coronilleae* за методикою Леммлі. Були використані зразки насіння, зібрані в місцях природного зростання на території України та отримані з ботанічних установ Європи, а саме: *Coronilla emeroides* Boiss. et Sprun. № 11 – Україна, АР Крим, с. Малий Маяк; *C. coronata* L. № 2 – Україна, Тернопільська обл., с. Гутисько; *C. scorpioides* (L.) Koch. № 55 – Україна, АР Крим, Нікітський ботанічний сад; *C. cretica* L. № 2 –

Україна, АР Крим, Нікітський ботанічний сад; *C. varia* L. № 4 – Україна, АР Крим, с. Малий Маяк; *C. elegans* Panc. № 2846 – Німеччина, ботанічний сад університету м. Єни; *C. parviflora* Willd. № 1168 – Данія, ботанічний сад м. Копенгагена; *Hippocrepis comosa* L. № 58 – Україна, Тернопільська обл., с. Гутисько; *H. biflora* Spreng. № 53 – Україна, АР Крим, Нікітський ботанічний сад; *Securigera securidaca* (L.) Degen et Döerfl. № 4 – Україна, АР Крим, м. Партеніт; *Ornithopus sativus* Brot. – Німеччина, ботанічний сад м. Геттінгена; *O. perpusillus* L. – Франція, ботанічний сад м. Нанта; *Scorpiurus muricatus* L. – Франція, ботанічний сад м. Бордо.

Результати та їх обговорення. Еталонні електрофоретичні спектри запасних білків насіння (глобулінів) видів триби *Coronilleae* були отримані в серії повторних електрофорезів для різних видів кожного роду. Після встановлення видоспецифічних спектрів у межах роду було виконано узагальнюючий електрофорез без повторностей для одного виду, але з максимальним представництвом досліджених попередньо в серійних повторюваннях видів. Такий форез дав можливість порівняти спектри представників не лише різних видів у межах одного роду, але й різних родів, зокрема з метою оцінки наявності родоспецифічних ознак на електрофореграмах.

Усі одержані спектри глобулінів були видоспецифічними, тобто відрізнялися між собою як кількістю фракцій, так і значеннями відносної електрофоретичної рухливості та, відповідно, молекулярних мас фракцій (табл. 1).

Молекулярні маси фракцій білкових спектрів видів триби *Coronilleae* були в межах від 18 до 174 кДа. У спектрах усіх видів можна виділити чотири основні зони з мажорними фракціями: 116 кДа (альбуміни); 53–56 кДа (віціліни); 32–36 кДа (кислі легуміни); 21 кДа (основні легуміни).

Різні фракції мали різну таксономічну вагу. Так, було виявлено трибо-, родо- та видоспецифічні фракції. Наведемо їхній огляд.

Таблиця 1. Значення молекулярних мас фракцій запасних білків насіння видів триби Coronilleae (кДа)

№ фракції	Вид												
	<i>Hippocrepis comosa</i>	<i>H. biflora</i>	<i>Coronilla emeroides</i>	<i>C. coronata</i>	<i>C. scorpioides</i>	<i>C. cretica</i>	<i>C. parviflora</i>	<i>C. varia</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Securigera securidaca</i>	<i>Ornithopus sativus</i>	<i>O. perpusillus</i>	<i>Scorpiurus mucicatus</i>
	116	116	71	127	162	156	174	162	144	168	127	58	102
	88	84	59	116	144	117	82	111	111	116	116	55	92
	74	74	56	92	102	111	71	90	87	88	88	53	74
	62	62	55	84	92	88	56	82	68	79	79	49	56
	56	57	55	74	82	82	54	68	55	68	68	47	55
	55	55	53	56	56	77	48	55	54	55	62	43	54
	54	54	48	55	55	56	46	52	52	54	54	40	52
	52	52	46	53	52	55	44	49	36	47	49	36	50
	49	49	42	52	44	54	36	42	32	34	43	32	48
	40	44	36	48	34	52	21	35	21	21	40	26	46
	34	40	27	44	32	49	–	32	–	–	32	25	33
	22	34	24	32	23	47	–	24	–	–	29	21	21
	21	30	22	21	21	32	–	23	–	–	26	18	–
	18	25	21	–	18	23	–	21	–	–	23	–	–
	–	22	18	–	–	21	–	–	–	–	21	–	–
	–	21	–	–	–	–	–	–	–	–	18	–	–
	–	18	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

1. Трибоспецифічна фракція одна (21 кДа). У *Hippocrepis* та *Coronilla emeroides* вона мінорна, у решти – мажорна.

2. Родоспецифічні фракції *Hippocrepis*. Спектр цього роду відрізняється від решти представників найбільшою мірою. Він має 5 фракцій, які слід вважати родоспецифічними, з них три мажорні (22 кДа, 40 кДа, 116 кДа), дві мінорні (18 кДа і 34 кДа).

3. Родоспецифічність *Coronilla s. l.* не була підтверджена. Навпаки, для цієї групи видів не було виявлено жодної спільної фракції. Натомість *Coronilla s. l.* розділилась на 4 групи видів, а саме:

група 1 – *C. coronata*+*C. scorpioides*, яка представляє *Coronilla s. str.* Фракції, специфічні для групи 1, мали молекулярні маси 32 кДа, 52 кДа, 55 кДа та фракції 44 кДа, 56 кДа, 92 кДа, які відсутні в групі 2;

група 2 – *C. cretica*+*C. varia*+*C. elegans*. Ця група за спектрами близька, проте не ідентична до групи 1 (тобто *Coronilla s. str.*); фракції, специфічні для цієї групи, мали молекулярні маси 32 кДа, 52 кДа та 55 кДа. Фракція 55 кДа об'єднує цю групу з видом *S. securidaca* та видами групи 1;

група 3 представлена *C. parviflora*. Цей вид мав 1 спільну фракцію – 54 кДа – із *Securigera securidaca*, від 1 до 5 спільних фракцій з різними видами *Coronilla s. l.*, але відрізнявся відсутністю білкових фракцій, характерних для груп 1 і 2;

група 4 представлена критичним видом *Coronilla emeroides*. У цього виду виявлено специфічну мажорну фракцію 27 кДа. Трибоспецифічна фракція 21 кДа є мінорною, як у *Hippocrepis*. З видами *Coronilla s. l.* має 1 спільну фракцію – 55 кДа, з видами роду *Hippocrepis* – 3 спільні фракції: 18 кДа, 22 кДа, 55 кДа, що підтверджує правомірність розміщення *C. emeroides* у межах роду *Hippocrepis*.

4. Родоспецифічні фракції у *Ornithopus* мали молекулярні маси 21 кДа, 32 кДа, 49 кДа.

5. Фракції, специфічні лише для роду *Scorpiurus*, мали молекулярні маси 33 кДа та 50 кДа.

6. Спорідненість виду *C. parviflora* з *Securigera securidaca* простежувалась у наявності фракції з молекулярною масою 56 кДа та у відсутності фракцій 32 кДа, 52 кДа, які характерні для решти видів *Coronilla s. l.*

7. Види роду *Hippocrepis* відрізнялися від інших представників триби наявністю мажорних фракцій з молекулярними масами 116 кДа.

Висновки. За електрофоретичними спектрами, отриманими за методикою Леммлі, підтверджено об'єднання видів у межах родів *Hippocrepis*, *Coronilla s. str.* і *Ornithopus*. Види *C. varia*, *C. elegans*, *C. parviflora* та *C. cretica* відрізняються від видів роду *Coronilla s. str.* Вид *C. emeroides* Boiss. et Sprun. за кількістю білкових фракцій з однаковими молекулярними масами виявився ближчим до роду *Hippocrepis* (3 фракції), ніж до *Coronilla s. l.* (1 фракція). Отже, отримані дані підтвердили доцільність перенесення виду *C. emeroides* Boiss. et Sprun. до роду *Hippocrepis*, а *Coronilla varia*, *C. cretica*, *C. parviflora* та *C. elegans* – до роду *Securigera*, що узгоджується із систематичним зведенням С.Л. Мосякін та М.М. Федорончук [8, с. 210-211].

- Дорогина (Агафонова) О.В., Агафонов М.А. // Бот. журн. – 2004. – Т. 89, № 10. – С. 1637–1645.
- Карпенко Н.І. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2004. – Вип. 42. – С. 40–42.
- Клименко В.Г. Белки семян бобовых растений // Растительные белки и их биосинтез. – М., 1975.
- Конярев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. – М., 1983.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М., 1981.
- Підюра О.І. Рід *Medicago* L. (Fabaceae) у флорі України (система, палеонтологія, хемосистематика). – К., 1998.
- Сафонов В.И., Сафонов М.П. // Физиология растений. – 1969. – Т. 16. – Вып. 2. – С. 350–357.
- Mosyakin S.L., Fedoronchuk M.M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. – Kiev, 1999.
- Przybylska A., Zimniak-Przybylska M. // Genet. Resources Crop Evol., 1995. – Vol. 42 (1). – P. 69–75.
- Rosa M.J., Ferreira R.B., Teixeira A.R. // Agric. Food Chem., 2000. – Vol. 48 (11). – P. 5432–5439.

ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ НА ВМІСТ ЦИКЛІЧНИХ НУКЛЕОТИДІВ У ЛІМФОЇДНИХ КЛІТИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДІЇ РАДІАЦІЇ

Установлено, що опромінення щурів у дозах 0,25–1,0 Гр викликало різноспрямовані зміни вмісту циклічних нуклеотидів у клітинах селезінки й тимусу щурів. Уведення сквалену та циклоферону призводило до різних змін досліджуваних показників у клітинах тимусу й селезінки, що може свідчити про відмінні механізми реалізації протипроменевих властивостей цих речовин.

It was established various changes in cyclic nucleotide content in thymus and spleen lymphocytes under conditions of whole body irradiation of rats in 0,25–1,0 Gy doses. Established organ specificity of squalene and cycloferone treatment effect can prove different anti-irradiation features of those drugs.

Вступ. Вплив на організм людини комплексу несприятливих чинників навколишнього середовища, пов'язаний з біологічною дією іонізуючих випромінювань, призводить до неухильного зростання розвитку патологічних станів систем і органів. Серед таких наслідків особливої уваги заслуговують радіаційно-індуковані імунodefіцитні стани, аутоалергічні дисбаланси та розвиток неопластичних утворень лімфогенного походження, оскільки клітини імунної системи є одними з найбільш радіочутливих у складі організму. В основі ранніх і пізніх радіаційних ефектів лежить індукція різноманітних початкових молекулярних ушкоджень не тільки унікальних неампліфікованих генів, а й масових ультраструктур клітини – мембран, білкових молекул, вітамінів, різних кофакторів, речовин фенольної природи.

Значну роль у реалізації радіаційно-індукованих реакцій у клітині відіграють низькомолекулярні сполуки, що виконують роль носіїв у тригерних процесах регуляції гомеостазу метаболічних процесів. Зміни вмісту циклічних нуклеотидів є залученими у формування клітинної відповіді на вплив іонізуючого випромінювання. Попередніми дослідженнями було встановлено, що вміст циклічних нуклеотидів змінюється залежно від дозових значень і терміну після променевого впливу [4], що може бути використаним для оцінки ступеня ушкодження у клітинах різних типів. Опромінення тварин у значних дозах (4,0–10,0 Гр) призводить до зниження вмісту цАМФ і зростання кількості цГМФ у клітинах лімфоїдних органів у період перших двох діб після опромінення та за умов хронічної дії променевого фактора [1; 5]. Менші дози опромінення (0,05–1,0 Гр) спричиняли різноспрямовані зміни вмісту циклічних нуклеотидів у клітинах імунних органів протягом першої доби після опромінення [6]. Так, у ранні строки (6–12 год) після опромінення в дозі 0,5 Гр спостерігалось зниження рівня цАМФ, яке супроводжувалося зростанням вмісту цГМФ у лімфоїдних клітинах селезінки та зниженням цього показника в тимocyтах [3]. Збільшення терміну після дії іонізуючої радіації в дозі 1,0 Гр до однієї доби спричиняло зростання рівня цАМФ і зниження рівня цГМФ [4], при хронічному опроміненні в дозах 0,5–2,5 Гр спостерігалось підвищення вмісту обох циклічних нуклеотидів [1]. Такі різні дані можуть бути пояснені тим, що вміст циклічних нуклеотидів було визначено за різних умов опромінення та термінів.

Особливу увагу привертають радіаційно-індуковані зміни в системі циклічних нуклеотидів у першу добу після опромінення невеликими дозами. З огляду на значну роль цих речовин у регуляції процесів сигналь-

ної трансдукції в лімфоїдних клітинах, доцільним було б визначити вміст циклічних нуклеотидів після тотального опромінення тварин у різних дозових значеннях.

Метою даної роботи було визначення вмісту циклічного аденозинмонофосфату та гуанозинмонофосфату в лімфоїдних клітинах тимусу й селезінки щурів за умов тотального рентгенівського опромінення в дозах 0,25, 0,5, 0,75 та 1 Гр, а також дослідження впливу перорального введення сквалену й парентерального введення циклоферону на вміст циклічних нуклеотидів у лімфоцитах опромінених тварин.

Об'єкт і методи досліджень. Досліди були проведені на нелінійних білих щурах обох статей масою 150–200 г. Сквален вводили перорально в розчині рослинної олії в дозі 0,25 мг/кг ваги двічі на добу протягом трьох днів перед опроміненням [8]. Препарат циклоферону вводили щурам перед опроміненням шляхом внутрішньочеревних ін'єкцій у дозі 62 мг/кг ваги двічі на добу протягом п'яти днів перед опроміненням згідно з рекомендаціями, поданими в роботі [9]. Опромінення проводили на установці РУМ-17 за умов, які описані раніше [2]. Тварин декапітували через 12 год після опромінення та виділяли лімфоїдні клітини із селезінки й тимусу контрольних і опромінених щурів осадженням на градієнті Ficoll-Paque (густина 1,077 г/см³) згідно з рекомендаціями з роботи [7]. Вміст циклічних нуклеотидів – цАМФ і цГМФ визначали з використанням стандартних наборів виробництва "Amersham" відповідно до інструкції.

Результати та їх обговорення. Після опромінення тварин у лімфоїдних клітинах спостерігалися хвилеподібні зміни вмісту цАМФ (табл. 1): у тимocyтах опромінення в дозах 0,25 та 1,0 Гр мало результатом зростання кількості циклічного нуклеотиду, тоді як вплив променевого фактора в дозі 0,75 Гр на порядок зменшувало цей показник. У спленоцитах зростання вмісту цАМФ було характерним після променевого впливу в дозі 0,25 та 0,75 Гр, за дози 0,5 Гр спостерігалось зниження кількості циклічного нуклеотиду.

Зміни вмісту циклічного гуанозинмонофосфату певним чином збігалися з динамікою зміни вмісту цАМФ у лімфоїдних клітинах після опромінення: спостерігалось зростання кількості циклічних нуклеотидів після опромінення тварин у найменшій (0,25 Гр) та більших з обраних нами доз (0,75 і 1,0 Гр), тоді як для проміжної дози опромінення – 0,5 Гр характерним було відносне зниження цього показника.

Ключ до розуміння такої складної динаміки післяпроменевих змін системи циклічних нуклеотидів може надати оцінка співвідношення вмісту циклічних нуклеотидів цАМФ/цГМФ. Цей показник, згідно з теорією "пле-

йотипічного" контролю, є вирішальним для реалізації подальшої клітинної відповіді. А.С. Соболевим було доведено важливість співвідношення цАМФ/цГМФ для радіомодифікуючого ефекту [5]. Визначення значення показника співвідношення циклічних нуклеотидів у клітинах тимусу й селезінки щурів, опромінених у різних дозах (табл. 1) дозволило виявити деякі характерні риси: по-перше, наявність двох пікових значень зростання показника цАМФ/цГМФ у клітинах тимусу відповідає даним про існування двох різних за своєю радіочутливістю субпопуляцій тимоцитів: для однієї, очевидно, критичним значенням є доза 0,25 Гр – перша хвиля зрос-

тання показника; друга хвиля за дози 1,0 Гр є, швидше, результатом реакцій іншого, більш резистентного до дії іонізуючого випромінювання пулу тимоцитів. Опромінення тварин у дозі 0,75 Гр мало наслідком значне зниження співвідношення, можливо, пов'язане зі стимуляцією проліферативної здатності клітин і збільшенням диференціювання. У клітинах селезінки опромінених тварин найістотніше зростання співвідношення цАМФ/цГМФ спостерігали при опроміненні в дозі 0,25 Гр, що узгоджується з уявленнями про значну радіочутливість В-лімфоцитів, які є складовою частиною лімфоїдних клітин селезінки.

Таблиця 1. Вміст циклічних нуклеотидів у лімфоїдних клітинах селезінки та тимусу щурів за умов впливу іонізуючого випромінювання на фоні введення сквалену й циклоферону, пмоль / мг білка, $n = 6$

Стан тварин		контроль	Дози випромінювання, Гр			
			0,25	0,5	0,75	1,0
контроль						
Тимус	цАМФ	19,97 ± 2,19	417,9 ± 58,9*	26,98 ± 2,75	2,31 ± 0,32*	149,9 ± 17,2*
	цГМФ	9,53 ± 1,05	57,13 ± 8*	10,31 ± 1,15	15,55 ± 2,18	17,18 ± 1,97*
	цАМФ/цГМФ	2,1 ± 0,43	7,32 ± 1,62*	2,62 ± 0,87	0,15 ± 0,04*	8,72 ± 1,02*
Селезінка	цАМФ	211,3 ± 22,6	608,29 ± 73*	40,08 ± 3,73*	503,7 ± 43,3*	174,4 ± 22,2*
	цГМФ	39,64 ± 7,45	25,92 ± 3,11	12,45 ± 1,16	48,28 ± 4,15	32,92 ± 3,79
	цАМФ/цГМФ	5,33 ± 0,87	23,47 ± 3,82*	3,22 ± 0,53	10,43 ± 1,88	5,3 ± 0,69
введення сквалену						
Тимус	цАМФ	122,26 ± 14,7	207,46 ± 16*	63,46 ± 7,65*	32,2 ± 3,88*	312,8 ± 39,8*
	цГМФ	24,58 ± 3,06	53,03 ± 6,39*	10,08 ± 1,2*	1,32 ± 0,2*	9,21 ± 1,11*
	цАМФ/цГМФ	4,97 ± 0,69	3,91 ± 0,47	6,3 ± 0,86	24,39 ± 2,54*	33,97 ± 4,09
Селезінка	цАМФ	237,23 ± 28,9	114,6 ± 16,8*	586,6 ± 70,7*	3285 ± 396*	1400 ± 169*
	цГМФ	209,9 ± 32,11	22,31 ± 2,69*	202,57 ± 24,4	163,77 ± 19,8	33,56 ± 4,04*
	цАМФ/цГМФ	1,13 ± 0,18	5,14 ± 0,67*	2,9 ± 0,65	20,06 ± 2,42*	41,72 ± 5,03*
введення циклоферону						
Тимус	цАМФ	235,9 ± 20,9*	28,71 ± 2,54*	93,56 ± 8,28*	62,65 ± 5,54*	27,68 ± 7,45*
	цГМФ	8,29 ± 0,73	12,9 ± 1,14*	1,46 ± 0,13*	28,15 ± 3,49*	15,09 ± 1,34*
	цАМФ/цГМФ	28,47 ± 2,52	2,23 ± 0,34*	64,08 ± 5,67*	2,23 ± 0,27*	1,83 ± 0,16*
Селезінка	цАМФ	86,14 ± 7,62	134,8 ± 16,9*	472,2 ± 41,8*	472,3 ± 41,8*	392,5 ± 34,7*
	цГМФ	21,86 ± 1,93	87,26 ± 7,72*	45,26 ± 4,04*	80,12 ± 7,09*	9,81 ± 0,82*
	цАМФ/цГМФ	3,94 ± 0,85	1,54 ± 0,14*	10,43 ± 1,92*	5,9 ± 0,98	40,01 ± 5,54*

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем без опромінення.

Дослідження впливу певних біологічно активних речовин, які мають радіозахисні, імуномодулюючі та цитопротекторні регуляторні властивості на функціонування імунокомпетентних клітин, є важливим питанням, яке потребує остаточного вирішення. Адже розуміння молекулярних механізмів реалізації ефекту іонізуючої радіації та роль певних сполук у формуванні цих реакцій сприяє створенню можливих схем їхнього введення для створення фундаментально підтвердженої фармакологічної підтримки організму за впливу іонізуючого випромінювання. Попередніми дослідженнями було доведено, що сквален і циклоферон є імуномодуляторними речовинами з вираженими протипроменевими властивостями [8; 9]. Тому дослідження впливу введення цих речовин перед опроміненням тварин у різних дозах на показник співвідношення циклічних нуклеотидів у клітинах селезінки й тимусу є доцільним для глибшого розуміння механізмів, які беруть участь у реалізації їхнього ефекту (табл. 1).

Дослідження вмісту циклічних нуклеотидів у лімфоїдних клітинах показало, що вміст цАМФ у тимоцитах значно зростає після введення сквалену й циклоферону. У разі введення сквалену картина змін вмісту цАМФ у тимоцитах опромінених тварин була подібна до такої тварин контрольної групи, проте з меншою амплітудою. Вплив іонізуючої радіації в найменшій та найвищій з обраного інтервалу доз – 0,25 і 1,0 Гр – мав наслідком

підвищення вмісту циклічного аденозинмонофосфату, у проміжних дозах – 0,5 і 0,75 Гр – зниження. Зниження вмісту цАМФ було характерним лише для спленоцитів тварин, опромінених у дозі 0,25 Гр. Подальше збільшення дозового навантаження викликало значне зростання вмісту цАМФ у лімфоїдних клітинах селезінки тварин, які отримували сквален. Тварини, яким перед опроміненням вводили циклоферон, мали зменшений вміст цАМФ у тимоцитах після променевого впливу. У клітинах селезінки, навпаки, ефектом уведення циклоферону перед опроміненням було стійке зростання кількості цієї сполуки.

Відомо, що введення щурам сірковмісних радіопротекторів і радіозахисних біогенних амінів призводить до збільшення рівня цАМФ [5]. Одним з імовірних механізмів дії радіопротекторних речовин є затримка реплікативного синтезу ДНК, поєднана зі створенням можливості для посиленних репараційних процесів. Установлене зростання вмісту цАМФ у клітинах неопромінених тварин після введення досліджуваних речовин збігається з літературними даними про їхні імуномодулюючі властивості. Спленоцити, як радіочутливіші клітини, виявляли більший рівень зростання вмісту цАМФ у разі введення цих речовин.

У тимоцитах і спленоцитах уведення сквалену призводило до зростання вмісту цГМФ, на відміну від іншої досліджуваної речовини – циклоферону (табл. 1).

В останньому випадку спостерігалось зниження вмісту цГМФ у спленоцитах; у тимоцитах введення циклоферону не мало помітного впливу на досліджуваний показник. Вміст циклічного гуанозинмонофосфату в лімфоцитах тимусу при введенні сквалену збільшувався лише після опромінення тварин у дозі 0,25 Гр. Променовий вплив у значніших дозах призводив до зменшення цього показника в тимоцитах тварин, котрі отримували сквален. Найнижчі значення були отримані за дози опромінення 0,75 Гр. У клітинах селезінки опромінення тварин на фоні введення сквалену мало результатом зниження вмісту цГМФ в усіх дослідженнях, крім опромінення тварин у дозі 0,5 Гр, коли не було встановлено значних відмінностей від контрольного рівню. Парентальне введення циклоферону мало наслідком значне зниження вмісту цГМФ у клітинах тимусу після опромінення в дозі 0,5 Гр, тоді як наступна з обраного нами інтервалу доза променевого впливу 0,75 Гр за таких умов призводила до найбільшого зростання кількості досліджуваної сполуки. У клітинах селезінки при введенні циклоферону зберігався хвилеподібний характер з двома максимумами, відповідними опроміненню в дозах 0,25 і 0,75 Гр, зниженням після опромінення в дозі 0,5 Гр і мінімумом – після 1,0 Гр.

Отримані дані дозволили встановити, що пероральне введення сквалену дослідним тваринам перед опроміненням спричиняло однакові зрушення показника цАМФ/цГМФ в обох органах. Зростання показника цАМФ/цГМФ у тимоцитах і спленоцитах було характерним для впливу променевого фактора при дозовому значенні 0,75, а більш виражено при 1,0 Гр, що було розцінено як стабілізуючий ефект застосування сквалену. Різний вплив введення циклоферону на показник цАМФ/цГМФ спостерігався у випадку клітин тимусу та селезінки щурів. Якщо в клітинах тимусу максимальне значення співвідношення цАМФ/цГМФ спостерігалось за впливу променевого фактора у дозі 0,5 Гр, а інші дозові значення викликали зменшення цього параметра, то у випадку спленоцитів відмічали невеликі зміни показника цАМФ/цГМФ за дії доз 0,25–0,75 Гр, і лише променева дія в дозі 1,0 Гр викликала збільшення цих значень.

Порівняння впливу введення дослідним тваринам сквалену й циклоферону дає підставу зазначити, що якщо введення сквалену призводить до зсуву максимального зростання показника цАМФ/цГМФ у бік більших доз у випадку клітин обох лімфоїдних органів, то введення циклоферону має більш значну дію на спленоцити. Проте в разі введення циклоферону відзначається зменшення рівня показника нижче контрольних значень, тоді як введення сквалену не мало такого впливу. Такі різноспрямовані зміни циклічних нуклеотидів за введення різних діючих речовин можуть бути пояснені з огляду на різні механізми їхньої проти-променевої дії. Так, сквален може слугувати антиоксидантною речовиною, яка сприяє посиленню радіостійкості організму в цілому, тобто результати його

введення засновані на молекулярних властивостях цієї сполуки. Сквален як гідрофобна речовина здатен до вбудовування у клітинну мембрану, а тому може розглядатися як потенційний модулятор функціональної активності трансмембранних білків-рецепторів, каналів і ферментів не лише на клітинній поверхні, а й у внутрішньоклітинних мембранних структурах. Реалізація протипухлинних, імуностабілізуючих, ранозагоюючих і радіопротекторних властивостей сквалену може здійснюватись завдяки декільком механізмам: по-перше, накопичення сквалену в шкірі сприяє створенню додаткового бар'єра на шляху різних несприятливих факторів зовнішнього середовища; по-друге, наявність багатьох ненасичених зв'язків у складі молекули сквалену робить його високоактивною антиоксидантною сполукою, здатною здійснювати захист мембранних структур від атаки продуктів пероксидного окиснення ліпідів; по-третє, створення пулу ізопреноїдних одиниць, доступних для синтезу важливих біологічно активних сполук запобігає їхньому дефіциту в післяпроменевий період, і крім того, не слід виключати можливість функціонування сквалену як речовини, здатної проникати в клітину та безпосередньо регулювати активність досліджуваних ферментативних білків як алостеричний ефектор. Циклоферон реалізує свою протипроменеву дію через активізацію ядерного апарату клітини, стимуляцію синтезу інтерферону та цитокінів, активацію клітинних функцій лімфоїдної тканини.

Висновки. Проведені нами дослідження дозволили підтвердити залучення системи циклічних нуклеотидів до регуляції радіоіндукованих змін у лімфоїдних клітинах. Нами було встановлено, що введення біологічно активних речовин з радіозахисними властивостями, але з різними механізмами впливу, мало відмінну дію на вміст циклічних нуклеотидів у досліджуваних фракціях. Узагальнюючи, можна стверджувати, що потенційовані іонізуючим випромінюванням зміни співвідношення цАМФ/цГМФ на фоні введення сквалену та циклоферону можуть слугувати підтвердженням протипроменевих властивостей цих речовин.

1. Кисельгоф Е.И., Шорохова В.В. // Радиобиология. – 1992. – Т. 32, № 6. – С. 802–806.
2. Остапченко Л.І. Молекулярні механізми регуляції активності циклонуклеотид- та кальційзалежних протеїналімфоїдних клітин в умовах радіаційного впливу. – К., 1999.
3. Остапченко Л.І., Налева О.Е., Пархомец Т.І. // Укр. біохім. журн. – 1994. – Т. 67, № 1. – С. 70–75.
4. Слатвинская Е.А., Ручко М.В., Остапченко Л.І. // Докл. АН УССР. – 1990. – № 12. – С. 60–63.
5. Соболев А.С. Радиационная биохимия циклических нуклеотидов. – М., 1987.
6. Хажиахмедов Г., Нишанбаев К.Н., Хамидов Д.Х. и др. // Радиобиология. – 1990. – Т. 30, № 3. – С. 410–412.
7. Boyum A. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21. – P. 28–30.
8. Gregory S., Kelly N.D. // Altern. Med. Rev. – 1999. – Vol. 4, № 1. – P. 29–36.
9. Popovich I.G., Zabezhinski M.A., Kovalenko A.L. et al. // Cancer. Lett. – 2000. – Vol. 148, № 2. – P. 215–219.

Надійшла до редколегії 28.12.05

УДК. 577.346:616.438

С. Імедадзе, пров. інж., А. Майданюк, канд. біол. наук

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ 5'-НУКЛЕОТИДАЗИ ТИМОЦИТІВ

*Визначили активність та кінетичні константи (K_m , V_{max}) 5'-нуклеотидазної реакції тимоцитів**The kinetic parameters (K_m , V_{max}) and 5'-nucleotidase activity tymocytes were estimated*

Вступ. Актуальність дослідження пуринового обміну в клітинах імунної системи зросла після відкриття важких спадкових захворювань дітей з дефіцитом аденозиндезамінази, пуриннуклеозидфосфорилази і 5'-нуклеотидази. При дефіциті 5'-нуклеотидази (5'-рибонуклеотидфосфогідролаза КФ 3.1.3.5.) страждає гуморальний імунітет. Активність цього ферменту набагато нижча за норму в лімфоцитах хворих з недостатністю гуморального імунітету, що свідчить про необхідність 5'-нуклеотидазної реакції для нормальної життєздатності та функціонування В-лімфоцитів.

У клітинах аденозин утворюється із АМФ за участю 5'-нуклеотидази. Аденозин є універсальним регулятором функцій різних клітин, він пригнічує проліферацію і диференціацію клітин імунної системи й ця його дія значно більше виражена в порівнянні з іншими типами клітин. Механізм його дії зв'язують з різноманітними змінами пуринового метаболізму. Так, аденозин значно прискорює катаболізм аденіннуклеотидів у тимоцитах [1].

Особливе значення 5'-нуклеотидази пов'язане з пригніченням пуринового метаболізму при імунодефіцитних станах. Недостатність 5'-нуклеотидази тимуса та інших лімфоїдних органів супроводжується значним зниженням аденозину, що викликає порушення функцій Т- і В-лімфоцитів. У зв'язку з тим, що зміну концентрації аденозину розглядають як регуляторний фактор для багатьох важливих фізіологічних процесів (ліполіз, регуляція кровотоку та ін.), функціональний стан 5'-нуклеотидази та його регуляція викликають значний інтерес до вивчення цього ферменту. 5'-нуклеотидаза є конститутивним ферментом будь-яких клітин ссавців – глікопротеїн, який міститься як у мембранозв'язаній, так і розчинній фракції клітини [7]. Зв'язана з мембранами 5'-нуклеотидаза використовується як ферментативний маркер плазматичних мембран [6, с. 15], складається із ідентичних субодиниць з молекулярною масою (м. м.) 60–80 кДа і в нативному стані є димером з м. м. 120–160 кДа. Фермент зв'язаний з поверхнею мембрани глікозилфосфатидилінозитним якорем і під дією фосфоліпаз може звільнятися з мембран у цитозоль.

У цитозольній фракції виявлено дві основні форми 5'-нуклеотидази: з "високою" та "низькою" величинами константи Міхаеліса (K_m), крім цього вони відрізняються субстратною специфічністю. Цитозольна форма 5'-нуклеотидази з "низькою" K_m за своїми властивостями ідентична солюбілізованій мембранній формі, вони мають однакову м. м., каталізують гідроліз АМФ і піримідинових нуклеотидів.

Ураховуючи все наведене вище, можна зробити висновки, що визначення активності 5'-нуклеотидази тимоцитів є актуальним.

Об'єкт і методи досліджень. Тимоцити виділяли з тимуса щурів віком 1,5–2 місяці, які утримувалися на стандартному раціоні віварію, м'яким продавлюванням через капронне сито в розчин, і до складу якого входили, ммоль: KCl – 5, NaCl – 120, глюкоза – 10, HEPES 10,

NaHCO₃ – 4, CaCl₂ – 1, MgCl₂ – 1. 5'-нуклеотидазну активність тимоцитів визначали після їхньої обробки 200 ммоль/л або 2 ммоль/л дігітоніном, чи їхнього лізису в гіпотонічному (10 ммоль/л) трис-буфері (pH 7,4) за кількістю неорганічного фосфату, який утворювався в результаті ферментативної реакції, в інкубаційному середовищі, до складу якого входили, ммоль/л: AMP – 2, MgCl₂ – 2, трис-HCl – 10, pH 8,8. Після інкубації на протязі 5–15 хв при 37 °C реакцію зупиняли додаванням 30 % ТХО. Осад відцентрифугували при 6000 g протягом 10 хв. Неорганічний фосфат визначали в супернатанті модифікованим методом Чена, для цього до 200 мкл супернатанту додавали 800 мкл H₂O dist, потім додавали 1 мл розчину хромогенної суміші. Для розвитку забарвлення проби інкубували протягом 45 хв при 37 °C, після чого проводили спектрофотометричний аналіз проб при довжині хвилі 750 нм. Результати статистично обробляли з допомогою програми для розрахунку основних кінетичних параметрів ферментативної реакції K_m і V_{max} за лінійною регресією рівняння Лайнувера – Берка, а також коефіцієнта кореляції, який дає критерій лінійності. Математично коректні значення одержують у тому разі, коли коефіцієнт кореляції не нижче 0,8 [4, с. 29–30].

Результати та їх обговорення. Раніше [5] нами було визначено активність і кінетичні константи 5'-нуклеотидазної реакції гомогенату тимуса щурів. Слід відзначити, що особливих труднощів при цьому не спостерігалось. Було показано, що для 50 мкг білка у пробі лінійність утворення продукту реакції (Рн) зберігалась до 30 хв інкубації, а активність ферменту становила 125 нмоль/хв х мг. Ураховуючи дані літератури [3, с. 99], а також наших досліджень про співвідношення між кількістю клітин і білка, можна вважати, що (10⁸) 100 млн клітин відповідає 2 мг білка. Виходячи з цього, 50 мкг білка є рівнозначним 2,5 млн клітин. Проте активність ферменту за таких кількостей тимоцитів не визначалась даним методом. І тільки за наявності 30 млн клітин у пробі й більше стало можливим визначення швидкості 5'-нуклеотидазної реакції. Складність при роботі з тимоцитами полягала не тільки в необхідності значної кількості їх у пробі (30–100 млн кл.), але ще й у розробці доступного методу їхньої гомогенізації в малих об'ємах. Ураховуючи властивість дігітаніну при взаємодії з холестерином збільшувати проникність плазматичних мембран [2], нами було досліджено вплив дігітаніну в концентраціях 0,2 та 2 ммоль/л на активність 5'-нуклеотидази тимоцитів, яка становить 0,0450 нмоль/хв х 10⁶ кл та 0,0448 нмоль/хв х 10⁶ кл відповідно, що свідчить про відсутність інгібуючого впливу високих концентрацій дігітаніну на ферментативну активність. Виходячи з цього, у подальшій роботі при визначенні залежності швидкості 5'-нуклеотидазної реакції від різних концентрацій субстрату – АМФ – ми використовували як дігітанін, так і лізис тимоцитів у гіпотонічному буфері – 10 ммоль/л трис-HCl (pH 7,4) і одержували близькі результати, які наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Початкові швидкості V_0 / хв $\times 10^6$ кл та кінетичні константи 5'-нуклеотидазної реакції тимоцитів ($n = 6$)

Концентрація АМР, ммоль/л	0,125	0,25	0,5	1	2
V_{01}	0,0161	0,0305	0,0464	0,0732	–
$V_{1max} = 0,149 \text{ ммольРн / хв} \cdot 10^6 \text{ Кл}_1 = 1,03 \text{ ммоль/л, } r = 0,998$					
V_{02}	0,0163	0,0303	0,0462	0,0730	0,0513
$V_{2max} = 0,0943 \text{ ммольРн / хв} \cdot 10^6 \text{ Кл}_2 = 0,59 \text{ ммоль/л, } r = 0,98$					
V_{03}	0,0162	0,0301	0,0461	0,0924	0,0520
$V_{3max} = 0,0943 \text{ ммольРн / хв} \cdot 10^6 \text{ Кл}_3 = 0,59 \text{ ммоль/л, } r = 0,97$					
V_{04}	0,0162	0,0304	0,0463	0,0714	0,0398
$V_{4max} = 0,0740 \text{ ммольРн / хв} \cdot 10^6 \text{ Кл}_4 = 0,43 \text{ ммоль/л, } r = 0,95$					
V_{05}	0,0164	0,0303	0,0435	0,0716	0,0395
$V_{5max} = 0,0650 \text{ ммольРн / хв} \cdot 10^6 \text{ Кл}_5 = 0,359 \text{ ммоль/л, } r = 0,961$					
V_{06}	0,0162	0,0304	0,0462	0,0527	0,0480
$V_{6max} = 0,0736 \text{ ммольРн / хв} \cdot 10^6 \text{ Кл}_6 = 0,43 \text{ ммоль/л, } r = 0,97$					
Середні значення	$V_{max} = 0,0740 \pm 0,013 \text{ ммольРн / хв} \cdot 10^6 \text{ Кл} = 0,43 \pm 0,101 \text{ ммоль/л}$				

Примітка: r – коефіцієнт кореляції.

Аналіз даних, наведених у таблиці, дозволяє зробити висновок, що визначена нами активність 5'-нуклеотидази тимоцитів відповідає літературним даним [3], проте 5'-нуклеотидазна реакція тимоцитів характеризується зменшенням значення максимальної швидкості (V_{max}) і збільшенням K_m у порівнянні з результатами їхнього визначення в гомогенаті тимуса. Можливо, це пояснюється відсутністю ефекту розбавлення при даній постановці експерименту з тимоцитами, або можливого перерозподілу мембранозв'язаних і цитозольних форм ферменту, та як наслідок цього – зміна їхніх кінетичних характеристик. На нашу думку, для остаточної відповіді необхідна подальша експериментальна робота в даному напрямку.

Висновки. Визначено активність і кінетичні константи $V_{max} = 0,0740 \pm 0,013 \text{ ммольРн / хв} \cdot 10^6 \text{ Кл} = 0,43 \pm 0,101 \text{ ммоль/л}$ 5'-нуклеотидазної реакції тимоцитів щура.

1. Дмитренко Н.П., Горошнікова Т.В. // Біохімія. – 1985 – Т. 50, вып. 2. – С. 225–230 2. Дмитренко Н.П., Горошнікова Т.В. // Біохімія. – 1987 – Т. 52, вып. 5. – С. 750–757 3. Дмитренко Н.П. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. – К. 1991 4. Войццкий В.М., Бабенко Ю.Д., Рудич В.В., Марченко Ф.С. Общие принципы организации биохимических исследований. – К., 1989 5. Імедадзе С.П., Майданюк А.В., Кисельова І.К. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2005 – Вип. 44. 6. Рыбальченко В.К., Козанов М.М. Структура и функции мембран: Практикум. – К., 1988. 7. Якубовский С.М., Рыбаков В.Н. // Радиационная биохимия – 1998 – Т. 38, вып. 6. – С. 806–811

Надійшла до редакції 14.10.05

616.33+616.45-001.1/3

Т. Хілько, ст. наук. співроб., О. Кравченко, асп.,
Н. Левкович, студ., О. Безпалько, студ.

ВПЛИВ ПОЛІЕНАСИЧЕНОГО ФОСФАТИДИЛХОЛІНУ НА ЛІПІДНИЙ СКЛАД ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА УМОВ ЕТАНОЛОВОЇ ВИРАЗКИ

Досліджено ліпідний склад плазматичних мембран клітин слизової оболонки шлунка щурів як за умов етанолової виразки, так і при введенні тваринам ліпосомального поліенасиченого фосфатидилхоліну на фоні розвитку виразкових ушкоджень. За умов етанолової виразки відбувається достовірне зменшення вмісту як окремих, так і суми всіх класів фосфоліпідів, але значно зростає вміст холестеролу. Уведення щурам ліпосомального поліенасиченого фосфатидилхоліну сприяло відновленню кількісного вмісту ліпідів у плазматичних мембранах клітин слизової оболонки шлунка, пошкоджених дією етанолу

The lipid content of plasmatic membranes of gastric mucosa cells was investigated in conditions both ethanol-induced ulcer lesions and polyunsaturated phosphatidylcholinic liposomes introduction. The statistically reliability decrease of content both singl and total phospholipids, but cholesterol increase was shown in conditions ethanol-induced ulcer lesions. The polyunsaturated phosphatidylcholinic liposomes introduction led to normalization of the lipid content of plasmatic membranes of gastric mucosa cells that were disturbed by ethanol action

Вступ. Порушення мембранних структур при виразковій хворобі є однією з основних патогенетичних ланок у ланцюгу прогресування захворювання. Сучасна терапія не завжди досягає своєї мети й не дає мембранорепаруючого ефекту.

Виходячи з недостатньої ефективності сучасних противиразкових препаратів і враховуючи мультифакторний характер ульцерогенезу, нами досліджено вплив ліпіну на фактори захисту слизової оболонки шлунка (СОШ) за умов гострої етанолової виразки [3].

Ці аспекти зумовлюють необхідність розробки та пошуку методів лікування патогенезу виразкової хвороби,

направлених на загальноорганізменний вплив мембранотропними факторами.

Клінічні дослідження вітчизняного препарату "Ліпін", який створено на основі ФХ-ліпосом, підтвердили його високу ефективність при гіпоксичних станах різної етіології, завдяки його антигіпотоксичній, антиоксидантній, мембранопротекторній та антимікробній дії та здатності підвищувати неспецифічний імунітет.

Таким чином, метою даної роботи було оцінити вплив поліенасиченого фосфатидилхоліну на вміст ліпідів у плазматичних мембранах (ПМ) клітин СОШ щурів за умов етанолової виразки.

Об'єкт і матеріали досліджень. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій щодо проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин відповідно до Європейської конвенції.

Дослідження проводили на 112 нелінійних щурах-самцях масою 180–230 г. Тварин утримували на стандартному раціоні виварію. За добу до проведення дослідів щурі мали доступ лише до води. Тварин розподіляли на групи: 1 – контрольна; 2, 3 – групи, в яких моделювали етанолову виразку протягом 1-ї та 8-ми діб; 4 – група тварин, в якій для корекції етанолової ВХ щурам вводили поліненасичений фосфатидилхолін (ПФХ) у формі ліпосом внутрішньоочеревинно в концентрації 15 мг на 1 тварину за 1 введення протягом 7 діб двічі на добу. Етанолові виразки викликали за модифікованим методом Окабе [1]. Для цього щурам *per os* вводили 1 мл 80° етанолу. Щурів 2 групи декапітували через 24 год, 3 і 4 – через 8 діб після введення етанолу.

Плазматичні мембрани (ПМ) отримували, як описано в роботі [2].

Ліпіди екстрагували хлороформ-метанольною сумішшю (2:1 за об'ємом) за допомогою модифікованого методу [7]. Для вивчення якісного і кількісного складу нейтральних (Н) і фосфоліпідів (ФЛ) застосовували метод тонкошарової хроматографії. Ідентифікацію індивідуальних Н і ФЛ здійснювали за допомогою відповідних стандартів і високоспецифічного для ФЛ реактиву Васьковського – Костецького. Кількість індивідуальних нейтральних і ФЛ визначали за методом [6].

Результати та їх обговорення. Результати експериментальної роботи показали, що введення етанолу призводить до появи значних ушкоджень СОШ. Проникаючи до клітин епітелію та ендотелію судин, етанол викликає капілярні й масивні крововиливи, гострі дистрофічні та ерозивно-виразкові зміни СОШ.

Згідно з гістологічними дослідженнями, на 1-шу добу після введення етанолу виявлено типову виразку. На 3-тю добу процес виразкоутворення триває. Лише на 15-ту добу в зоні виразкового дефекту виявлено новодиференційовані клітини та помірну регенерацію епітелію СОШ.

Уведення ПФХ після дії етанолу вже на 8-му добу призвело до значного відновлення уражених ділянок СОШ. Про це свідчить зменшення набряку серозної та м'язової оболонок; відновлення тонусу судин. Площа виразки зменшилася за рахунок тяжів епітеліальних клітин, які покривали зону дефекту [3].

Що стосується уражень СО, то, очевидно, вони є вторинними щодо ліпопероксидації епітеліальних клітин і деструкції базальної мембрани епітелію, багатої на гіалуронову кислоту (остання руйнується вільними радикалами).

ПМ властива певна асиметрія в розподіленні різних класів ФЛ у зовнішньому та внутрішньому шарах. ФЛ,

що містять холін, такі як сфінгомієлін (СМ) і ФХ, локалізуються на зовнішньому боці мембрани у сполученні з невеликою кількістю фосфатидилетаноламіну (ФЕ). Внутрішня (цитозольна) частина її складається з невеликої кількості ФХ і СМ, великої кількості ФЕ, а також фосфатидилсерину (ФС) і фосфатидилінозитулу (ФІ). Отже, за нормальних умов аніонні ФЛ відсутні на зовнішній поверхні ПМ.

При дії ульцерогенних чинників раніше нами було встановлено зниження вмісту головних ФЛ – ФХ та ФЕ в СОШ у патогенезі виразкового захворювання. Це дозволило зробити висновок, що за дії різних ульцерогенних чинників пошкодження ПМ пов'язане насамперед з порушенням їхнього основного структурно-функціонального компонента – ФЛ [4].

Для встановлення участі ПФХ у підтриманні мембранної цілісності клітин і в регенераційних процесах у СОШ у роботі досліджено захисний ефект поліненасиченого ФХ у формі ліпосом, уведеного щурам шляхом повторних доз при моделюванні етанолової виразки.

Як показник, що характеризує стан ліпідного матриксу ПМ, нами було обрано дослідження вмісту нейтральних (Н) і ФЛ у ПМ клітин СОШ.

Як свідчать наші результати, за умов усіх досліджуваних експериментальних варіантів етанолової виразки відбувається вірогідне зменшення в ПМ як окремих ФЛ, так і сумарного вмісту ФЛ у порівнянні з контролем (табл. 1).

Найбільш вираженим було зниження вмісту ФХ (майже у 2 рази), ФЕ і СМ – у 1,6 рази, ФІ – в 1,4 рази. Уведення тваринам ПФХ на фоні розвитку етанолової виразки впливало таким чином, що кількість фосфоліпідів суттєво збільшувалась, наближаючись до рівня контролю.

В умовах експериментальної виразки сумарний вміст ФЛ зменшувався приблизно в 1,9 рази.

Напевно, це пов'язано з активацією вільнорадикального окиснення, основним субстратом якого є ФЛ. Про це свідчить зміна співвідношення окремих фракцій ФЛ. Значне зниження вмісту ФХ характеризує активацію фосфоліпазного гідролізу, який одночасно з ПОЛ є додатковим фактором модифікації клітинних мембран. В основі знайдених змін також може бути порушення синтезу ФЛ, яке розвивається внаслідок ушкодження механізмів ацилювання та реакцилювання. Зокрема, зменшення вмісту ФХ і ФЕ може бути зумовлено пригніченням реакцилювання ЛФХ. Певну роль у зниженні концентрації ФХ може грати зменшення вмісту ліпопротеїдів високої щільності, які виступають основним субстратом для синтезу ФХ [5].

Зниження вмісту ФЕ можна пояснити високою активністю цього ФЛ, а саме: участю в процесах дезінтоксикації, стабілізації ліпопротеїдів в енергетичному обміні та використанням для активації фосфоліпаз.

Таблиця 1. Вміст нейтральних ліпідів та фосфоліпідів (мкг/мг білка) в ПМ клітин слизової оболонки шлунка щурів при етаноловій моделі виразки (M±SD; медіана [нижня, верхня квартиль]; n = 15)

Групи тварин	Х	ТГЦ	ФХ	ФІ	СМ	ФЕ	ЛФХ
Контроль	120 ± 8	191 ± 8	114 ± 9	9,7 ± 1,0	35,3 ± 2,6	44,6 ± 1,2	1,18 ± 0,17
	121 [115; 126]	191 [185; 194]	116 [105; 122]	9,5 [9,0; 10,5]	35,2 [32,6; 37,3]	44,8 [43,6; 45,5]	1,23 [0,98; 1,28]
Етанол (1-ша доба)	272 ± 15	169 ± 6	52 ± 4	6,8 ± 1,0	21,2 ± 1,0	29,4 ± 1,5	1,00 ± 0,08
	274 [257; 287]	170 [165; 174]	52 [50; 56]	6,6 [5,8; 7,7]	21,8 [20,6; 22,1]	29,1 [28,5; 30,2]	0,96 [0,93; 1,08]
Етанол (8-ма доба)	262 ± 16	188 ± 9	60 ± 5	7,5 ± 0,6	21,9 ± 3,3	34,3 ± 1,3	0,93 ± 0,03
	263 [246; 278]	186 [180; 195]	62 [58; 63]	7,5 [6,8; 8,1]	21,7 [18,2; 25,2]	34,4 [32,7; 35,7]	0,92 [0,91; 0,96]
ПФХ+ етанол (8-ма доба)	123 ± 10	196 ± 6	98 ± 5	8,3 ± 1,1	33,7 ± 3,3	40,3 ± 3,5	0,84 ± 0,06
	122* [114; 133]	196* [191; 200]	97* [94; 104]	8,1* [7,6; 9,5]	33,8* [30,2; 36,5]	40,1* [38,4; 41,6]	0,86* [0,78; 0,89]

* – p < 0,01 щодо контролю, + – p < 0,05 щодо контролю.

Зростання вмісту холестеролу (Х) зареєстровано при етаноловій моделі в середньому у 2,4 раза (табл. 1). Особливе значення для стану мембранної структури як Х, так і систем, які регулюють його рівень у організмі. Молекула Х легко вбудовується у фосфоліпідний бішар, особливо в зони його дефектів. Специфіка структури Х забезпечує можливість взаємодії його гідроксильної групи з карбонільним киснем ацильних ланцюгів ФЛ, а також значний контакт між самими жирнокислотними ланцюгами та стероїдним кільцем молекули Х. А саме ця частина молекули відповідає за структуруючий ефект стероїду.

Аналіз співвідношення Х:ФЛ показав, що в контролі воно дорівнює 0,57, а при етаноловій виразці – 2,51 і 2,24 відповідно в першу й 8 добу. Це свідчить про порушення фізико-хімічних і динамічних властивостей ПМ.

Уведення ліпіну сприяло зниженню кількості Х.

Відповідно співвідношення Х/ФЛ знижувалося до 0,68, що свідчить про активацію відновлювальних процесів у мембранах клітин СОШ.

Отримані нами результати також показують достовірне зниження співвідношення ФХ/ЛФХ: у контролі воно було 91,75, значно знижувалося в 1-шу добу за умов етанолової виразки до 58,78 і до 67,22 у 8 добу. Суттєве підвищення цього співвідношення було при введенні ПФХ – 123,38.

У наших експериментах спостерігалася динаміка змін коефіцієнту ФХ/ФЕ. Так, співвідношення ФХ/ФЕ у контролі було 2,38, у 1-шу добу етанолової виразки знижувалося до 1,83, і на 8-му добу – до 1,77. При введенні ПФХ співвідношення ФХ/ФЕ зростало до 2,52, що свідчить про активність відновлювальних процесів у структурно-функціональних ФЛ.

Отже, захисно-приспосувальна реакція організму під дією ПФХ після впливу ульцерогенного чинника виявляється підвищенням вмісту ФЛ і зменшенням фракції Х.

Підвищення резистентності слизової оболонки шлунка під впливом поліненасиченого ФХ відбувається за рахунок гальмування структурно-функціональних пошкоджень і активації відновлювальних процесів у мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів.

Висновки. 1. За умов етанолової виразки відбувається достовірне зменшення сумарного вмісту ФЛ у клітинах СОШ щурів у порівнянні з контролем в 1,9 раза, вмісту індивідуальних ФЛ: ФХ – майже у 2 рази, ФЕ і СМ – в 1,6 раза, ФІ – в 1,4 раза. Одночасно зростає вміст холестеролу – в 2,4 раза, а співвідношення Х/ФЛ відповідно збільшується до 2,5. Указані зміни свідчать про порушення фізико-хімічних і динамічних властивостей мембран клітин СОШ за дії етанолу.

2. Уведення ПФХ на фоні розвитку етанолової виразки сприяло відновленню кількісного вмісту ФЛ до рівня норми, а також зниженню кількості холестеролу. Отже, ПФХ призводив до відновлення морфофункціональних властивостей мембран СОШ, пошкоджених етанолом.

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Метод. рекомендації. За ред. О.В. Стефанова. – К., 2001. 2. Древалі В.И., Финаин А.В., Баранник Е.А. // Укр. біохім. журн. – 1989. – Т. 61, № 2. – С. 94–97. 3. Проценко Т.Л., Хілько Т.Д., Якубцова І.В. та ін. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія – 2005. – Вип. 46. – С. 46–47. 4. Хілько Т.Д., Проценко Т.Л., Якубцова І.В., Чайка В.О. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія – 2003. – Вип. 41. – С. 120–122. 5. Циганенко А.Я. // Експерим. і клінічна мед. – 2002. – № 2. – С. 5–11. 6. Bowyer D.E., King J.P. // J. Chromatogr. – 1997. – Vol. 143, № 5. – P. 473–490. 7. Kates M. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. – Amsterdam, 1986.

Надійшла до редколегії 05.04.05

УДК 577.152.3

О. Шкрабак, асп., Г. Данилович, канд. біол. наук,
Т. Векліч, канд. біол. наук

ЛОКАЛІЗАЦІЯ "БАЗАЛЬНОЇ" Mg^{2+} -АТФази У ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН МАТКИ СВИНІ

Досліджено вплив дигітоніну на Mg^{2+} -АТФазну активність фракції плазматичних мембран. Показано внутрішньоклітинну локалізацію "базальної" Mg^{2+} -АТФази в плазматичній мембрані.

We have studied influence of digitonin on the Mg^{2+} -ATPase activity of plasmatic membranes fraction. It is shown endocellular localization of the "basal" Mg^{2+} -ATPase in a plasmatic membrane.

Вступ. У плазматичній мембрані різного типу тканин виявлено Ca^{2+} -незалежну Mg^{2+} -залежну АТФазну активність, відому в літературі як "базальна" Mg^{2+} -АТФаза. Дана активність виявляється у фракції плазматичних мембран за присутності в середовищі інкубації АТФ та іонів Mg^{2+} у мілімолярних концентраціях і відсутності іонів Ca^{2+} . Незважаючи на численні дослідження даної АТФ-гідролазної активності, у літературі існує суперечлива інформація щодо властивостей "базальної" Mg^{2+} -АТФази. Зокрема, не встановлено функцію Mg^{2+} -АТФази у клітині, мало експериментальних даних щодо вивчення кінетичних і каталітичних властивостей даного ферменту. Крім того, немає даних щодо пошуку ефективного селективного інгібітора Mg^{2+} -АТФазної активності, що ускладнює розуміння функціональної ролі даного ферменту в клітині. Mg^{2+} -залежна АТФаза плазматичної мембрани є інтегральним ферментом. Але дані стосовно локалізації активного центра даної

АТФ-гідролази для різного типу тканин суперечливі: активний центр ферменту може міститися як на зовнішній [14], так і на внутрішній поверхнях плазматичної мембрани [4; 6]. Тому активність Mg^{2+} -АТФази пов'язують з різними процесами, які відбуваються в клітині або в позаклітинному просторі. Не виключено, що Mg^{2+} -АТФаза активність може бути проявом роботи декількох ферментів [9]. Отже, актуальним на сьогодні є питання щодо ролі Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -залежної АТФазної активності плазматичної мембрани в клітині.

Матка виконує специфічну функцію в жіночому організмі – виношування плоду та пологи. Порушення функції скорочення-розслаблення міометрія може призводити до різноманітних патологій під час вагітності та при пологах. У зв'язку з чим важливим є вивчення іонних, молекулярних і мембранних механізмів контролю скоротливої функції гладенького м'яза матки. У сарколемі клітин міометрія також виявлено "базальну"

© О. Шкрабак, Г. Данилович, Т. Векліч, 2006

Mg²⁺-АТФазу [2; 11; 12]. Хоча фізіологічну роль Mg²⁺-АТФази в міоцитах не з'ясовано, не виключають, що дана активність може брати участь у регуляції концентрації протонів у міоплазмі та Ca²⁺/H⁺-обміну в мітохондріях [3]. Але в літературі відсутні дані щодо локалізації активного центра Mg²⁺-АТФази в плазматичній мембрані міоцитів. Тому метою даної роботи було з'ясування локалізації активного центра "базальної" Mg²⁺-АТФази у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин матки.

Об'єкт і методи досліджень. Об'єктом досліджень був "базальний" Mg²⁺-залежний гідроліз АТФ у фракції плазматичних мембран гладеньком'язових клітин матки.

Фракцію плазматичних мембран виділяли з міометрія свині методом диференційного центрифугування в градієнті густини сахарози [1]. Для цього 15 г тканини подрібнювали ножицями і тричі гомогенізували за допомогою ножового гомогенізатора (1 хв, 8000 об/хв) до гомогенного стану у співвідношенні тканина – розчин 1 : 4. Для гомогенізації використовували розчин такого складу: 20 ммоль/л трис-НCl (рН 7,4 при 8 °С), 0,25 моль/л сахароза, 2 ммоль/л EDTA, 0,6 моль/л KCl. Одержаний гомогенат центрифугували при 6000 g протягом 20 хв. Використовували надосадову рідину, яку нашаровували на градієнт сахарози в такій послідовності та співвідношенні: 30 % сахароза – 15 % сахароза – надосадова рідина (6 : 5 : 20). Три пробірки із системою ступінчастого градієнта центрифугували 90 хв на бакет-роторі (105000 g, 8 °С). Фракцію плазматичних мембран збирали за допомогою шприца в зоні 15 % сахарози. Отриману суспензію мембран розводили охолодженим біди-стилятом до концентрації 2,5 % сахарози й осаджували протягом 1 год при 105000 g на кутовому роторі. Отриманий осад суспендували в 3 мл середовища такого складу, ммоль/л: 20 трис-НCl-буфер (рН 7,4; 8 °С); 150 KCl, та зберігали у рідкому азоті, аліквоти розморожували одноразово. Вміст білка в мембранному препараті визначали за методом Бредфорда [8].

Незалежну від іонів кальцію Mg²⁺-АТФазу ферментативну активність ("базальну") у фракції плазматичних мембран клітин міометрія визначали при 37 °С у стандартному середовищі інкубації (об'єм 0,4 мл), що мало такий склад, ммоль/л: 1 АТФ, 3 MgCl₂, 50 NaCl, 100 KCl, 1 EGTA, 20 HEPES-трис-буфер (рН 7,4), 1 оуабаїн, 1 NaN₃, 0,1 мкмоль/л тапсигаргін, 0,1 % дигітонін. Na⁺,K⁺-АТФазу активність визначали у стандартному середовищі інкубації (об'єм 0,4 мл), ммоль/л: 1 АТФ, 3 MgCl₂, 125 NaCl, 25 KCl, 1 EGTA, 20 HEPES-трис-буфер (рН 7,4), 1 NaN₃, 0,1 мкмоль/л тапсигаргін, 0,1 % дигітонін. Na⁺,K⁺-АТФазу активність розраховували як різницю між загальною АТФазною активністю (середовище інкубації не містило оуабаїн) і "базальною" Mg²⁺-АТФазною активністю (середовище інкубації містило 1 ммоль/л оуабаїн). Кількість білка мембранної фракції у пробі становило 20 мкг, тривалість інкубації – 3 хв.

Ферментативну реакцію ініціювали введенням у реакційне середовище аліквоти (20 мкл) суспензії мембранного препарату, а зупиняли додаванням до інкубаційної суміші 1 мл розчину (t = 8 °С), що містив: 1,5 моль/л Na-ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО (рН 4,3).

У всіх дослідах контролем на неферментативний гідроліз АТФ було середовище інкубації, що мало склад, аналогічний описаному вище, але не містило фракцію плазматичних мембран. Контролем на кількість ендogenous неорганічного фосфору в мембранному препараті було середовище, яке містило тільки суспензію мембранного препарату у водному розчині. Питому загальну АТФазу ферментативну активність та питому

"базальну" Ca²⁺-незалежну Mg²⁺-АТФазу ферментативну активність, яка властива лише плазматичній мембрані, розраховували за різницею між кількістю Ф_n, що утворився в середовищі інкубації в присутності та за відсутності фрагментів плазматичної мембрани з урахуванням поправки на неферментативний гідроліз АТФ і вміст ендogenous Ф_n у мембранному препараті. Кількість продукту реакції Ф_n визначали за методом Ратбун і Бетлах [13].

Активність ацетилхолінестерази оцінювали за кількістю утвореного тіохоліну методом Елмана [10]. Використовували середовище інкубації об'ємом 1,5 мл такого складу, ммоль/л: 50 Трис-НCl (рН 7,6), 0,5 5,5-дитіобіс-2-нітробензойна кислота, 2,5 ацетилтіохолінбромід. Кількість білка в пробі дорівнювала 40–50 мкг. Реакцію ініціювали внесенням аліквоти (50 мкл) суспензії мембран, зупиняли внесенням 0,5 мл 1 % SDS. Час інкубації 10 хв при 37 °С. Контролем на кількість сульфгідрильних груп білка та неферментативне утворення тіохоліну було середовище інкубації з попередньо інактивованим мембранним препаратом.

Дигітонін (0,001–0,2 %) вносили безпосередньо в середовище інкубації.

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням загальновідомих стандартних методів [10].

Результати та їх обговорення. Раніше було показано [4], що Mg²⁺-АТФаза сарколеми гладеньком'язових клітин має властивості ферментативного H⁺-сенсора: її активність лінійно зростає при підвищенні рН середовища в діапазоні 6,0–8,0. В експериментах, виконаних на обробленій розчином дигітоніну фракції плазматичних мембран гладеньком'язових клітин із залученням специфічних інгібіторів АТФ-гідролаз (оуабаїну, азиду натрію, тапсигаргину), нами також було отримано лінійну залежність між активністю Mg²⁺-АТФази та рН у діапазоні 6,0–8,0. Отже, можна припустити, що дана АТФаза на активність може брати участь у підтримці H⁺-гомеостазу та регуляції концентрацій Ca²⁺ у міоцитах за умови локалізації її активного центра з цитоплазматичного боку плазматичної мембрани [3].

Фракція плазматичних мембран є гетерогенною за своєю топологією – містить везикули, орієнтовані цитоплазматичним боком назовні (неправильно орієнтовані) та/або всередину (правильно орієнтовані), а також розірвані фрагменти [2]. Для з'ясування локалізації активного центра "базальної" Mg²⁺-АТФази в плазматичній мембрані нами було застосовано ензиматичний метод, оснований на визначенні питомих активностей ферментів до та після обробки фракції плазматичних мембран розчинами детергенту – дигітоніну (0,001–0,2 %). Для порівняння з Mg²⁺-АТФазною активністю нами були використані ацетилхолінестераза (АХЕ) – фермент, який має зовнішньоклітинну локалізацію, та Na⁺,K⁺-АТФаза, активний центр якої знаходиться на внутрішній поверхні плазматичної мембрани [5].

Питома ферментативна активність АХЕ в плазматичній мембрані клітин міометрія до обробки дигітоніном становила 7,6 ± 1,4 мкмоль АТХ / мг білка за 1 год, Na⁺,K⁺-АТФази та Mg²⁺-АТФази – 2,0 ± 1,3 та 8,6 ± 2,5 мкмоль Ф_n / мг білка за 1 год відповідно. При дії дигітоніну активність АХЕ зростала на 20 ± 3 % (до 8,8 ± 1,9 мкмоль АТХ / мг білка за 1 год, n = 6). Максимальний ефект дигітоніну спостерігали при концентрації детергенту 0,005 %, подальше збільшення концентрації дигітоніну не впливало на активність АХЕ. Максимальну активацію Mg²⁺-АТФази спостерігали при концентрації дигітоніну 0,1 % – ферментативна активність зростала на 50 ± 6 % (до 14,1 ± 3,5 мкмоль Ф_n / мг

білка за 1 год, $n = 6$). При внесенні в середовище інкубації дигітоніну активність Na^+, K^+ -АТФази зростає на $83 \pm 10\%$ (максимальна активність спостерігалась

при концентрації детергенту $0,1\%$ і дорівнювала $8,7 \pm 1,6$ мкмоль P_i / мг білка за 1 год, $n = 5$). Дані типового експерименту наведено на рис. 1.

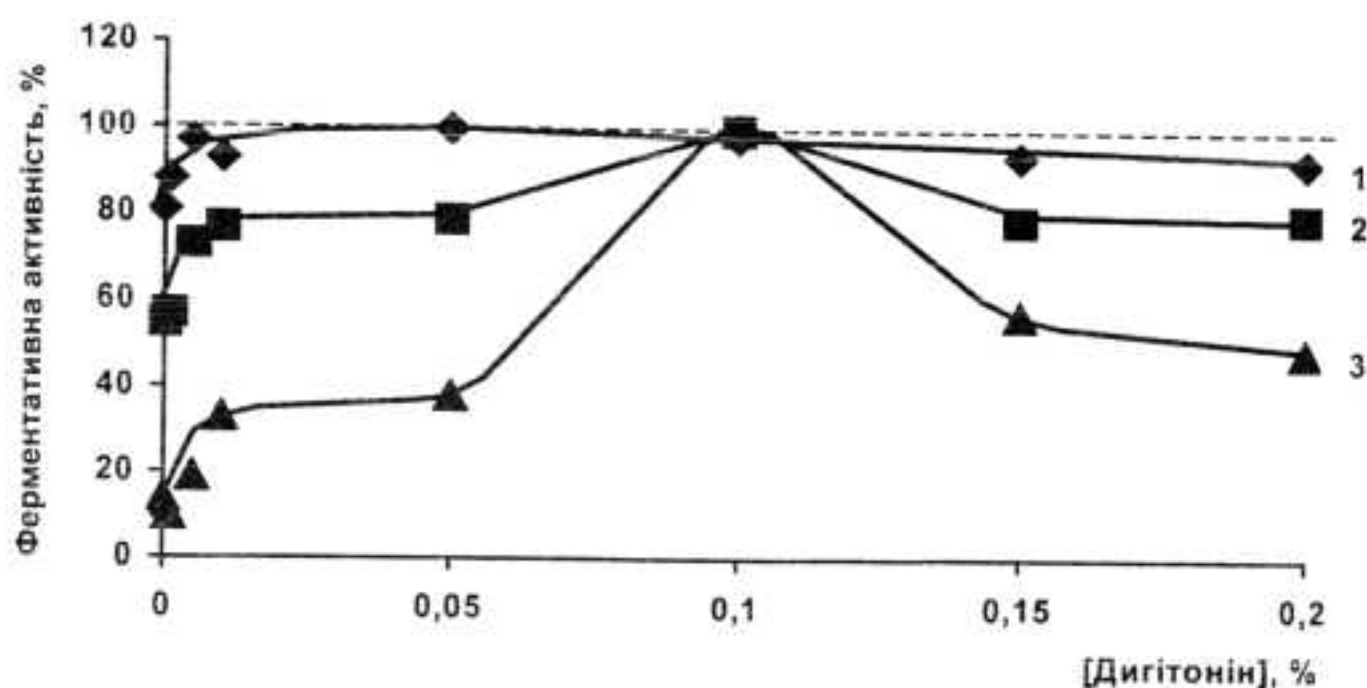


Рис. 1. Вплив дигітоніну на ферментативну активність в плазматичній мембрані клітин міометрія (1 – ацетилхолінестераза, 2 – "базальна" Mg^{2+} -АТФаза, 3 – Na^+, K^+ -АТФаза). За 100 % узятो рівень максимальної активації ферменту

Якщо Mg^{2+} -АТФаза має зовнішньоклітинну локалізацію активного центра, її активація має бути подібна до активації АХЕ, а саме при дії дигітоніну відкривається в середньому 20 % неправильно орієнтованих везикул (активність АХЕ зростала на 20 %), відповідно 80 % склали правильно орієнтовані везикули і розірвані фрагменти.

Оскільки активний центр Na^+, K^+ -АТФази має внутрішньоклітинну локалізацію, можна припустити, що частка неправильно орієнтованих везикул і розірваних фрагментів у мембранному препараті становить у середньому 17 %, а 83 % везикул правильно орієнтовані (активність Na^+, K^+ -АТФази зростала на 83 %), що збігається з кількістю визначеною за АХЕ – 20 % і 80 % відповідно. Але для Na^+, K^+ -АТФази спостерігаємо збільшення активності не тільки за рахунок розмикання везикульованих структур і "зняття латентності", а й активуючу дію дигітоніну (активність ферменту зростає в середньому в 4,4 раза). Це може бути зумовлено видаленням за дії детергенту ферментативно неактивного білка, що забезпечує більш вільний доступ субстратів реакції до відповідних центрів цього мембранозв'язаного ферменту [5]. Тобто використовуючи Na^+, K^+ -АТФазу як маркерний фермент цитоплазматичного боку мембрани не можна визначити точне співвідношення правильно орієнтованих везикул і неправильно орієнтованих: розірваних фрагменти мембран.

У зв'язку з тим, що активність Mg^{2+} -АТФази під час дії дигітоніну зростає в середньому на 50 %, то кількість неправильно орієнтованих везикул, визначених за активацією Mg^{2+} -АТФази (за умови, що її активний центр міститься із зовнішнього боку плазматичної мембрани), перевищує в 2,5 раза кількість неправильно орієнтованих везикул, визначених за активацією АХЕ. Відповідно кількість правильно орієнтованих везикул і розірваних фрагментів дорівнює теж 50 %, що в 1,6 раза менше, ніж було визначено за активацією АХЕ. Отже, можна припустити, що активний центр Mg^{2+} -АТФази не може локалізуватись подібно до АХЕ. Якщо ж активний центр Mg^{2+} -АТФази знаходиться на цитоплазматичному боці мембрани, тоді 50 % Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ відбувається за рахунок неправильно орієнтованих везикул і розірваних фрагментів, а за дії дигітоніну відкривається 50 % правильно орієнтованих везикул. Відповідно 30 % склали розірвані фрагменти плазматичної

мембрани. Можна простежити подібність впливу дигітоніну на "базальну" Mg^{2+} -АТФазу та Na^+, K^+ -АТФазу. Хоча, як видно, "базальна" Mg^{2+} -АТФаза може бути кращим за Na^+, K^+ -АТФазу маркерним ферментом цитоплазматичного боку мембрани міоцитів. Її активність разом з активністю АХЕ можна використовувати як тест на орієнтацію мембранних везикул.

Отже, аналізуючи вплив дигітоніну на АХЕ – фермент із зовнішньоклітинною локалізацією активного центра, Na^+, K^+ -АТФазу – мембранозв'язаний фермент, активний центр якого розташований з цитоплазматичного боку мембрани, можна припустити, що "базальна" Mg^{2+} -АТФаза локалізується з цитоплазматичного боку плазматичної мембрани клітин міометрія.

Висновки. Показано, що обробка дигітоніном фракції сарколеми міометрія в діапазоні концентрацій $0,001$ – $0,1\%$ приводить до зростання активності Ca^{2+} -незалежної Mg^{2+} -АТФази, а подальше збільшення концентрації детергенту до $0,2\%$ – до зниження активності ферменту.

Подібність впливу дигітоніну на "базальну" Mg^{2+} -АТФазу та Na^+, K^+ -АТФазу плазматичної мембрани, яка є маркером внутрішньої поверхні плазматичної мембрани, може свідчити на користь можливої локалізації активного центра Mg^{2+} -АТФази з цитоплазматичного боку сарколеми клітин міометрія.

1. Кондратюк Т.П., Быченко С.Ф., Прищепа Л.А. и др. // Укр. біохім. журн. – 1986. – Т. 58, № 4. – С. 50–56.
2. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К., 1990.
3. Костерин С.А. // Укр. біохім. журн. – 1998. – Т. 70, № 6. – С. 152–160.
4. Костерин С.А., Браткова Н.Ф., Зимица В.П. // Биохимия. – 1995. – Т. 50, № 9. – С. 1450–1459.
5. Кравцов А.В., Алексеев И.Р. Механизмы регуляции векторных ферментов биомембран. – К., 1990.
6. Мензиков С.А., Мензикова О.В. // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 3. – С. 38–43.
7. Плохинский В.М. Математические методы в биологии. – М., 1981.
8. Bradford M.M. // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–252.
9. Cunningham H.B., Yazaki P.J., Domingo R.C. et al. // Arch. Biochem. Biophys. – 1993. – Vol. 303, № 1. – P. 32–43.
10. Ellman G.L., Courtney K.D., Valentino A.V. et al. // Biochem. Pharmacology. – 1961. – Vol. 7. – P. 88.
11. Magocsi M., Penniston J.T. // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – Vol. 1070, № 1. – P. 163–172.
12. Missiaen L., Wuytack F., Casteels R. // Biochem. J. – 1988. – Vol. 250. – P. 571–577.
13. Rathbun W., Betluch V. // Anal. Biochem. – 1969. – Vol. 28. – P. 436–445.
14. Zhao D., Dhalla N.S. // Arch. Biochem. Biophys. – 1988. – Vol. 263, № 2. – P. 281–292.

УДК 577.1

І. Новікова, асп., Т. Паршикова, д-р біол. наук

ВПЛИВ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМУ НА ЖИТТЄДІЯЛЬНІСТЬ *CHLORELLA VULGARIS* BEJER., STR. ЛАРГ-3

Досліджено вплив Cr (VI) на життєдіяльність водорості *Chlorella vulgaris* Bejer. str. Установлено, що концентрації Cr (VI) до 0,05 мг/л стимулюють розвиток клітин *Chlorella vulgaris*, що свідчить про потребу в ньому як у мікроелементі. Збільшення концентрації токсиканта вище 0,05 мг/л викликає порушення темпів біосинтезу хлорофіла а та падіння ΔF .

Influence Cr (VI) on ability to live ьшкщфдны *Chlorella vulgaris* Bejer is investigated. It has been established, that concentration Cr (VI) up to 0,05 mg/l stimulate development of cells *Chlorella vulgaris*, that testifies about need for it as in a microelement. Increase of concentration of toxicant above 0,05 mg/l causes infringement of rates to biosynthesis of a chlorophyll a and falling ΔF .

Вступ. Відомо, що сполуки шестивалентного хрому у водному середовищі проявляють токсичність для організмів різного рівня організації. Вважають також, що біхромати більш отруйні, ніж хромати [2]. Характер дії важких металів на водорості залежить від багатьох факторів, а саме: їхньої концентрації, фізико-хімічних властивостей середовища, фізіологічного стану, видової чутливості об'єкта. Метою нашої роботи було дослідження індивідуальної стійкості та життєздатності зеленої водорості *Chlorella vulgaris* Bejer. str. ЛАРГ-3 у присутності шестивалентного хрому.

Об'єкт і методи досліджень. Досліди проводили з клітинами *Chlorella vulgaris* Bejer. штам ЛАРГ-3 (*Chlorophyta*) з колекції HPDP Інституту гідробіології НАН України. Культуру водорості вирощували на середовищі Тамія при 20 ± 2 °C та освітленості 6,6–7,4 Вт/м² (тривалість світла й темряви – 12/12 год). Для дослідів використовували культуру на логарифмічній стадії росту.

Шестивалентний хром додавали в суспензію у вигляді $K_2Cr_2O_7$ у концентраціях від 0,05 мг/л (гранично допустима) до 135 мг/л, яка реально зареєстрована в рибогосподарських ставках [4]. Експериментальні виміри фізіологічних показників проводились на 1, 4 та 7 добу контакту клітин водорості з хромом. Кількість пігментів визначали методом диференціальної флуориметрії з використанням Planctofluorometer 300 3M [1]. Паралельно визначали показник ΔF – ступінь життєздатності клітин та їхню потенційну фотосинтетичну активність.

Математичне опрацювання одержаних результатів здійснювали з використанням методів статистичного аналізу [3]. Висновки робили за допомогою критерію Стюдента при довірчій ймовірності $P = 0,95$.

Результати та їх обговорення. Як свідчать проведені досліди, через одну добу контакту клітин водорості з хромом (рис. 1) реєструвалось зниження концентрації хлорофілу а порівняно з контролем. Для низьких концентрацій це відмічалось на рівні 19,4 % (для концентрацій 0,05 та 15 мг/л). Однак при подальшому збільшенні вмісту хрому відбувалось істотніше зниження концентрації хлорофілу а (від 37,7 % для концентрацій від 60 до 105 мг/л до 63,3–76,5 % для концентрацій 120 і 135 мг/л).

Значення показника ΔF свідчило, що в цих умовах водорості продовжували ще повноцінно фотосинтезувати навіть за найбільших діючих концентрацій (рис. 2).

При подовженні контакту клітин водорості з хромом до 4-х діб для концентрацій від 0,05 до 15 мг/л зареєстровано навіть деяке стимулювання біосинтезу хлорофілу. Це збігається з особливостями дії шестивалентного хрому, яку спостерігали інші дослідники для сільськогосподарських рослин [2]. Для концентрацій хрому від 30 до 135 мг/л відмічено зменшення вмісту хлорофілу від 34 до 75 %. Спостерігалось також зниження показника ΔF для всіх досліджених концентрацій у середньому від 22 (для 0,05 мг/л) до 48 % (для 105 мг/л).

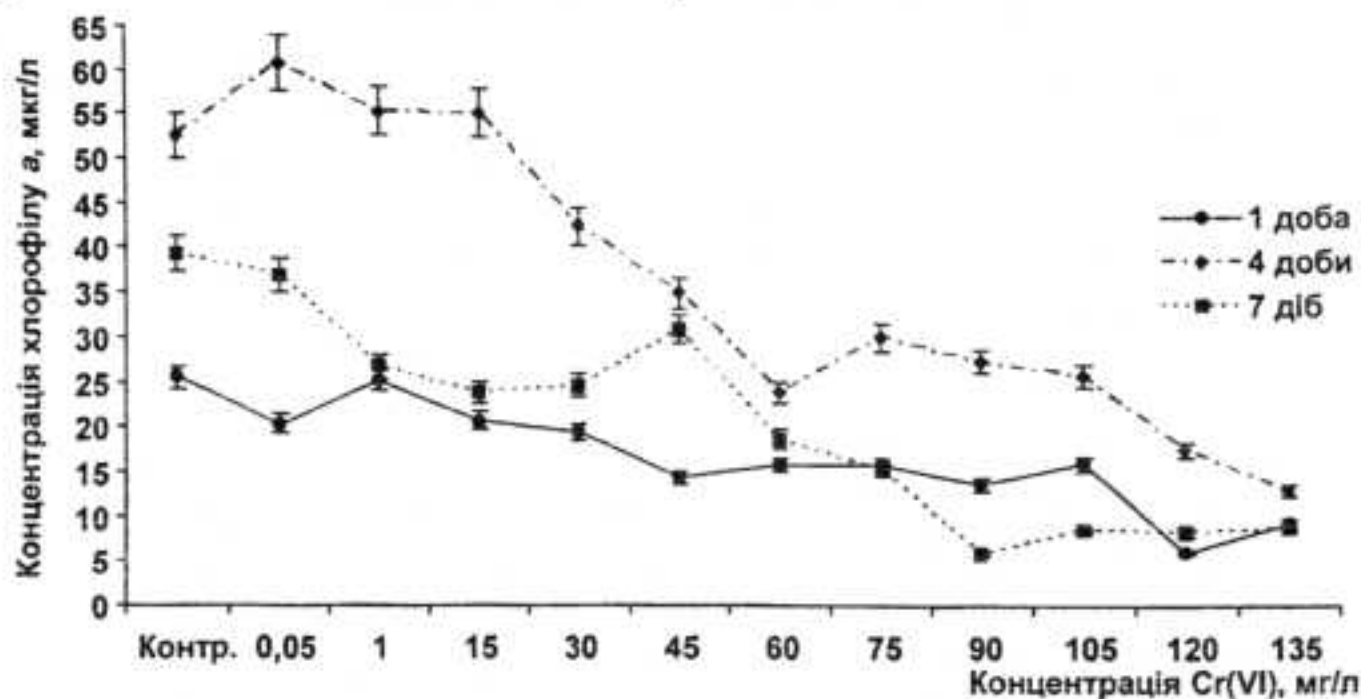


Рис. 1. Зміни концентрації хлорофілу а у *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3 під дією Cr (VI)

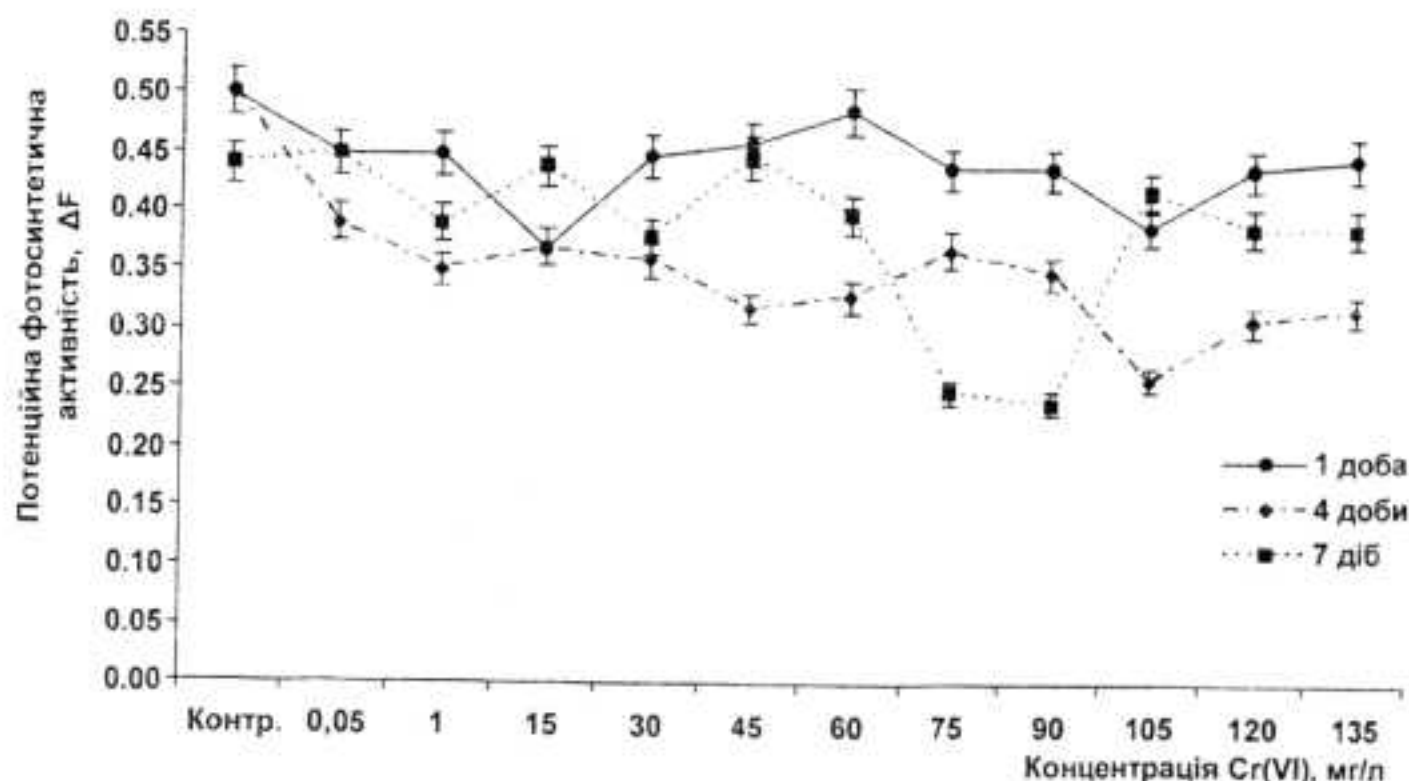


Рис. 2. Зміни потенційної фотосинтетичної активності у *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3 під дією Cr(VI)

При збільшенні тривалості контакту клітин з хромом до 7 діб спостерігалось підвищення його токсичності. Відмічено зниження синтезу хлорофілу а порівняно з контролем від 7 % (для низьких концентрацій) до 85 % для концентрацій 90–135 мг/л. Коливання величини ΔF свідчило про збільшення гетерогенності суспензії водоростей. Прояву гетерогенності, на нашу думку, сприяв процес грудкування клітин з утворенням їхніх кулеподібних скупчень, видимих неозброєним оком. Зазначений процес агрегації клітин було зареєстровано вже за концентрації хрому 1 мг/л. Чіткість прояву агрегації збільшувалась за концентрацій хрому в межах 30–90 мг/л. На нашу думку, процес агрегації клітин можна розглядати як їхню захисну реакцію, що сприяє збереженню *Chlorella* життєздатності всередині сформованих агрегатів. Підвищення вмісту хрому до 90 мг/л зменшувало темпи грудкування водорості та сприяло утворенню дисперсних суспензій клітин, більшість яких втрачала життєздатність.

Висновки. Підсумовуючи викладене, можна зазначити, що концентрації шестивалентного хрому до 0,05 мг/л навіть стимулюють розвиток клітин, що свідчить про потребу в ньому як у мікроелементі. Збільшення концентрацій шестивалентного хрому вище

0,05 мг/л викликало порушення темпів біосинтезу хлорофілу а та падіння рівня потенційної фотосинтетичної активності. Збільшення часу контакту клітин з хромом посилює його токсичність для клітин *Chlorella*.

Є підстава вважати, що захисною реакцією для нездатних до самостійного руху клітин водоростей у разі дії різноманітних токсикантів є утворення їхніх скупчень унаслідок агрегації. Утворення макроскопічних агрегатів, на нашу думку, допомагає збереженню життєздатності клітин водорості. А в процесі тривалої еволюції формування агрегатів могло бути одним із перших етапів формування багатоклітинних організмів.

1. Гольд В.М., Гавський Н.А., Григорьев Ю.С. и др. Теоретические основы и методы изучения флуоресценции хлорофилла. – Красноярск, 1984.
2. Дмитриева А.Г., Кожанова О.Н., Дронина Н.Л. Физиология растительных организмов и роль металлов. – М., 2002.
3. Лапач С.Н., Губанко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL. – К., 2000.
4. Хамар І.С. Водорості рібницьких ставів як біоіндикатори їх забруднення // Гідроекологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень: теорія, методи, практика використання. – Львів, 1995.

Надійшла до редколегії 20.09.05.

УДК 631.466.472:635.112

А. Кондратюк, студ., І. Костіков, д-р біол. наук

ЕДАФОФІЛЬНІ ВОДРОСТІ РИЗОСФЕРИ ЦУКРОВОГО БУРЯКА

У ризосфері цукрового буряка лісостепової зони України було виявлено 16 видів ґрунтових водоростей. Уперше знайдено нову для ґрунтів України синьозелену водорість *Stigonema intermedia* Kondrat.

16 soil algae species were revealed in sugar-beet rhizosphere of Forest-Steppe Ukraine. Among them cyanobacteria *Stigonema intermedia* Kondrat. is a new for Ukrainian soils.

Вступ. На території України водорості окультурених ґрунтів, порівняно з природними фітоценозами, вивчені недостатньо й нерівномірно. Найповніше досліджено водорості в агроценозах степової зони. Проте для деяких регіонів, зокрема Лісостепу, Полісся, Гірського Криму, Карпат, відомості щодо водоростей окультурених ґрунтів майже відсутні [5]. Ґрунтово-альгологічні дослідження екологічного спрямування показали, що основна маса водоростей концентрується в ризосфері

вищих рослин, обумовлюючи так званий "ризосферний ефект", унаслідок якого за узагальненими даними чисельність водоростей у ризосфері культурних рослин, зазвичай у 2–3 рази перевищує цей показник у ґрунті, за межами ризосфери [2; 5; 7]. Відомо, що водорості активно взаємодіють з ризосферою і виявляють щодо неї різнопланові стимулюючі ефекти [3; 7].

На території України, у тому числі й у лісостеповій зоні, цукровий буряк належить до провідних технічних

© А. Кондратюк, І. Костіков, 2006

культур [6, с. 326], але альгофлора його ризосфери залишається невивченою. Метою цієї роботи було отримання відомостей про склад ґрунтових водоростей у ризосфері цукрового буряка в умовах лісостепо-вої зони України.

Об'єкт і методи досліджень. Матеріалом для даної роботи був ґрунт, відібраний з ризосфери рослин цукрового буряка в жовтні 2003 р. з поля в околицях с. Крупець (Рівненська область, Радивилівський район). Відбір проб ґрунту з поверхні коренеплоду цукрового буряка проводили в стерильних лабораторних умовах. Ґрунт брали безпосередньо з коріння, знімаючи ґрунто-ві структурні часточки з невеликих корінців. Водорості виявляли за методом накопичувальних культур (на агаризованому середовищі Болда з потрійним вмістом азоту). Далі з цих культур виділяли альгологічно чисті культури, за якими проводили ідентифікацію видового складу методами оптичної мікроскопії [8]. При підготовці культур до мікроскопії нарощування матеріалу проводили за загальноприйнятими для даної процедури умовами: на люміостаті з періодичним освітленням інтенсивністю 2000 лк і 12/12-годинним чергуванням світлової та темної фаз, при температурі 18–22 °C [1; 4].

Результати та їх обговорення. У результаті проведе-них дослідів у зразках з ризосфери цукрового буряка

було виявлено 16 видів водоростей з чотирьох відділів: Cyanophyta – 2 види (*Stigonema intermedia* Kondrat. (рис. 1, г), *Oscillatoria limosa* Agardh), Xanthophyta – 2 (*Xanthonema exile* (Klebs) Silva (рис. 1, д), *Heterococcus viridis* Chodat (рис. 1, е), Bacillariophyta – 2 (*Navicula* sp., *Pinnularia* sp.), Chlorophyta – 10 (*Chlorella kessleri* Fott et Nováková, *Ch. luteoviridis* Chodat, *Ch. vulgaris* Beijerinck, *Halochlorella rubescens* Dangeard, *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova, *Mychonastes homosphaera* (Skuja) Kalina, *Chlamydomonas* sp., *Chlamydomonas bourrellyi* Ettl, *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva, *Tetracystis isobilateralis* Brown et Bold (рис. 1, а–в). За відносною чисельністю, визначеною за кількістю ізолюваних ко-лоній на агарі, у ризосфері цукрового буряка найрясні-ше були представлені види роду *Chlorella* Beijer.: *Ch. vulgaris* Beijer., *Ch. luteoviridis* Chodat, *Ch. kessleri* Fott. Серед ізолюваних штамів було виявлено кілька рідкіс-них і цікавих видів, а саме: нова для ґрунтів України синьозелена водорість *Stigonema intermedia* Kondrat., нетипові для ґрунтів агроценозів жовтозелені водорості *Heterococcus viridis* Chodat і *Xanthonema exile* (Klebs) Silva, зелена водорість *Chlamydomonas bourrellyi* Ettl, яка раніше не була знайдена у ґрунтах агроценозів.

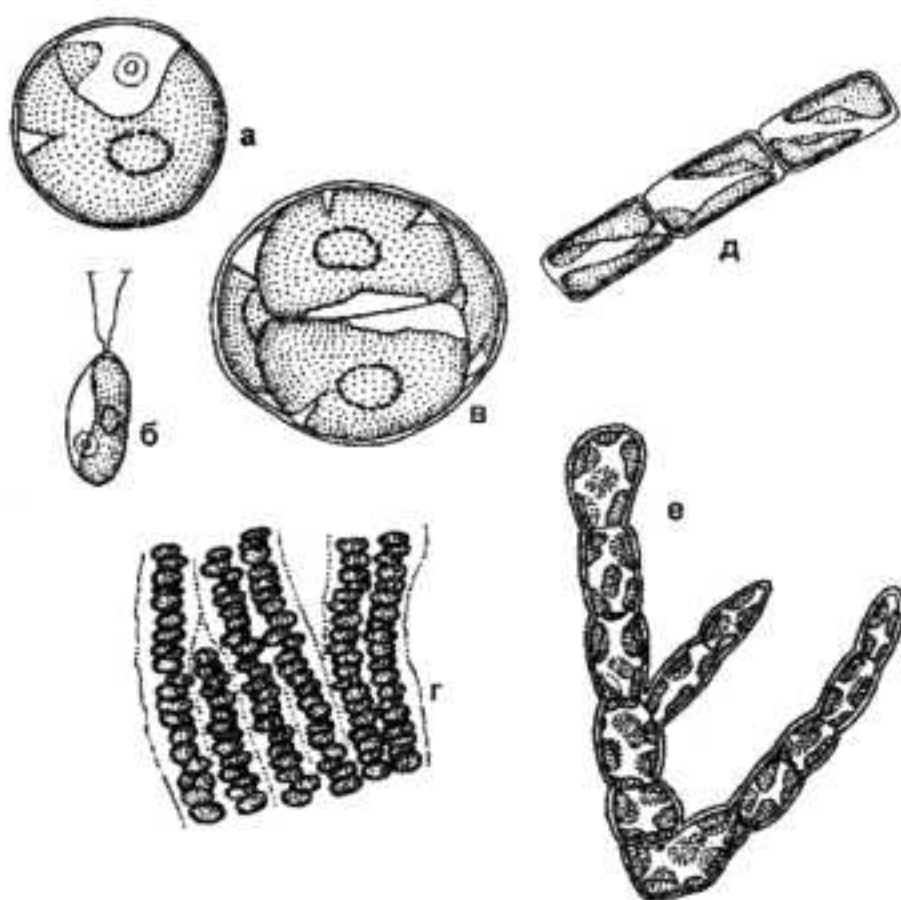


Рис. 1: *Tetracystis isobilateralis* (а – вегетативна клітина, б – зооспора, в – тетрада); *Stigonema intermedia* (г); *Xanthonema exile* (д); *Heterococcus viridis* (е)

Висновки. У зразках ґрунту з ризосфери цукрового буряка було виявлено 16 видів водоростей з чотирьох відділів: Cyanophyta – 2 види, Xanthophyta – 2, Bacillariophyta – 2, Chlorophyta – 10 видів. Домінували в досліджених зразках види роду *Chlorella*. Уперше знай-дено нову для ґрунтів України синьозелену водорість *Stigonema intermedia*. Виявлено ряд нетипових для ґру-нтів агроценозів водоростей: жовтозелені – *Heterococcus viridis* та *Xanthonema exile*, а також зелена водорість *Chlamydomonas bourrellyi*.

1. Андреева В.М. Почвенные и аэрофитные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). – СПб., 1998.
2. Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. – Л., 1969.
3. Изучение водорослей как компонентов биогеоценоза // Программа и методика биогеоценологических исследований / Под ред. Н.В. Дылис – М., 1974.
4. Кондратьева Н.В. Визначник синьозелених водоростей Української РСР. – К., 1968.
5. Костіков І.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М. та ін. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). – К., 2001.
6. Шпаар Д., Дрезер Д., Захарченко А. и др. Сахарная свекла (выращивание, уборка и хранение) / Под общ. Ред. Д. Шпаара. – Минск, 2004.
7. Штина Э.А., Голлербах М.М. Экология почвенных водорослей. – М., 1976.
8. Charles L. Divan, Heinrich K. // Appl. and Environ. Microbiol. – 1982. – Juli. – P. 250–254.

Надійшла до редколегії 02.02.06

УДК 582.572.8:581.4

Н. Карпенко, канд. біол. наук, В. Баданіна, канд. біол. наук

МОРФОЛОГІЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДІВ *CORONILLA* L., *HIPPOCREPIS* L., *SECURIGERA* DC. ТРИБИ *CORONILLEAE* ФЛОРИ УКРАЇНИ НА РАННІХ ЕТАПАХ ОНТОГЕНЕЗУ

Наведено морфологічні описи молодих рослин 12 видів родів *Coronilla* L., *Hippocrepis* L. та *Securigera* DC. (Fabaceae). Зроблено припущення про доцільність перенесення виду *C. emeroides* Boiss. et Sprun. до роду *Hippocrepis*, а *Coronilla varia*, *C. cretica*, *C. parviflora* та *C. elegans* до роду *Securigera*.

The morphological description of 12 species of the genera *Coronilla* L., *Hippocrepis* L. and *Securigera* DC. (Fabaceae) were presented. It is made a supposition about expediency to transfer *C. emeroides* Boiss. et Sprun. into the genus *Hippocrepis* and *Coronilla varia*, *C. cretica*, *C. parviflora*, *C. elegans* into the genus *Securigera*.

Вступ. Вивчення життєвих форм квіткових рослин має велике значення для систематики і філогенії. Результати біоморфологічних досліджень широко використовуються для порівняння і розмежування таксонів різного рангу, оскільки більшість параметрів біоморфоструктури є діагностичними на рівні родів, секцій, а іноді й видів, а також придатні для виявлення філогенетичної спорідненості між групами рослин. Таким чином, вивчення морфології проростання дає нам цінний матеріал для уточнення систематичного положення різних таксономічних груп рослин.

Зважаючи на повільність зміни в ході еволюції ранніх стадій, ми можемо очікувати, що в сім'ядолях і перших листках буде спостерігатися тенденція до збереження ряду більш або менш давніх особливостей, які є спільними для тих чи інших груп рослин. До числа таких особливостей належить форма сім'ядоль, яка постійна в межах родів, та перших справжніх листків. Але й існують різні форми сім'ядоль усередині роду. В інших випадках при різних формах сім'ядоль усередині роду вони схожі в межах, наприклад, секцій. Можливо, останній випадок належить до родів недавнього походження, які перебувають у періоді свого бурхливого розвитку, з подальшим (у майбутньому) уособленням їхніх окремих груп. В усякому разі, форма сім'ядоль у багатьох випадках може слугувати показником генетично близьких груп рослин [1–4].

Форма перших листків у деяких родів може мати великі відхилення і відрізняється в окремих видів; в інших випадках, навпаки, вона константна навіть для груп родів. Можливо, перші листки зберігають давні особливості і наближаються до форм предкових типів. Такі їхні ознаки, як положення та кількість, що визначаються рано закладеними зачатками перших листків, є й більш константними, спільними для груп рослин (як роди, триби).

Метою нашої роботи було дослідити морфологічні особливості проростків 12 видів родів *Coronilla*, *Securigera* і *Hippocrepis*, отриманих *ex situ* та виявити відмінності між ними для уточнення їхнього систематичного положення.

Об'єкти й методи досліджень. Для пророщування нами були використані зразки насіння, отримані з ботанічних установ Європи й зібрані в місцях природного зростання на території України, а саме: *Coronilla emeroides* Boiss. et Sprun. №11 – Україна, АР Крим, с. Малий Маяк; *C. valentina* L. (цей вид не є представником флори України, але за Лассеном [7] узятий як типовий для роду *Coronilla* замість *C. varia* L.) № 31 – Італія, ботанічний сад університету м. Генуї; *C. coronata* L. № 2 – Україна, Тернопільська обл., с. Гутисько; *C. scorpioides*

(L.) Koch. №55 – Україна, АР Крим, Нікітський ботанічний сад; *C. cretica* L. № 2 – Україна, АР Крим, Нікітський ботанічний сад; *C. varia* L. № 4 – Україна, АР Крим, с. Малий Маяк; *C. elegans* Panc. № 2846 – Німеччина, ботанічний сад університету м. Єни; *C. parviflora* Willd. № 1168 – Данія, ботанічний сад м. Копенгагена; *Hippocrepis comosa* L. № 58 – Україна, Тернопільська обл., с. Гутисько; *H. biflora* Spreng. № 53 – Україна, АР Крим, Нікітський ботанічний сад; *H. ciliata* Willd. № 749 – Німеччина, ботанічний сад університету м. Гутенберга; *Securigera securidaca* (L.) Degen et Döerfl. № 4 – Україна, АР Крим, м. Партеніт.

Молоді рослини досліджували за загальноприйнятою програмою вивчення життєвих форм [5]. Вивчалася форма сім'ядоль і перших листків проростків, форма та кількість листочків на рахісі, розміри епикотилія, гіпокотилія та інші ознаки. Назви видів подано, як указано у виданні [6] та уточнено відповідно до систематичного зведення С.Л. Мосякіна та М.М. Федорончука [7, с. 210, 211, 213, 217, 219].

Результати та їх обговорення. *Морфологія представників роду Coronilla L. у ранніх вікових станах онтогенезу.* 13-барвлення проростків в усіх досліджених видів роду *Coronilla* зелене, рідше – із сизуватим відтінком. Форма сім'ядоль варіює від лопатоподібних до видовжено-обернено-яйцеподібних і овально видовжених, при основі звужених у черешок. Варіює й форма першого листка проростків і ювенільних рослин у межах роду: є види з простим, трійчастим і трійчасто-складним першим листком. Епикотиль в одних видів добре виражений, а в інших – відсутній.

Нижче наведено описи рослин досліджених видів даного роду на ранніх етапах онтогенезу.

Coronilla coronata L. Проростки зелені, із сизуватим відтінком. Сім'ядолі обернено-яйцеподібні, при основі поступово звужені в короткий черешок. Жилка помітна з нижнього боку листка, не досягає верхівки пластинки. Гіпокотиль зелений, з рожевуватим відтінком. Епикотиль добре виражений, із сизувато-рожевим відтінком. Перший листок простий, м'ясистий, округло-яйцеподібний, на верхівці з глибокою тупою виїмкою, з коротким черешком. Другий листок подібної форми, також черешковий.

C. scorpioides. Проростки зелені, із сизуватим відтінком. Сім'ядолі, на відміну від попереднього виду, видовжено-обернено-яйцеподібні, при основі поступово звужені в короткий черешок. Гіпокотиль рожевий, із сизуватим відтінком, епикотиль зелений. Епикотиль приблизно в 2,5 рази коротший за епикотиль *C. coronata*. Перший листок ювенільних рослин простий, м'ясистий,

© Н. Карпенко, В. Баданіна, 2006

обернено-яйцеподібний, до основи поступово звужений, але сидячий. Другий листок такої самої форми.

C. valentina. Проростки зелені, із сизуватим відтінком. Сім'ядолі обернено-яйцеподібні, при основі звужені в короткий черешок. Гіпокотиль рожевий, із сизуватим відтінком. Епикотиль добре виражений, сизувато-зелений. Перший листок складається із трьох листочків, черешковий, листочки на коротеньких черешечках. Нижні листочки обернено-яйцеподібні, до основи звужені, асиметричні, верхній – у 1,5 рази більший, обернено-серцеподібний, симетричний. Жилка доходить до верхівки листових пластинок і коротко виступає. Другий листок такої самої форми.

C. emeroides. Проростки мають зелене забарвлення. Сім'ядолі за формою овально-видовжені, з добре вираженими черешками. Сім'ядольна жилка не виражена. Гіпокотиль зелений, зрідка з антоціановим забарвленням. Епикотиль добре виражений, майже вдвічі довший, ніж у *C. valentina*, зелений, опушений білуватими волосками. Перший листок трійчастий, черешковий. Нижні листочки обернено-яйцеподібні, до основи звужені, черешкові; пластинки та черешки при основі розсіяно опушені простими, довгими, притиснутими, білуватими волосками. Верхній листочок більший, широко-обернено-яйцевидний, до основи поступово звужений, на верхівці виїмчастий, з поодинокими волосками. Жилка доходить до верхівки, не випукла, слабо виділяється. Черешок середнього розміру, з малою кількістю волосків.

C. varia. Проростки мають зелене забарвлення. Сім'ядолі обернено-яйцеподібні, при основі звужені в короткий черешок. Гіпокотиль, черешки і черешечки з червонуватим відтінком. Епикотиль відсутній. Перший листок трійчастий, на довгому жолобкоподібному черешку; листочки від обернено-яйцеподібних до обернено-трикутних, однакові за розміром, на коротких червонуватих черешечках. Другий листок подібної форми.

C. elegans. Проростки мають зелене забарвлення. Сім'ядолі обернено-яйцеподібні, при основі звужені в черешок. Жилка виступає на абаксiальному боці, до верхівки не доходить. Короткий епикотиль і середньої довжини черешки – з антоціановим забарвленням. Гіпокотиль зелений. Перший листок трійчастий. Листочки обернено-серцеподібні, з добре вираженим жилкуванням, на коротеньких зелених черешечках. Жилка виступає на абаксiальному боці, доходить до верхівки. Другий листок теж трійчастий.

C. cretica. Проростки із зеленим забарвленням. Сім'ядолі видовжено-обернено-яйцеподібні, поступово звужені в черешок. Гіпокотиль, черешки та черешечки з антоціановим забарвленням. Епикотиль відсутній. Перший листок ювенільних рослин трійчастий, на довгому жолобкоподібному черешку. Листочки широкі, округло-обернено-трикутні, з клиноподібною основою, на верхівці виїмчасті, на черешечках. На верхньому боці листочків над жилкою виділяється світла смуга. Жилка широка, випукла на абаксiальному боці, доходить до верхівки. Черешечки поперечно зморшуваті, опушені простими, короткими, нечисленними волосками, які іноді зустрічаються також на черешку. Другий листок іматурних рослин непарнопери́стий, складається з п'яти листочків, на коротких черешечках, з виступаючими жилками.

C. parviflora. Проростки із зеленим забарвленням. Сім'ядолі лопаткоподібні, поступово звужені у черешок. Жилка дещо виступає, до верхівки не доходить. Епикотиль відсутній, гіпокотиль зелений. Перший лис-

ток ювенільних рослин трійчастий, на довгому черешку. Листочки від обернено-трикутних до обернено-яйцеподібних. Другий листок іматурних рослин непарнопери́стий, складається із п'яти листочків, верхній з яких дрібніший, при основі клиновидно-звужений, нижні – обернено-яйцеподібні, при основі звужені, на верхівці слабо виїмчасті, іноді зі слабо виступаючою жилкою. Черешечки червонуваті.

Таким чином, дослідження морфологічних особливостей представників роду *Coronilla*, що перебувають на ранніх етапах онтогенезу, показало, що в межах даного роду існують групи видів, які відрізняються за морфологічними ознаками.

Морфологія представників роду *Hippocrepis* L. на ранніх етапах онтогенезу. Для досліджених видів роду *Hippocrepis* характерні рослини зеленого забарвлення з видовжено-еліптичними або лінійними сидячими сім'ядолями, трійчастими довгочерешковими першими листочками, з більшим верхнім листочком, негустим опушенням листочків по жилці та по краю, а також невираженістю епикотилію. Нижче наведено описи рослин досліджених видів даного роду в ранніх вікових станах.

H. comosa. Проростки мають зелене забарвлення. Сім'ядолі сидячі, видовжено-еліптичні. Гіпокотиль короткий, рожевий. Епикотиль відсутній. Перший листок трійчастий, довгочерешковий. Листочки на коротких черешечках; нижні – дещо асиметричні, обернено-яйцеподібні, при основі звужені, верхній – більший, обернено-серцеподібний, при основі клиноподібний. Жилка з абаксiального боку та краї листочків коротко опушені простими волосками. Черешечки без антоціанового забарвлення. Другий листок також трійчастий.

H. biflora. Проростки мають зелене забарвлення. Сім'ядолі сидячі, лінійні, з жолобком на адаксiальному боці. Гіпокотиль рожевий. Епикотиль відсутній. Перший листок ювенільних рослин трійчастий, довгочерешковий. Черешок тоненький, жолобкоподібний, рідко опушений довгими волосками. Листочки на коротеньких світло-зелених черешечках; нижні – округлі, дещо асиметричні, верхній – більший, симетричний, овальний, при основі завужений. Жилка виступає на абаксiальному боці, досягає верхівки пластинки. З абаксiального боку листочків по жилці та по краю спостерігається негусте опушення з коротких прости́х волосків, з адаксiального боку опушення відсутнє. Другий листок іматурних рослин – із п'яти листочків, верхній з яких – більший.

H. ciliata. Проростки із зеленим забарвленням. Сім'ядолі сидячі, лінійні, жолобковидні. Жилка не виділяється. Гіпокотиль рожевий. Епикотиль відсутній. Перший листок ювенільних рослин трійчастий, нижні листочки – асиметричні, овальні, верхній – більший, симетричний, обернено-серцеподібний, при основі вузькоклиноподібний. Другий листок іматурних рослин – із п'яти листочків, черешковий. Черешок зелений, опушений, жолобкоподібний, з широкою, глибокою виїмкою. Верхній листочок – більший, обернено-серцеподібний, при основі клиновидний; листочки верхньої пари – обернено-яйцеподібні, на верхівці з виїмкою, при основі заокруглені. Листочки нижньої пари віддалені, дрібніші й більш асиметричні. Усі листочки на зелених, опушених простими волосками черешечках; три верхні – тісно зближені. На нижньому боці листочків виділяється жилка. При основі листочків, на абаксiальному боці вздовж жилки та на верхівці помітні прості, довгі, тоненькі волоски.

Підсумовуючи результати порівняльно-морфологічних досліджень представників роду *Hippocrepis* у ранніх вікових станах ми дійшли висновку, що за формою сім'ядолі, відсутністю епикотилі, а також наявністю простих волосків на перших листках досліджувані види подібні. Крім того, нами встановлено, що в ряду *H. comosa* – *H. biflora* – *H. ciliata* зменшується відносна ширина сім'ядолі.

Морфологія представника роду *Securigera* DC. на ранніх етапах онтогенезу. Вивчалися рослини одного виду монотипного роду *Securigera*, опис яких наводимо нижче.

S. securidaca. Проростки мають зелене забарвлення. Сім'ядолі на короткому черешку, зелені, великі, асиметричні, овальні, з виїмкою на одному боці. Жилка видається на абаксiальному боці, сягає вище середини листової пластинки. Гіпокотиль зелений. Епикотиль відсутній. Перший листок ювенільних рослин непарноперистий, довгочерешковий, складається з п'яти листочків, верхній з яких менший за розмірами. Черешок листка жолобкоподібний, без волосків, у місці прикріплення черешечків інтенсивно забарвлений антоціаном. Листочки округло-трикутні, мають поперечно-зморшкуваті червонуваті черешечки з дуже короткими простими волосками. Жилка з нижнього боку листочків широка, випукла, доходить до верхівки пластинки, іноді коротко виступає. Верхівковий листочок помітно вужчий і коротший за парні нижні. Другий листок іматурних рослин непарноперистий, складається із семи листочків.

Висновки. Дослідження морфологічних особливостей молодих рослин представників роду *Hippocrepis* показало, що види цього роду характеризуються чітко окресленим комплексом морфологічних ознак рослин на ранніх етапах онтогенезу, що підтверджує правомірність об'єднання їх у межах даного роду, тоді як у межах роду *Coronilla* s. l. можна виділити чотири групи

видів, які відрізняються за морфологічними ознаками. До першої групи віднесено види (*C. coronata*, *C. valentina*, *C. scorpioides*), рослини яких сизуватого забарвлення, з рожевим гіпокотилем і м'ясистими листками. До другої – (*C. varia*, *C. cretica*, та *C. parviflora*) – в яких епикотиль не виражений, а перші листки на довгому черешку, як і в молодих рослин виду *Securigera securidaca*, що може бути доказом на користь об'єднання названих видів у межах одного роду. Третю групу представляє вид *C. elegans*, проростки якого мають короткий епикотиль, середньої довжини черешки та великі трійчасті листки з добре вираженим жилкуванням. До четвертої групи ми віднесли *C. emeroides*, проростки якого характеризуються овально-видовженими сім'ядолями, трійчастими першими листками з більшим верхнім листочком і наявністю простих довгих волосків. Зазначимо, що всі вказані ознаки характерні також для молодих рослин видів роду *Hippocrepis*. Таким чином, результати дослідження морфології молодих рослин показали гетерогенність роду *Coronilla* та спорідненість частини видів цього роду з видами родів *Securigera* й *Hippocrepis* і засвідчили доцільність перенесення *Coronilla varia*, *C. cretica*, *C. parviflora* та *C. elegans* до роду *Securigera*, а *Coronilla emeroides* до роду *Hippocrepis*, що узгоджується з новою системою триби *Coronillae* [7, 8].

1. Васильченко И.Т. Определитель всходов сорных растений – Л., 1979. – С. 156–157.
2. Васильченко И.Т. // Сов. ботаника. – 1938, № 3. – С. 19–24.
3. Васильченко И.Т. // Тр. Ботан. ин-та АН СССР. Сер. 2. – 1936. – Вып. 3. – С. 7–66.
4. Васильченко И.Т. // Тр. прикл. ботан. генет. сел. – 1931. – Т. 25, № 4. – С. 183–194.
5. Смирнова О.В., Заугольнова Л.Б., Торопова Н.А., Фаліков Л.Д. // Ценопопуляції рослин (основные понятия и структура). – М., 1976. – С. 14–18.
6. Флора СССР / Под ред. В.Л. Комарова. – М.: Л., 1948. – Т. 13. – С. 242–255.
7. Mosyakin S.L., Fedorovich M.M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. – Kiev, 1999.
8. Lassen P. // Willdenowia. – 1989. – 19, № 49. – С. 62.

Надійшла до редколегії 05.09.05

УДК 581.1:577.175.1

Н. Таран, д-р біол. наук, Л. Бацманова, канд. біол. наук
А. Мелешко, канд. біол. наук, В. Улинець, канд. біол. наук

ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ БІОЛОГІЇ РОЗВИТКУ *VISCUM ALBUM* ДЛЯ РОЗРОБКИ СТРАТЕГІЇ ПРОФІЛАКТИКИ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ТА БОРотьБИ З РОСЛИНОЮ-ПАРАЗИТОМ

Для розробки стратегії профілактики розповсюдження й боротьби з паразитом омелою білою (*Viscum album* L.) було досліджено особливості біології розвитку омели. Проведено скринінг вітчизняних і закордонних препаратів, які можуть бути застосовані для боротьби з напівпаразитом омелою.

The peculiarities of *Viscum album* development was studied for working-out of spreading prophylaxis and struggle against plant-parasite. Domestic and foreign chemicals which are possible for struggle against halfparasite mistletoe were screened.

Вступ. Узагальнена характеристика фізіології розвитку омели свідчить про те, що вона є рослиною-паразитом. Паразитування, як особлива форма живлення рослин, не обов'язково призводить до загибелі рослини-господаря, стан рівноваги в системі паразит – господар передбачає динамічні коливання, які залежать від агресивності паразита та ступеня опору господаря [1, с. 47; 2]. Визначення цього стану базується на певних фізіологічних особливостях окремих видів рослин, які й було використано нами при розробці методів боротьби з рослинами паразитами.

Біологія розвитку омели. Серед рослин-паразитів зеленої зони Києва виділяється омела біла (*Viscum album*, родина Viscaceae), яка паразитує на гілках багатьох видів дерев [4]. Вона є облігатним паразитом із життєвим циклом 4–6 років. Омела відрізняється значно сильнішою пошкоджувальною дією, ніж багато інших кореневих паразитів. Насіння омели вкрито клейкою речовиною, що дозволяє йому прикріплюватись до будь-яких рослин і там проростати. Насіння проростає, утворюючи спрощене коріння – гаусторії, за допомогою яких проросток досягає камбію рослини-господаря. Гаусторії, як сисні органи, розвиваються з папілярних від-

ростків паразита. Подальший кругово-поздовжній ріст кореневої системи формує кортикальні гаусторії. За допомогою ферментів, які синтезуються в гаусторіях, рослина-паразит розчиняє тканини хазяїна для проникнення до його судинної системи [3]. Після першого року проростання гаусторії досягають ксилеми, остаточно

закріплюючись на дереві. Омела цвіте весною. Плоди дозрівають через 15–17 місяців, тобто наступного року, і насіння проростає в кінці зими – на початку весни [6, 7]. Таким чином запускається новий цикл розвитку паразита (рис. 1).

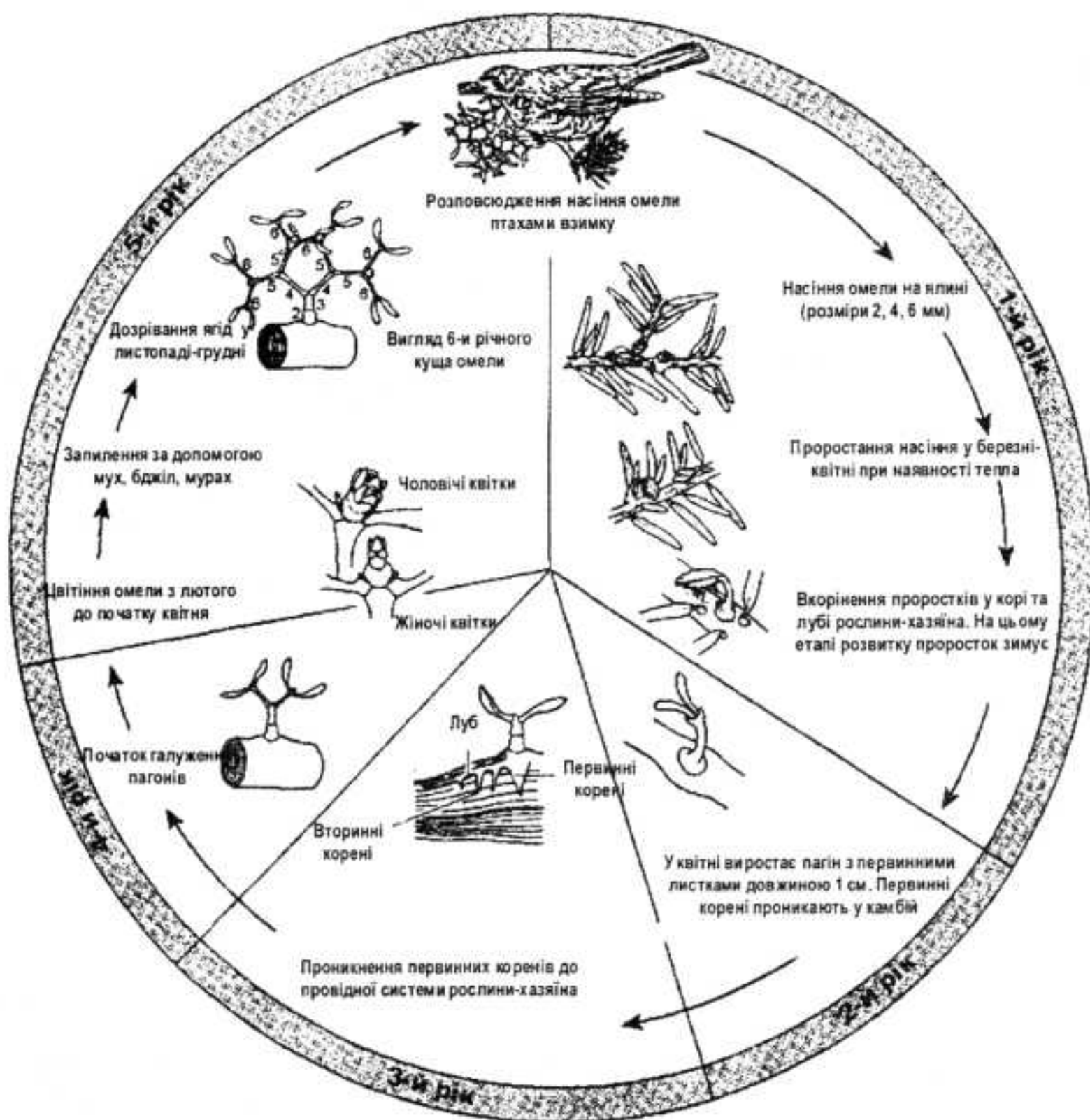


Рис. 1. Цикл розвитку *Viscum album ssp. abietis* на ялині [8]

Прикріплювальна система разом з кортикальними прожилками називається ендofітною системою. У деяких випадках ця система може досягати апікальної меристеми, утворюючи нові відгалуження паразита. Таке явище називається системною інфекцією. Омела має свою хлорофілоносну систему, що дозволяє їй частково бути незалежною від господаря, на якому вона оселилась. Цей стан має назву геміпаразитизм, на відміну від голопаразитизму, коли паразит отримує воду, мінеральні речовини і вуглець від рослини-господаря. Умовою для транспортування води з розчиненими мінеральними речовинами є більш високий осмотичний потенціал у ксилемі напівпаразитів, ніж у рослини-господаря.

У зв'язку з цим, для рослин омели характерний вищий показник транспірації, підтриманню високого рівня якого сприяє додатковий механізм відкриття продихів. Так, у деяких видів цієї рослини показники транспірації

в десять разів перевищують рослин-хазяїв. З іншого боку, омела має нижчий водний потенціал навіть тоді, коли дерева-господарі перебувають у стані водного стресу. Це дозволяє омелі заселяти досить сухі зони. Розвиток і ріст омели викликає фізичні пошкодження рослини-господаря.

Розповсюдження омели. Аналіз фітосанітарного стану зелених насаджень міста, а також дані літератури свідчать про значне поширення омели білої в паркових ландшафтах і на досить широкому видовому складі деревних рослин, які використовуються в паркобудівництві. Серед них є і аборигени, і рослини чужоземних дендрофлор. Особливо багато її на липі, березі, гостролистому клені, вербі – на деревах старого віку, дуже зріджених, з густим чагарниковим ярусом, а також у деревостанах на південних схилах ярів і балок. У паркових насадженнях омелою уражаються дерева різного віку, але більше – старі, очевидно, через те, що вони

довше, ніж молоді, перебували в місцях поширення статевозрілого напівпаразита.

Спостереження свідчать, що омелою ушкоджуються старі дерева, крони яких зріджені, краще освітлені, тому їх частіше відвідують птахи, які переносять насіння омели. Причиною масового розповсюдження цієї рослини на таких деревах слід вважати оптимальні умови освітлення, необхідні для фізіологічного розвитку насіння, оскільки є дані що її насіння проростає лише на світлі. Окрім того, в умовах паркових насаджень, а також міських ландшафтів загальна стійкість дерев знижена через недостатню забезпеченість їхніх життєвих потреб, невідповідність структурній організації лісового ценозу для певної породи, підвищений антропогенний тиск і тому кількість уражених омелою порід і видів дерев у цих умовах більша, ніж у природних ценозах.

Слід зазначити, що в омели є природні вороги. Рослина-паразит може сама бути заражена грибами (іржа, антракноз), кору її можуть поїдати деякі метелики і білки. Однак ці фактори, на жаль, не впливають суттєво на популяцію омели [6]. На сьогодні найефективнішими засобами зменшення популяції омели є механічне зрізання омели з дерев або культивування стійких до зараження омелою рослин. При цьому зрізання лише самої крони омели не є ефективним засобом, оскільки вона знову відростає з настанням вегетації рослин. Гілки рослини-господаря необхідно відрізати не менше як на 50 см нижче місця росту омели. У тих випадках, коли дерево не можна обрізати через його декоративну цінність проводять затінювання омели за допомогою темних кульків, що викликає її відмирання внаслідок хлорозу.

Хімічні засоби боротьби з омелою. Теоретично, за аналогією з кореневими паразитами, можливе знищення омели за допомогою речовин гербіцидної дії. Різного ступеня усихання омели спостерігали, якщо рослину обробляли гербіцидами: Дікамба, МСРА, Бутирак, Трітол, Відоне, Прімеб, тощо. Інколи для знищення американських видів омели використовували гербіциди: похідні 2,4-Д (Естерон і Фітоамін), Грамоксоне (похідне піридину) і Кармекс (похідне сечовини) на сосні. Найефективнішим був гербіцид Грамоксоне (80 % усихання омели за відсутності пошкодження рослини-господаря) [5, 10–12]. Однак після обробки цими речовинами, через вегетаційний період спостерігається відновлення кущів омели. Це відбувається в результаті того, що гербіциди тимчасово призупиняють еволюційно сформований цикл розвитку цієї рослини шляхом відділення частини пагона, пригнічують утворення плодів. Проте ендofітна система рослин, яка міститься глибоко в тканинах рослини-господаря – гаусторії – залишаються життєздатними і можуть розвиватися вже через 2 місяці. Складність обробки полягає в тому, щоб при знищенні гаусторій, які існують усередині рослини-господаря, не пошкодити дерево. На сьогодні немає жодного ефективного, зручного в застосуванні хімічного засобу боротьби з омелою.

Аналіз вітчизняного та міжнародного досвіду з даної проблеми свідчить, що перспективним засобом боротьби з омелою може бути використання регуляторів росту рослин [9]. Зокрема, встановлено позитивне застосування рістрегулюючих сполук, які вивільняють зв'язаний етилен. Найактивніший у цьому плані є регулятор росту на фітогормональній основі етрел (етефон). У високих концентраціях цей препарат викликає опадання квітів і зав'язі, цю його властивість

і використовують для регулювання плодоношення. Застосування даного регулятора росту на омелі може бути одним із засобів профілактики розповсюдження паразита. У зв'язку з цим нами проведено скринінг препаратів-дефоліантів і десикантів.

У нашій роботі було використано ретарданти-продуценти природного регулятора росту рослин етилену – хлорхолінхлорид (фірмові назви ТУР і хлормекват) і етрел (етефон). Етилен у великих концентраціях виступає як інгібітор росту рослин і десикант, тому для порівняння використовували ще один десикант – Дикват (фірмовий препарат під назвою Реглон), який у сільському господарстві застосовують для поступового всихання рослин, наприклад соняшника. Використовували також гербіциди Раундап (діюча речовина гліфосат) і 2,4-Д (2,4-дихлор-феноксибензойна кислота) у різних концентраціях для порівняння ефективності дії досліджуваних речовин на рослину-паразита й рослину-господаря. Спосіб обробки – обприскування рослин омели водними розчинами цих препаратів, а також введення їх у просвердлені отвори в стовбурі рослини-господаря. З метою запобігання пошкодження крони дерев обробку проводили в другій половині лютого. Обстеження проводили через один і два місяці після обприскування. Обприскування дерев гербіцидами Раундап, 2,4-Д і Реглон призводило до повного усихання омели, проте не відновлювалась вегетація і на гілках дерева. Обробка омели концентраціями препаратів, при яких не спостерігалось усихання рослин-господаря, не були ефективними й для омели.

Таким чином, гербіциди не можуть бути рекомендовані для знищення омели. Препарат хлорхолінхлорид у великих концентраціях викликав усихання омели, але одночасно спостерігався значний хлороз листя дерев. У середніх дозах, які не пошкоджували дерева, він не сприяв повному усиханню омели. Найефективнішим був препарат етрел. Використанням водних розчинів цього препарату в концентраціях 0,1, 0,3 і 0,5 % діючої речовини досягалось знищення омели, при цьому хлороз листя рослин-господаря омели був незначним, або не спостерігався взагалі.

Аналіз отриманих результатів передбачає продовження наукових досліджень даної проблеми з метою розкриття механізмів взаємодії екзо- та ендofітних систем омели з відібраними нами рістрегулюючими речовинами для оптимізації методів боротьби з омелою в умовах міста.

1. Бейлін И.Г. // Тр. ин-та леса АН СССР – 1950 – Т. 3 – С. 108.
2. Бейлін И.Г. Цветковые полупаразиты и паразиты. – М., 1968.
3. Иванов М.П. // Докл. АН СССР – 1951 – Т. 81, вып. V – С. 14–17.
4. Кохно М.М. // Докл. АН УРСР – 1960 – № 11 – С. 33–37.
5. Adams D.H., Frankel S.J., Lichter J.M. // J. Of Arboriculture. – 1993 – Vol. 19 – P. 6–13.
6. Alexander N.E., Hawksworth F.G. // USDA FS, GTR RM – 1975 – P. 14–26.
7. Gil L.S., Hawksworth F.G. // Technical Bulletin. – 1961 – P. 12–42.
8. Nierhaus-Wunderwald D., Lawrenz P., 1997: Zur Biologie der Mistel // Eidgenössische Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL – Birmensdorf, 1997. – Bd. 28. – S. 176.
9. Parks C.A., Hoffman J.T. Control of western dwarf mistletoe with the plant growth regulator ethephon // Research Note PNW RN-506. – Portland, US, 1991. – P. 4.
10. Quick C.R. Chemical control. Unit IX. Leafy mistletoes (Phoradendron spp.) // Proceedings 10th western international forest disease work conference, 1962 October 15–19. – Victoria, Alberta, 1962. – P. 97–88.
11. Scharpf R.F. Summation of tests for chemical control of dwarf mistletoe // Proceedings 19th annual western international forest disease work conference, 1971 September 13–17. – Medford, OR, 1972. – P. 80–83.
12. Vázquez-Collazo I. // Ciencia Forestal. – 1994 – Vol. 19 (76). – P. 27–50.

Надійшла до редакції 04.02.06

УДК 597-1105

В. Войціцький, д-р біол. наук, С. Хижняк, д-р біол. наук,
О. Маніло, канд. біол. наук, А. Павлович, наук. співроб.

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ СИРОВАТКИ КРОВІ РИБ АНТАРКТИКИ

Результати дослідження біохімічних показників крові різних видів антарктичних риб (*N. coriiceps*, *T. bermacchii*, *P. charcoti* та *C. aceratus*) свідчать про відмінності у протіканні метаболічних процесів, які пов'язані з особливостями пристосування до екстремальних умов існування.

The investigated biochemical characteristics of the blood serum of the different species of Antarctic fishes (*N. coriiceps*, *T. bermacchii*, *P. charcoti* and *C. aceratus*) indicate the existence of the differences in the behavior of the metabolic processes dependent on the nature of adaptation to Antarctic conditions.

Вступ. Важливою особливістю живого організму є здатність одержувати з навколишнього середовища і перетворювати енергію, яка витрачається на підтримку життєдіяльності. Існує тісний зв'язок процесів метаболізму хімічних речовин, які забезпечують білковий, ліпідний, вуглеводний, водно-мінеральний обмін в організмі, функціонування ферментів, що каталізують усі хімічні процеси, та гормонів, які виконують регуляторну функцію. Підтримка гомеостатичної рівноваги в організмі риб, у зв'язку зі значною залежністю у них обміну речовин від факторів середовища, є однією з основних функцій їхнього метаболізму. Біохімічна картина крові риб свідчить про особливості їхньої біології та виступає індикатором стану організму [7], що дає можливість передбачати екологічну нішу, яку займає той чи інший вид риб. Визначення біохімічних показників крові дає уявлення про стан процесів метаболізму як у цілому організмі, так і в певних органах, окремих клітинних і субклітинних структурах.

Антарктика залишається універсальним полігоном дослідження особливостей унікальної флори і фауни. Антарктику можна назвати царством нототенієвидних риб. Такі родини, як *Nototheniidae*, *Bathydraconidae* та *Channichthyidae* – переважно антарктичні, оскільки найбільше видове та родове різноманіття їх у холодних водах, які омивають Антарктику. Проведення моніторингу біоти Антарктиди включає виявлення видових особливостей на основі результатів біохімічних досліджень. Відомо, що залежно від умов існування у риб виробились певні адаптації, які виявляються у змінах перебігу окремих біохімічних реакцій та цілих метаболічних систем [6; 1]. У зв'язку з цим виникає необхідність детального дослідження метаболічних механізмів гомеостазу в організмі риб і можливостей їхньої регуляції за різних умов.

Метою даної роботи було порівняльне дослідження біохімічних показників крові антарктичних риб, які належать до родин *Nototheniidae*, *Bathydraconidae* та *Channichthyidae*. Роботу виконано в рамках Державної програми проведення дослідницьких робіт в Антарктиці на 2002–2010 роки за сприяння НАЦ України.

Об'єкт і методи досліджень. Матеріал для досліджень відібрано під час роботи 9-ї Української антарктичної експедиції (2004–2005 рр.) у зоні станції Академік Вернадський, яка знаходиться в західній частині острова Галіндес.

Після ідентифікації у риб відбирали кров із анальної вени. Для аналізу використано зразки (усього 38), отримані з різних видів риб. У дослідженнях використано особини, що відносяться до наступних родин: *Nototheniidae*, *Bathydraconidae* та *Channichthyidae*. Переважна кількість відібраних для біохімічних аналізів

осіб належить *N. coriiceps*. Вага тіла відібраних особин цього виду варіювала від 610 до 1068 г, а довжина тіла була в межах 26–40 см. Маса тіла особин *T. bermacchii* в середньому становила 326 г, а довжина тіла 20–28 см. Вага тіла відібраних особин *P. charcoti* варіювала від 610 до 1048 г, а довжина тіла була в межах 43–52 см. Маса тіла відібраних особин *C. aceratus* дорівнювала 769–2055 г, а довжина тіла – 48–69 см.

Сироватку крові отримували, як описано в роботі [4], заморожували та зберігали при температурі -20°C . Біохімічні показники визначали в сироватці крові відповідно до інструкцій комерційного набору реактивів (Intero, Ltd.) згідно стандартним клінічним діагностичним процедурам. Вимірювання проводили на спектрофотометричному аналізаторі "Stat Fax 1904+" (США). Експериментальні дані оброблялись загальноприйнятими методами варіаційної статистики [2].

Результати досліджень та їх обговорення. Для визначення біохімічних особливостей різних видів антарктичних риб у сироватці крові досліджено ряд біохімічних параметрів (маркерів метаболічного стану, а саме: вмісту різноманітних сполук і активність амінотрансфераз і фосфатази (табл. 1).

Білки – високомолекулярні азотовмісні органічні речовини. Їм належить провідна роль у забезпеченні процесів життєдіяльності організму. Сукупність процесів синтезу й перетворення білків, амінокислот та інших зв'язаних з ними речовин є суттю білкового обміну. Одним із шляхів адаптації до екстремальних умов середовища у риб є висока динаміка обміну та оновлення азотистих сполук, і перш за все білків [3]. У структурі раціонів більшості риб міститься значна кількість білкових сполук. Відомо, що необхідність у білку в риб у 2–4 рази більша, ніж у птахів і ссавців [3]. Так, у активно плаваючих риб білки, що надходять до організму, використовуються в основному на енергетичні потреби під час активної м'язової роботи [7]. Окрім білків, деструкції підпадають нуклеїнові кислоти, а також інші азотисті небілкові сполуки. Тобто катаболізм азотовмісних речовин відбувається в напрямку використання як джерела енергії вуглецевого скелету. Саме тому в риб виявлено ряд ферментів дезамінування: окиснювальні дезамінази [9], амінотрансферази [8] тощо.

Установлено (табл. 1), що загальний вміст білка для чотирьох досліджуваних видів риб у середньому становить 5,5 г%, а вміст альбуміну – 1,6 г%. На відміну від ссавців, у цих риб відносний вміст альбуміну до загального білка нижчий. Водночас установлено, що для *C. aceratus* загальний вміст білка та альбуміну приблизно у 2 рази нижчий у порівнянні з дослідженими в роботі видами антарктичних риб. Отримані результати свідчать про присутність у даних видів риб ряду фер-

ментів (табл. 1). Аспартатамінотрансфераза (АсАТ), (EC.2.6.1.1) каталізує перенесення аміногрупи з аспарагінової кислоти на альфа-кетоглутарову. Аланінамінотрансфераза (АлАТ), (EC.2.6.1.2) каталізує перенесення аміногрупи з аланіну на альфа-кетоглутарову кислоту. Лужна фосфатаза (ЛФ) (EC.3.1.3.1) широко розповсю-

джена в тканинах і бере участь у транспорті фосфору. Активність цих ферментів у всіх досліджуваних видів риб досить висока, що вказує на посилений хід у них метаболічних процесів. Деяко знижена (приблизно у 2 рази) відносно інших видів риб активність ЛФ і АлТ у *T. bernacchii*.

Таблиця 1. Біохімічні показники сироватки крові різних видів антарктичних риб ($M \pm m$, $n=7-8$)

Показники	Вид риб				
	<i>Notothenia coriiceps</i>	<i>Gobionotothen gibberifrons</i>	<i>Trematomus bernacchii</i>	<i>Channocephalus aceratus</i>	<i>Parachaenichthys charcoti</i>
Вміст загального білка, г %	5,41±0,41	5,31±0,39	5,03±0,38	1,90±0,21	6,62±0,41
Вміст альбуміну, г %	1,61±0,12	1,81±0,12	1,43±0,11	0,86±0,11	1,61±0,13
Вміст сечовини, ммоль/л	3,6±0,8	13,9±1,1	10,9±0,7	8,9±0,9	15,5±1,0
Вміст креатеніну, мкмоль/л	195±21	232±30	215±23	134±22	194±31
Вміст глюкози, ммоль/л	3,57±0,51	3,92±0,45	2,01±0,41	0,25±0,11	3,01±0,31
Активність лужної фосфатази, ммоль/год х л	295±25	149±24	90±18	282±28	155±23
Активність аспартатаміно-трансферази, ммоль/год х л	9,0±1,1	—	7,9±1,5	7,0±1,5	5,7±1,7
Активність аланінаміно-трансферази, ммоль/год х л	13,9±1,5	23,1±1,4	5,6±0,9	9,0±1,0	12,9±1,2
Вміст триглицеролів, ммоль/л	7,25±0,91	8,51±0,86	7,93±0,92	2,91±0,87	3,21±0,81
Вміст холестеролу, ммоль/л	4,61±0,5	3,91±0,59	4,12±0,53	3,41±0,49	5,03±0,56

Кінцевими продуктами метаболізму азотовмісних сполук в організмі риб є азотисті продукти, у тому числі сечовина. Зміни рівня сечовини в крові залежать від співвідношення процесів його утворення та виведення. Знижений рівень сечовини в крові *N. coriiceps* у порівнянні з іншими видами можливий при зниженому катаболізмі білків. Водночас для риб *C. aceratus* співвідношення вмісту білка та сечовини свідчить про активний катаболізм.

Креатинін – це кінцевий продукт розпаду креатину, який відіграє важливу роль в енергетичному обміні м'язової та інших тканин. Креатин переважно синтезується в печінці, звідки він потоком крові потрапляє в м'язову тканину. Тут, фосфорилюючись, він перетворюється на креатинфосфат, який є макроенергетичною сполукою і бере участь у перенесенні енергії в клітинах між мітохондріями і міофібрилами. Концентрація креатиніну в крові залежить від його утворення і виведення. Установлено, що для *C. aceratus* вміст креатиніну майже вдвічі нижчий у порівнянні з іншими видами. У рибах цього виду знижений вміст і інших продуктів енергетичного обміну, наприклад, глюкози в 10 разів. Слід урахувати, що температура водного середовища впливає на рівень глюкози в крові риб [5]. Так, в умовах низьких температур, у процесі гліколізу глюкоза використовується для синтезу АТФ, що призводить до зменшення її рівня у крові. Риби широко використовують гліколіз в умовах холодової адаптації, у них добре розвинені механізми регуляції активності ферментів гліколізу. Водночас, можливо, що за низьких температур у процесі гліколізу глюкоза перетворюється і гексозомонофосфатним шляхом – коли енергія запасється у вигляді триацилглицеролів (ТГ). Останні є основною формою накопичення жирних кислот в організмі й джерелом енергії. Установлено, що вміст ТГ у видів *P. charcoti* та *C. aceratus* знижений у 2,5 рази у порівнянні з іншими дослідженими видами. Це означає, що в риб даних видів ліпіди активно використовуються як енергетичний субстрат, що сприяє усуненню енергетичного дефіциту в тканинах. Серед інших ліпідів крові слід відмітити холестерол (ХС), який потрапляє в організм з їжею, але бі-

льша частина його синтезується ендогенно. Він – компонент клітинних мембран, попередник стероїдних гормонів та жовчних кислот. Його вміст у крові всіх видів риб суттєво не відрізняється.

Відомо, що носіями потенціальної енергії у риб є вуглеводи, ліпіди, білки та інші хімічні сполуки, у результаті перетворення яких виділяється енергія, що трансформується в АТФ і тепло. Основна частка енергії генерується за рахунок окиснення вуглеводів, а також у результаті окиснення ліпідів, особливо нейтральних. Однак у екстремальних умовах, до яких відносять умови Антарктики, механізми енергозабезпечення можуть модифікуватись. Отримані результати вказують на відмінності в механізмах перебігу енергетичних процесів у різних видів досліджених риб. Слід відмітити особливості, що характерні для виду *C. aceratus*, у крові якої майже відсутні еритроцити, кількість заліза та кисню дуже мала. Разом з тим, розмір серця у них майже в 3 рази більший, ніж у червонокровних, і вони можуть перекачувати більше крові, тобто потребують більше енергії. За цих умов зростає внесок білків, вуглеводів та ліпідів як джерела енергії в їхньому організмі.

Висновки: 1. Виявлено відмінності в біохімічних показниках крові різних видів антарктичних риб, що вказує на особливості перебігу метаболічних процесів, пов'язаних з пристосуванням до умов Антарктики. 2. Установлено зростання загального внеску окиснення вуглеводів, ліпідів, білків у забезпечення енергетичних потреб риб в умовах низьких температур і гіпоксії.

1. Грубинко В.В. // Гидробиол. журн. – 1991. – Т. 27, № 4. – С. 46 – 56.
2. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Войцілький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень. – К., 2001.
3. Лав Р.М. Химическая биология рыб. – М., 1976.
4. Методы биохимических исследований. / Под ред. Прохоровой М.Н. – Л., 1982.
5. Романенко В.Д., Арсан О.М., Соломатина В.Д. Механизмы температурной акклимации рыб. – К., 1991.
6. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. – М., 1977.
7. Элементы физиологии и биохимии общего и активного обмена у рыб / Под ред. Г.Е. Шульмана. – К., 1978.
8. Vellas F., Parent I. // Ichthyophysiol. acta. – 1983. – Vol. 7, № 5. – P. 76–88.
9. Waarde A., van. // Comp. Biochem. and Physiol. – 1981. – Vol. 68, № 3. – P. 407–413.

Надійшла до редколегії 18.10.05

УДК 577.391:311

К. Лукашова, студ., В. Ковальова, канд. біол. наук,
К. Дворщенко, канд. біол. наук, Л. Томачинська, канд. біол. наук

ПРОЦЕСИ ПЕРОКСИДАЦІЇ ЛІПІДІВ У ЯДЕРНІЙ ФРАКЦІЇ СЛИЗОВОЇ ШЛУНКА ЗА УМОВ ВИРАЗКИ

Показано, що за дії етанолу та іммобілізаційного стресу у щурів відбувається пригнічення активності каталази в ядерній фракції клітин слизової оболонки шлунка при виразці. Вміст продуктів вільнорадикального пероксидного окиснення ліпідів у ядерній фракції при експериментальній гострій виразці шлунка залишається на рівні контролю

It was shown that the actions of ethanol and immobilization stress on rats depress the y catalase activity in nuclear cell fraction of gastric mucosal cells. In acute experimental gastric ulcer the content of freeradical lipid peroxidation products in nuclear fraction remains on control group level

Вступ. Виразкова хвороба (ВХ) залишається найпоширенішим захворюванням органів травлення, а за останні десятиріччя спостерігається тенденція до її зростання. Вона має терапевтичний індекс до 95 %, але і високий відсоток рецидивів, приблизно 65–80 % у перший рік після загоєння та майже 100 % у межах двох років [6]. Сьогодні важливою проблемою сучасної медицини залишається лікування виразкової хвороби та запобігання рецидивам захворювання. Для вирішення цих питань необхідно розуміти механізми розвитку ulcerогенезу та шукати нові шляхи його подолання.

Доведено, що спільним етіологічним і патогенетичним фактором виникнення та розвитку різних за природою захворювань і патологічних станів є утворення надмірної кількості реакційноздатних кисневих радикалів та ініціація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у клітинах. Продукти вільнорадикального пероксидного окиснення мають ушкоджуючий вплив на біомембрани й у свою чергу активізують процеси ПОЛ у них. Наслідком цих процесів є порушення структури мембран, їхньої цілісності та функціонування мембранозв'язаних білків. Крім того, унаслідок високої реакційної здатності активовані форми кисню взаємодіють з важливими біоорганічними сполуками: ДНК, зумовлюючи точкові мутації та розриви в молекулі; білками, розриваючи пептидний зв'язок і модифікуючи бічні ланцюги амінокислот. Розвиток цих процесів призводить до деструкції біологічних структур і вичерпування їхніх резервів у клітині.

Для попередження негативної дії активованих форм кисню в організмі існує багатокомпонентна високоефективна система антиоксидантного захисту, функціонування якої спрямовано на попередження утворення вільних радикалів, нейтралізацію їх та репарацію ушкоджень. У нормі процес ПОЛ утримується на певному рівні, що не перешкоджає нормальній життєдіяльності. Лавиноподібне зростання пероксидного окиснення може призвести до навантаження на захисні антиоксидантні механізми клітини, що може викликати порушення в скоординованій діяльності антиоксидантної системи в бік прооксидантної. У такому випадку виникає оксидативний стрес.

Метою роботи було дослідити вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів і активність каталази в ядерній фракції клітин слизової оболонки шлунка при гострій експериментальній виразці.

Об'єкт і методи досліджень. У дослідках використовували щурів лінії Вістар масою 150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Модель експериментальної етанолової виразки шлунка у щурів створювали за методом Окабе [2]. Для цього щурам перо-

ально вводили 1 мл 80 % етанолу і через годину декапітували. Моделювання виразки шлунка у тварин, що є наближеною за етіологією та патогенезом до виразки шлунка людини, використовували модифіковану методику "іммобілізаційного стресу" [1]. Для цього щурів розміщували в металевих перфорованих патронах зі скляним вікном у донній частині, де було розміщено голову тварини. Патрони розташовували в колонії вільно існуючих щурів. Через 24 год щурів виймали з патронів і декапітували. Слизову оболонку шлунка піддавали гомогенізації в трис-НСІ буфері (рН=7,4) у співвідношенні 1:10 при 0 °С. Ядерну фракцію отримували за допомогою центрифугування на холоді в 0,25 моль/л сахарозі при 1000 g [4]. Вміст дієнових кон'югатів визначали спектрофотометричним методом, шифових основ – флюорометричним [3]. Вміст МДА визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою. Активність каталази в ядерній фракції оцінювали за методом, описаним у роботі [5]. Усі показники перераховано на 1 мг білка.

Результати та їх обговорення. Біохімічні процеси, які проходять у клітинах з високою проліферативною та загальною метаболічною активністю, супроводжуються утворенням у невисоких концентраціях активних інтермедіаторів кисню, зокрема супероксидного, гідроксильного, пероксильного радикалів, а також пероксиду водню, синглетного кисню та ін. Такі високореактивні форми кисню мають широкий спектр дії – з одного боку, вони є залученими до процесів проведення активаційного сигналу та метаболічної регуляції, з іншого – є здатними ініціювати апоптоз клітин, виявляючи генотоксичні ефекти.

Ізольовані ядра клітин є зручною експериментальною моделлю, яка дозволяє детально вивчити структуру та функції цього клітинного компартменту, досліджувати динаміку біохімічних процесів у ядрі, особливості транспортних і сигнальних механізмів. Отримання препаратів інтактних ядер є необхідною умовою для вирішення багатьох питань функціонування та патології як ядер, так і клітин у цілому. Через передачу регуляторного сигналу з поверхні клітин слизової оболонки шлунка щурів у ядро контролюються такі процеси, як активація, диференціація, проліферація клітин та їх загибель за типом апоптозу або некрозу.

Біохімічним показником утворення первинних продуктів вільнорадикальних реакцій переокиснення є вміст дієнових кон'югатів. Вторинними продуктами ПОЛ є альдегіди, зокрема малоновий, які утворюються за рахунок розриву подвійних зв'язків у вуглецевому ланцюзі окиснювальних молекул. Кінцеві продукти пероксидації – шифові основи, які утворюються внаслідок окисної полімеризації ліпідів і білків.

У нормальних умовах процес пероксидного окиснення ліпідів перебуває під суворим контролем ферментативних і неферментативних систем клітини. Ключовими ферментами антирадикального та антипероксидного захисту клітини є супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза. СОД каталізує перетворення супероксидних аніонів на пероксид водню, а надлишок останнього видаляється за допомогою каталази. За патолочних умов можуть виникнути порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги і в цьому випадку супероксидні радикали та пероксид водню вступають в альтернативні

реакції, які приводять до деструкції клітини. Накопичення токсичних вільнорадикальних продуктів, утворення високоактивних радикалів, які можуть здійснювати неспецифічну окисну модифікацію білків і нуклеїнових кислот, ініціювати ланцюгові реакції ПОЛ у мембранах.

При моделюванні гострої експериментальної виразки шлунка у щурів нами не було виявлено значних змін вмісту продуктів ПОЛ у ядерній фракції клітин слизової оболонки шлунка, вміст шифових основ був поза чутливістю методу досліджень. Проте спостерігається значне зниження активності каталази – у 1,5 раза (табл. 1).

Таблиця 1. Показники пероксидації ліпідів у ядерній фракції клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної виразки

Стан	Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	Вміст МДА, нмоль/мг білка		Активність каталази, нмоль/мг білка*хв
		0'	30'	
Контроль	256,7 ± 29,5	8,2 ± 1,5	35,5 ± 0,5	26,3 ± 2,1
Етанол	292,2 ± 27,2	7,6 ± 1,4	31,9 ± 0,4	17,7 ± 1,1*
Стрес	249,8 ± 43,5	6,9 ± 0,4	31,9 ± 0,4	16,8 ± 1,2*

* – $p < 0,05$ різниці достовірні щодо контролю

Ураховуючи, що нами досліджувався гострий стан ульцерогенезу, можна припустити, що накопичення продуктів ПОЛ у ядерній фракції клітин оболонки шлунка на даний момент ще не відбулося. Зниження активності каталази в ядерній фракції клітин слизової оболонки шлунка щурів на ранньому етапі розвитку етанолової та стресової виразки свідчить про пригнічення антиоксидантної системи. У подальшому це може призвести до порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та безконтрольного накопичення токсичних продуктів вільнорадикального окиснення в ядрі. Пов'язане з ПОЛ окиснення білків і утворення білкових агрегатів може стати однією з причин порушення функцій багатьох ферментативних і структурних білків ядерної оболонки. Крім того, продукти пероксидації мають здатність безпосередньо збільшувати іонну проникність ліпідного бішару ядра та зменшувати його стабільність. Утворенні високоактивні радикали можуть призвести до розривів ниток ДНК, виявляючи, залежно від випадку, мутагенну, канцерогенну чи цитостатичну дію. Ці процеси

будуть визначати характер та інтенсивність клітинних порушень і перебіг захворювання в цілому.

Отже, згідно з отриманими результатами, при гострій експериментальній виразці шлунка у щурів на перших етапах не спостерігається підвищення вмісту продуктів пероксидації ліпідів у ядерній фракції, проте значне зниження каталази вказує на початок порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в ядрі клітини.

1. Гройсман С.Д., Каревина Т.Г. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс. – Л., 1979. – № 12. – С. 131. – Рукопись деп. в ВИНТИ, № 452/79 Деп. 2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К., 2001. 3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. // Лабор. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18. 4. Костюк В.А., Потемнов А.И., Луком Е.Ф. // Вopr. мед. химии. – 1984. – Т. 30. – С. 125–127. 5. Monica Marmonti, Mariana Gavazza and Angel Catala // Mol. and Cell Biochemistry. – 2004. – Vol. 265. – P. 401–409. 6. Tuo-Ying Fan, Qing-Qing Feng, Chun-Rong Jia, Qun Fan, Chun-An Li, Xue-Lian Bai // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 28 (8). – P. 1204–1209.

Надійшла до редколегії 18.10.05

УДК 577.151.64+616–006

С. Хижняк, д-р біол. наук, А. Кудрявцева, асп.,
О. Капля, д-р біол. наук, Д. Осинський, канд. мед. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ Ca^{2+} -АТФАЗИ У ТКАНИНАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОЇ КАРЦИНОМИ ЛЮДИНИ

У колоректальній карциномі людини виявлено зниження Ca^{2+} -АТФазної активності в порівнянні з нормальною мукозою. Імунохімічно у тканинах визначено наявність ізоферменту Ca^{2+} -АТФази сарко/ендоплазматичного ретикулума SERCA 3, білковий рівень якого підвищений у порівнянні з нормою на останній стадії раку. Можливі зміни ізоферментного ансамблю Ca^{2+} -АТФази за розвитку колоректального раку.

The decrease in Ca^{2+} -ATPase activity was revealed in colorectal carcinoma relative to normal mucosa. Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase SERCA 3 isozyme was detected immunochemically in the tissues. Its protein level even was enhanced over norm on the last cancer stage. The Ca^{2+} -ATPase isozyme pattern rearrangement is supposed in colorectal cancer.

Вступ. Регуляція кальцієвого гомеостазу лежить в основі нормального функціонування клітин і є основою для функціонування багатьох Ca^{2+} -опосередкованих сигнальних шляхів, що контролюють ріст і диференціацію клітин чи апоптоз. У регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ важливу роль відіграє ізоферментний ансамбль локалізованої в сарко/ендоплазматичному ретикулумі Ca^{2+} -АТФази (суб-

клас SERCA) і Ca^{2+} -АТФази плазматичних мембран (субклас PMCA) [7; 9]. Вважається, що розвиток раку є результатом порушення контрольованих механізмів клітинної проліферації та програмованої елімінації (апоптозу). Стійке підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ розглядається як характерна ознака розвитку раку [10]. При цьому відмічають відмінності у функціональній активності та експресії білків, що беруть участь у регуляції іонного го-

© С. Хижняк, А. Кудрявцева, О. Капля, Д. Осинський, 2006

меостазу. На клітинних культурах карцином показано зміни ізоферментного спектра Ca^{2+} -АТФази [4]. Актуальними є дослідження за патофізіологічних змін в організмі з використанням клінічного матеріалу на різних стадіях злоякісного росту. Мета роботи полягає в дослідженні Ca^{2+} -АТФазної активності та визначенні специфічного ізоферменту SERCA3 у колоректальній карциномі людини.

Об'єкт і методи досліджень. У дослідженнях використано карциноми людини ободової (сигмоподібний і низхідний відділи) і прямої кишок I, II та IV стадій згідно

з клінічною класифікацією. Контролем служили відповідні ділянки нормальної епітеліальної тканини, яка оточує пухлину.

Тканини промивали фізіологічним розчином і гомогенізували в скляному гомогенізаторі в середовищі, яке містило: трис- HCl ($\text{pH}=7,4$ при 20°C), 20 ммоль/л, сахароза 0,32 моль/л, EDTA 2 ммоль/л та інгібітори протеаз (фенілметилсульфонілфторид 1 ммоль/л, бензамідин натрію 50 мкг/мл, соєвий інгібітор трипсину 0,1 мг/мл). В експериментах застосовували супернатант після центрифугування при 800 g 20 хв.

Активність Ca^{2+} -АТФази визначали в середовищі (1 мл), яке містило, ммоль/л: 30 HEPES-трис ($\text{pH}=7,4$), 120 NaCl, 15 KCl, 5 MgCl_2 , 5 ATP, 0,1 убаїн і розраховували як різницю наявності 10 $\mu\text{моль/л}$ CaCl_2 або 1 ммоль/л EGTA. Активність SERCA оцінювали за інгібуванням тапсигаргіном ($5 \cdot 10^{-7}$ моль/л).

Вестерн-блотинг проводили при 1:50 розведенні поліклональних антитіл SERCA 3 (F-15), отриманих із Santa Cruz Biotechnology, Inc (люб'язно надані проф. Н. Папагеоргополу, університет м. Патра, Греція). Як вторинні антитіла використовували антикозині антитіла, кон'юговані з пероксидазою, при 1:4000 розведенні. Зони візуалізували за допомогою підсиленої хемілюмінесценції. Статистичну обробку результатів проводили за стандартною програмою.

Результати та їх обговорення. Виявлено, що в процесі розвитку колоректального раку людини відбувається достовірне зниження Ca^{2+} -АТФазної активності ($0,79 \pm 0,02$ та $0,58 \pm 0,04$ мкмоль Фн/мг білка за 1 год, у нормальної мукози та карциномах відповідно, $n=4$, $p<0,01$). Для детальнішого аналізу досліджено зміни активності в карциномах з окремих відділів ободової та прямої кишок на різних клінічних стадіях раку (рис. 1, А, Б). На I стадії ці зміни мало виражені. Найбільші зміни загальної Ca^{2+} -АТФазної активності спостерігаються на II стадії карциноми. Для карциноми ободової кишки вони становлять 32 % для обох досліджуваних відділів у порівнянні з нормальною мукозою. IV стадія характеризується меншими змінами активності Ca^{2+} -АТФази (у середньому на 20 %). Активність тапсигаргін-інгібованої компоненти (SERCA) становить переважну частину загальної Ca^{2+} -АТФазної активності в препаратах. Проте зниження цієї компоненти Ca^{2+} -АТФазної активності в ректальній карциномі встановлено лише на II стадії раку. Виявлені у процесі канцерогенезу зміни загальної Ca^{2+} -АТФазної активності та активності SERCA (пряма кишка) збігаються за направленістю, що може свідчити про модуляцію функціонування саме SERCA в клітинах карциноми.

Слід зазначити, що вимірювана загальна Ca^{2+} -АТФазна активність, тобто приріст активності за присутності екзогенного кальцію, є складовою принаймні активностей PMCA та SERCA, але може маскуватися наявністю високого рівня Mg^{2+} - чи Ca^{2+} -залежної АТФ фосфогідролазної активності плазматичних мембран у нормальних і пухлинних тканинах. Остання може бути складовою принаймні декількох ферментних систем [3, 5]. Тому надалі було доцільним імунохімічно визначити конкретні ізоферменти Ca^{2+} -АТФази, а саме функціонально особливу SERCA3.

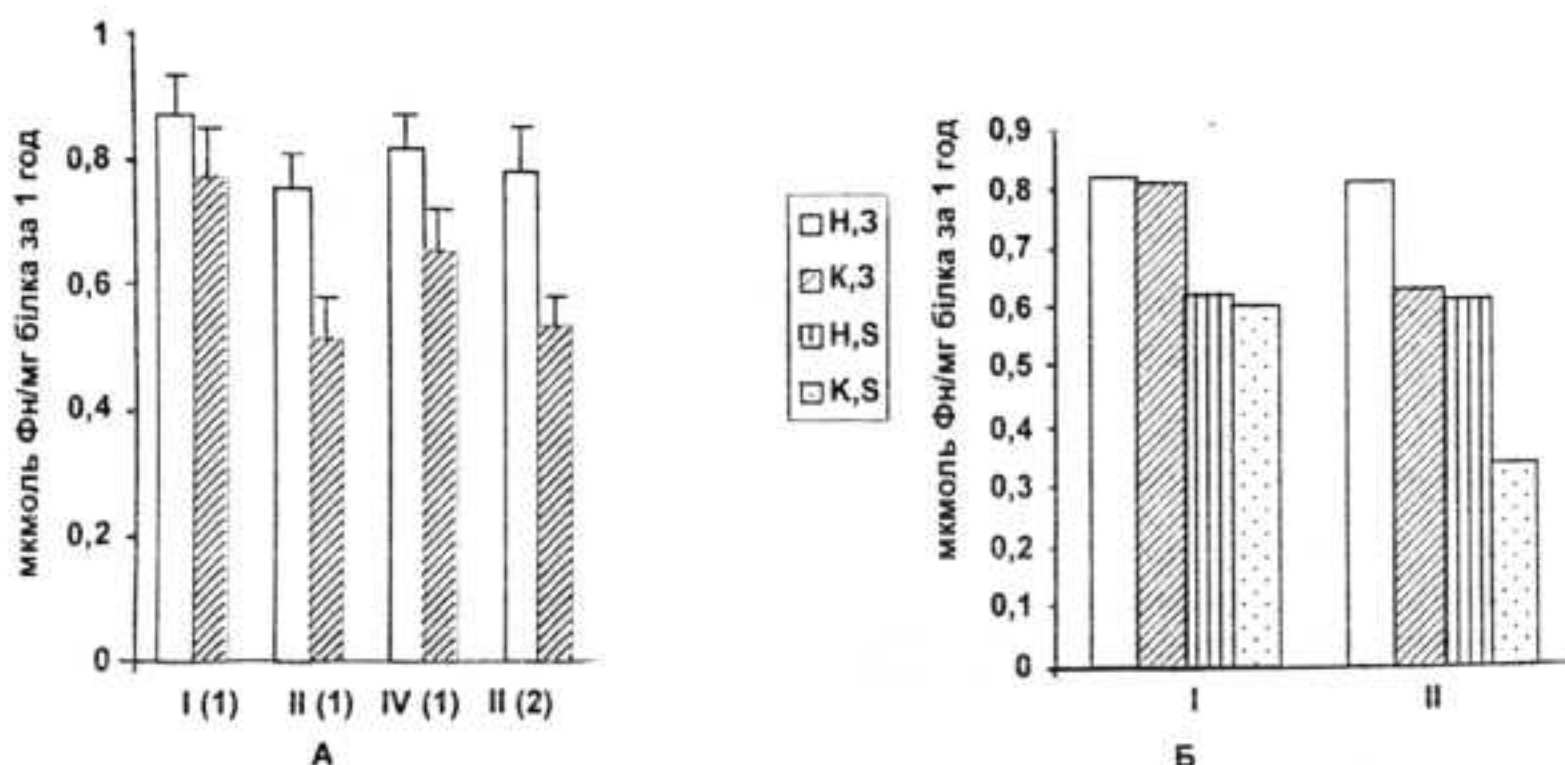


Рис. 1. Ca^{2+} -АТФазна активність препаратів нормальної мукози (Н) і карциноми (К) товстої (А) і прямої (Б) кишки людини. А – сигмоподібний (1) і низхідний (2) відділи ободової кишки, $n=3-6$ (кількість експериментів). Загальна Ca^{2+} -АТФазна активність (3) і SERCA – (S). Б – за присутності 5 $\mu\text{моль/л}$ A23187. I, II – клінічні стадії раку

Ізофермент SERCA 3 виявляється як у нормі, так і в карциномі. Причому його кількість навіть підвищується на останній стадії раку (рис. 2). Можна припустити, що за колоректального раку відбувається реорганізація ізоферментного профілю Ca^{2+} -АТФази.

Наявність SERCA 3 та підвищення її експресії за розвитку колоректального раку ободової та прямої кишок може мати наступні фізіологічні наслідки. SERCA 3 (виявлено п'ять варіантів альтернативного сплайсингу в тканинах людини) – типовий ізофермент для більшості нем'язових тканин, у тому числі секреторного епітелію та ендотелію [7]. Вона має найнижчу серед усіх ізоферментів спорідненість з Ca^{2+} та не інгібується при навантаженні ретикулуму катіоном [6]. Припускають, що такі кінетичні особливості зумовлюють спеціалізовану резервну функцію SERCA 3 у депонуванні Ca^{2+} у разі його його масованого надходження в клітину. Вважають, що баланс між конститутивним ізоферментом SERCA 2b та SERCA 3 є важливим для тонкої регуляції Ca^{2+} -залежних процесів [6]. Саме експресія останньої ізоформи може виступати мішенню регуляції за деяких патологій, включаючи рак [4].

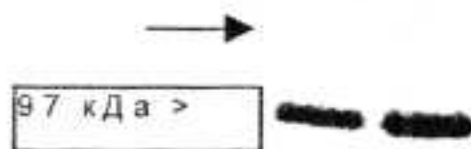


Рис. 2. Імуноблотинг SERCA3 ізоферменту в нормальній мукозі (Н) і карциномі (К). 8 % ПААГ. (Сигмоподібна ободова кишка, IV клінічна стадія раку. Імунодетекція поліклональними антитілами SERCA 3 (F-15))

Так, встановлено, що тільки для SERCA 3 відбувається позитивна регуляція експресії за умов індукованої чи спонтанної диференціації культивованих клітин шлунково-кишкового раку. Припускають, що реорганізація ізоферментного ансамблю з переважанням SERCA 3 над SERCA 2b повинна призвести до гомеостатичних змін при диференціації клітин, а саме підвищенню ба-

зальної концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, але зменшенню заповнення внутрішньоретикулярного пулу. Такі висновки підтверджено експериментально на культивованих клітинах аденокарциноми шлунка КАТО-III [4]. У свою чергу, для забезпечення дозрівання білків, а саме посттрансляційного процесингу, коректного холдингу та олігомеризації, є важливою насиченість внутрішньомембранного середовища ендоплазматичного ретикулуму кальцієм [7]. З іншого боку, вважають, що стійке підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ призводить до видозмін просторово-часових характеристик кальцієвих осциляцій і пов'язаної з ними кальцієвої сигналізації, її специфічності та селективності [4]. Відомо, що від амплітуди й частоти осциляцій залежить активація внутріклітинних акцепторів кальцієвих сигналів (кальмодулінзалежної протеїнкінази, протеїнкінази С тощо) [1; 8], а отже, у свою чергу, і наступна активація транскрипційних факторів, а саме й модифікація експресії генів [2].

Таким чином, виявлені зміни Ca^{2+} -АТФазної активності та білкового рівня SERCA 3 у тканині колоректальної карциноми людини передбачають можливість залучення цього ферментного ансамблю в розвиток злоякісного процесу. Перегрупування ізоферментного профілю може адаптувати кальцієвий гомеостаз і спряжені сигнальні шляхи до потреб неконтрольованого клітинного множення за умов морфофункціональних перетворень при злоякісному процесі.

Висновки. 1. Виявлено зниження Ca^{2+} -АТФазної активності у колоректальній карциномі людини в порівнянні з нормальною мукозою.

2. Імунохімічно у тканинах карциноми визначено наявність ізоферменту Ca^{2+} -АТФази сарко/ендоплазматичного ретикулума SERCA 3.

3. Припускається можливість змін ізоферментного ансамблю Ca^{2+} -АТФази за розвитку колоректального раку.

1. De Koninck P., Schulman H. // *Science*. – 1998. – Vol. 279, № 5348. – P. 227–230.
2. Dode L., Vilsen B., Van Baelen K. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 47. – P. 45579–45591.
3. Dolmetsch R.E., Xu K., Lewis R.S. // *Nature*. – 1998. – Vol. 392, № 6679. – P. 933–936.
4. Gelebart P., Kovacs T., Brouland J.P. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 29. – P. 26310–26320.
5. Hanahan D., Weinberg R.A. // *Cell*. – 2000. – Vol. 100, № 1. – P. 57–70.
6. Knowles A.F., Isler R.E., Reece J.F. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1983. – Vol. 731, № 1. – P. 88–96.
7. Knowles A.F., Chiang W.C. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol. 418, № 2. – P. 217–227.
8. Monteith G.R., Wanigasekara Y., Roufogalis B.D. // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 1998. – Vol. 40, № 4. – P. 183–190.
9. Oancea E., Meyer T. // *Cell*. – 1998. – 95, № 3. – P. 307–318.
10. Wuytack F., Raeymaekers L., Missiaen L. // *Cell Calcium*. – 2002. – Vol. 32, № 5–6. – P. 279–305.

Надійшла до редколегії 05.10.05

УДК 577.353

В. Гавриленко, магістр, Д. Каніболоцький, канд. хім. наук,
М. Мірошніченко, д-р біол. наук, В. Зима, д-р біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ НАСИЧЕНОГО ІОНАМИ КАЛЬЦІЮ ТРОПОНІНУ С СЕРЦЕВОГО М'ЯЗА

Методом молекулярної динаміки в наносекундному часовому інтервалі досліджено конформаційну рухливість тропоніну С серцевого м'язу курчати у водному оточенні при зв'язуванні трьох іонів кальцію. Порівняно отримані результати з раніше одержаними даними для тропоніну С із двома зв'язаними іонами кальцію.

Conformational mobility of chicken cardiac troponin C bound with three calcium ions has been investigated in water environment in nanosecond time interval using molecular dynamics simulation. Obtained results have been compared with previously received data for the cardiac troponin C bound with two calcium ions.

Вступ. Тропонін-тропоміозиновий білковий комплекс, що розташований на актиновому філаменті, регулює скорочення скелетних і серцевого м'язів [2]. Було встановлено, що тропонін складається з трьох компонентів: тропоніну С, тропоніну Т і тропоніну І, кожний з яких виконує свої специфічні функції. Тропонін С (ТНС) – білок масою 18 кДа, який регулює скорочення міокарда шляхом зв'язування іонів Ca^{2+} . Тропонін С має від 159 до 162 амінокислотних залишків. У відсутності зв'язаних іонів кальцію одна молекула тропоніну С має заряд 29 [2]. Молекула ТНС складається з двох глобулярних доменів (N і C), які з'єднані між собою центральною α -спіраллю. До складу ТНС входить N-спіраль і 4 структури спіраль-петля-спіраль, так звані EF-руки [2], які є центрами зв'язування іонів кальцію. У N-доміні α -спіралі A і B, C і D утворюють дві EF-руки, у C-доміні EF-руки утворені α -спіралями E і F, G і H. У ТНС серцевого м'язу (сТНС) працюють сайти зв'язування іонів кальцію, які утворені спіралями C і D, E і F, G і H. Сайт сТНС, утворений спіралями A і B, не зв'язує іони кальцію.

На відміну від ТНС скелетних м'язів, сТНС не був закристилізований повністю. Його структуру було визначено методом ядерного магнітного резонансу (ЯМР) [7; 8]. Метод ЯМР дозволяє розрахувати усереднену структуру, одержану на основі значень ядерних ефектів Оверхаузера. Ця усереднена структура є добрим наближенням до нативної конформації макромолекули в розчині, але може містити помилки внаслідок істотної відмінності окремих конформацій у розчині [4]. Змодельовавши природну рухливість білка, можна з'ясувати, чи залишається структура стабільною в часі, чи існують тенденції до конформаційних перебудов і яких саме. Таким чином, метод молекулярної динаміки розширює статичне розуміння про структуру білка, отриману методами ЯМР і рентгеноструктурного аналізу, та дозволяє робити припущення щодо механізмів функціонування макромолекул.

Для сТНС поки що немає чіткого уявлення про зміни структури, індуковані зв'язуванням іону кальцію N-доміном. У попередній роботі [1] було досліджено молекулярну динаміку сТНС з ненасиченим іоном кальцію N-доміном (апо-ТНС). Дана робота є продовженням серії досліджень конформаційної рухливості сТНС, тут представлено результати розрахунків молекулярної динаміки для форми сТНС, насиченої іонами кальцію (холо-ТНС).

Об'єкт і методи досліджень. Для розрахунку молекулярної динаміки насиченого іонами кальцію тропоніну С міокарда використовувався пакет програм GROMACS 3.1.4 [3; 6]. За початкову структуру для моделювання було взято координати атомів Ca^{2+} -насиченого ТНС серцевого м'язу курчати, отримані за допомогою ЯМР-спектроскопії (код pdb – 1la0) [5]. Протокол і параметри обчислень були такими ж, як у попе-

редньому розрахунку. Бокс навколо білка був заповнений молекулами води моделі SPC. До системи було додано 23 іони Na^+ . У результаті сумарний заряд системи дорівнював нулю. Мінімізація енергії початкової структури проводилася за допомогою чергування алгоритмів steepest descent та conjugated gradient (2000 кроків). Час динаміки з обмеженими конформаційними рухами білка (position restrained dynamics) для врівноваження розташування молекул води складав 50 пс. Тривалість розрахунку повної динаміки системи становила 2800 пс і проходила за таких параметрів: загальне силове поле – GROMOS 96; алгоритм фіксації довжини зв'язків – LINCS; мінімальна відстань від білка до стінок боксу – 1,5 нм; геометрія боксу – зрізаний октаедр; алгоритм розрахунку далеких електростатичних взаємодій – PME (Particle-Mesh Ewald Sum); подвійний відтин для вандерваальсових взаємодій (взаємодії на відстані до 0,9 нм урахували на кожному кроці, тоді як на відстані від 0,9 до 1,5 нм – на кожному десятому кроці); крок розрахунку – 2 фс; час запису у файл траєкторії – 2 пс; температура – 300 К.

Розраховувалися середньоквадратичне відхилення (RMSD – root mean square deviation) для важких атомів молекули білка через кожні 2 пс відносно початкової конформації ЯМР (програма g_rms) і середньоквадратичні флуктуації C_α -атомів (програма g_rmsf). Ці параметри були розраховані як для всієї молекули білка, так і для доменів окремо. Було узятно, що N-доміні містить залишки 1-85, C-доміні – 95-161.

Результати та їх обговорення. За формою графіка середньоквадратичного відхилення структури холо-ТНС (товста лінія) на рис. 1, А можна говорити про адекватність розрахунку. Коливання навколо стаціонарного рівня є ефектом гнучкості α -спіралі між доменами, завдяки незначним рухам якої доміні тропоніну С зміщуються один відносно одного, тому накладання конформації в певний момент часу моделювання на початкову структуру дає великі значення RMSD. При накладанні структур окремих доменів RMSD значно менше. Після 500 пс система дійшла рівноважного стану на рівні $\text{RMSD} = 0,47 \pm 0,06$ нм. Цей рівень менший за величину, отриману для апо-ТНС – $0,64 \pm 0,04$ нм. Отже, білок з трьома іонами кальцію набуває менших перебудов відносно початкової структури ЯМР, ніж білок з двома іонами кальцію. Така ситуація цілком природна, тому що стартова структура ЯМР, яку було взято для розрахунків молекулярної динаміки, зроблена для холо-сТНС тропоніну С. Структура апо-сТНС була отримана нами шляхом видалення іону кальцію з N-доміну, тому їй треба пройти більше конформаційних перебудов, щоб релаксувати і наблизитися до нативної конформації білка в розчині.

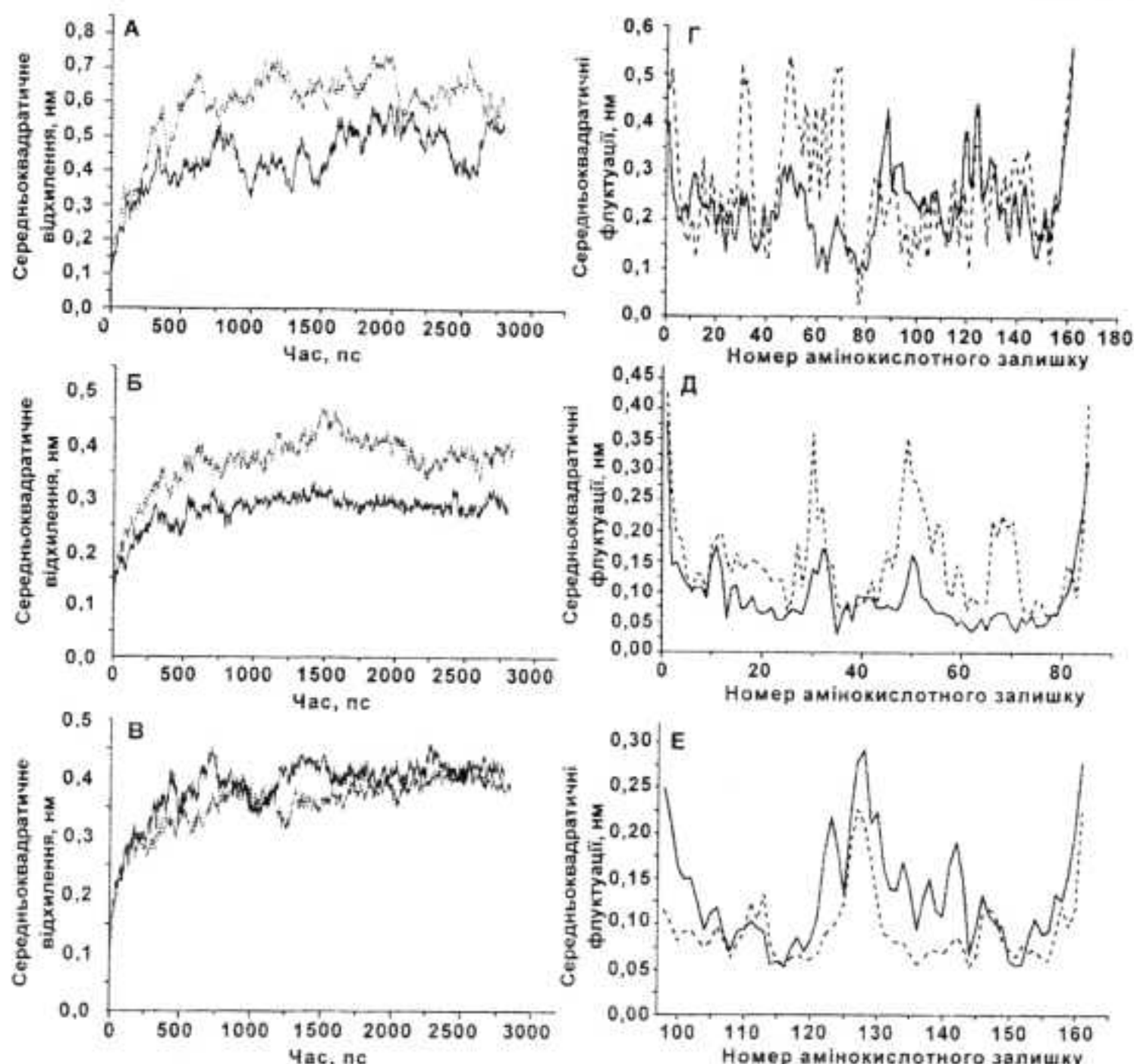


Рис. 1. Графіки залежності середньоквадратичного відхилення від часу (А-В) та середньоквадратичних флуктуацій від номера амінокислотного залишку (Г-Е): А, Г – для всієї молекули білка, Б, Д – для N-домену, В, Е – для С-домену. Суцільна лінія – молекула насиченого іонами кальцію тропоніну С, пунктирна лінія – молекула ненасиченого іонами кальцію тропоніну С

Як видно з рис. 1, Б, В, різниця RMSD між апо-сТНС і холо-сТНС у N-домені істотна, тоді як у С-домені незначна. У С-домені значення RMSD апо-сТНС навіть трохи менше за показники цього параметра в холо-сТНС. Середні значення після періоду врівноваження тривалістю 500 пс для апо-сТНС і холо-сТНС відповідно дорівнюють: С-домен – $0,37 \pm 0,02$ нм і $0,40 \pm 0,02$ нм; N-домен – $0,39 \pm 0,03$ нм і $0,29 \pm 0,01$ нм. Можна констатувати, що основні перебудови, які розрізняють динаміку різних форм тропоніну С, припадають саме на N-домен.

Аналогічна ситуація має місце і для визначення залежності величини середньоквадратичних флуктуацій (RMSF) C_{α} -атомів від номера амінокислотного залишку в молекулі сТНС. На рис. 1, Г-Е показано таку залежність для всієї молекули сТНС і для її доменів. Характер кривих відрізняється для всієї молекули та для доменів, тобто поєднанням графіків для N- та для С-домену не буде отримано криву, яка була розрахована для повної молекули. Як було сказано вище, це пов'язано з накладанням структури в певний момент часу на початкову структуру в нульовій точці. Це говорить про гнучкість лінкера (центральної α -спіралі), що поєднує два домени. Тому детальний аналіз рухливості доцільніше проводити за графіками, одержаними окремо для доменів, ніж за графіками для всієї молекули.

На рис. 1, Д показано, що найрухливіші ділянки холо-сТНС у N-домені сформовані амінокислотними залишками 9-13, 29-34, 48-52 (крайові ділянки не враховуються). Рухливість цих ділянок лежить у межах від 0,1 до 0,15 нм. Ці залишки відповідають петлям між спіралями N і A, A і B, B і C і належать до найбільш експонованих ділянок N-домену. Понижена рухливість у порівнянні з апо-сТНС спостерігається в ділянках 12-32 та 44-76, які формують спіраль A, частково спіраль B, лінкер, що поєднує EF-руки в N-домені, та петлю між спіралями C і D. Найбільше відрізняється рухливість саме ділянки, яка відповідає за зв'язування іона кальцію в N-домені. Можливо, рухливість сайту зв'язування іона кальцію корелює з рухливістю експонованих ділянок білка в N-домені й це є механізмом функціонування тропоніну С за участю іонів кальцію.

У С-домені (рис. 1, Е) великий пік припадає на ділянку 120-130, яка є частиною F-спіралі та петлі, що поєднує EF-руки третього й четвертого сайтів зв'язування кальцію. Другорядні піки, які є спільними для холо-сТНС та апо-сТНС, відповідають петлям між спіралями E і F, G і H.

Таким чином, за даними наших розрахунків виявлено значну рухливість центральної α -спіралі та зафіксовано більшу стабільність структури білка з трьома іона-

ми кальцію в порівнянні з молекулою тропініну С у комплексі з двома іонами кальцію. Визначено, що найбільша відмінність у конформаційній рухливості двох форм тропініну С спостерігається в сайті зв'язування іона кальцію в N-домені та найбільш експонованих ділянках N-домену, які можуть відігравати важливу роль у функціонуванні тропініну С серцевого м'яза.

Автори висловлюють щирі подяки співробітникам Обчислювального центру Київського національного університету імені Тараса Шевченка (www.cluster.univ.kiev.ua) за надану можливість проводити розрахунки на кластері Обчислювального центру (13 двопроцесорних нод Dual PIII-933MHz,

RAM 512MB, HDD SCSI 36GB, Gigabit Ethernet, пікова потужність – 13 Gflops).

1. Гавриленко В.В., Канібопоцький Д.С., Мірошніченко М.С. та ін. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2005. – Вип. 45. – С. 53–56.
2. Филатов В.П., Камруха А.Г., Буларгина Т.В., Гусев Н.Б. // Биохимия. – 1999. – Т. 64, вып. 9. – С. 1155–1174.
3. Van der Spoel D. et al. Gromacs User Manual. – Groningen, Netherlands // www.gromacs.org
4. Daura X., Gademann K., Schafer H., Jaun B. et al. // J. Am. Chem. Soc. – 2001. – Vol. 123. – P. 2393–2404.
5. Dvoretzky A., Abusamhadneh E.M., Howarth J.W., Rosevear P.R. // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, № 41. – P. 38565–38570.
6. Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. // J. Mol. Model. – 2001. – Vol. 7. – P. 306–317.
7. Samuel K. et al. // The J. of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272, № 29. – P. 18216–18221.
8. Slupsky C.M., Sykes B.D. // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34, № 49. – P. 15953–15964.

Надійшла до редколегії 05.10.05

УДК 581.2.07

В. Белава, асп., О. Панюта, канд. біол. наук,
Н. Таран, д-р біол. наук

ОСОБЛИВОСТІ ГОРМОНАЛЬНОГО БАЛАНСУ РОСЛИН ПРИ ІНФІКУВАННІ ПАТОГЕННИМИ ГРИБАМИ

Проаналізовано сучасний стан даних щодо змін фітогормонального балансу в системі рослина – фітопатогенний гриб. Показано можливу роль саліцилової кислоти в індукції стійкості рослин до патогенів.

Current data about phytohormonal balance changes in plant – phytopathogenic fungi system. Possible role of salicylic acid for inducing plant resistance to pathogenes has been proposed.

Одним з найважливіших напрямків розвитку сільськогосподарства в Україні є нарощування виробництва зерна і підвищення зернового комплексу країни. Вирішення цього питання – одна з умов становлення української державності. До основних факторів, що значно лімітують отримання високих врожаїв, належать хвороби сільськогосподарських культур. Тому одним з важливих чинників стабілізації зернового господарства і значним резервом збільшення врожаїв зернових культур є раціональний, всебічно обґрунтований захист посівів від патогенних організмів, провідне місце серед яких посідають гриби.

Одним з найрадикальніших методів боротьби з втратами врожаю від хвороб є виведення і впровадження в практику стійких сортів сільськогосподарських рослин.

Комплексне дослідження і розкриття механізму взаємодії системи рослина – патоген сприятиме розширенню методів створення стійких сортів з пролонгованим збереженням цієї ознаки, відкриває шляхи мінімізації обсягів використання пестицидів при одночасному збільшенні врожаю та якості зерна, а також забезпеченні високого рівня біологічної чистоти вирощеної продукції.

Основними хворобами зернових колосових культур, які викликаються грибами, в Україні зареєстровані кореневі гнилі (звичайна, або гелмінтоспориозна, коренева гниль, фузаріозна коренева гниль, церкоспорельозна прикоренева гниль, або очкова плямистість, офіобольозна гниль, ризоктоніоз), іржасті захворювання (іржа бура листовата, лінійна, або стеблова, та жовта), сажкові захворювання (сажка тверда, летюча, карликова та стеблова), септоріоз, борошниста роса, фузаріоз колоса та ріжки злаків.

Щорічні втрати врожаю пшениці від ураження бурю іржею становлять 4–5 %, а в роки епіфітотій – навіть до 50 % врожаю. В епіфітотійні роки загибель посівів озимих від плісняви і корневих гнилей досягає 50–70 %.

У Росії епіфітотії корневих гнилей в останні роки стали повторюватися з частотою 3–6 з 10 років, а щорічні втрати від корневих гнилей складають 15–30 %. У Чилі, наприклад, у 2003 р. втрати врожаю при ураженні рослин пшениці церкоспорельозом становили 90–100 % [7].

Отже, великою проблемою на посівах зернових нашої держави та багатьох інших країн останніми роками стали кореневі та прикореневі гнилі, що призводять до значних втрат врожаю. Кореневі гнилі спричинюються фітопатогенними грибами кількох родів, що живуть у ґрунті та зберігаються на насінні й рослинних рештках. Значного поширення набула церкоспорельозна прикоренева гниль.

Церкоспорельоз, або очкова плямистість, – прикоренева гниль озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.), збудником якої є гриби *Oculimacula yallundae* (Wallwork & Sponer) Crous & W.Gams і *O. aciformis* (Boerema, R.Pieters & Hamers) Crous & W.Gams [11], донедавна відомі як єдиний вид *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, який зберігається на рослинних рештках. Зимуюча конідіальна стадія є джерелом ураження проростків пшениці. Крім пшениці уражається ячмінь, жито, овес і дикоростучі трави.

В Україні серед зареєстрованих сортів пшениці стійких до церкоспорельозу немає, а тому актуальним є дослідження хімізму взаємодії рослини-живителя і збудника церкоспорельозу.

Інфікування рослин збудниками різних хвороб є поширеним стресом, що зазвичай викликає каскад метаболічних змін, які можна підсумовувати як мультикомпонентні відповіді. Так, первинні (основні) порушення метаболічних функцій рослинного організму є результатом безпосередньої дії стресору на клітини, а саме: порушення структурної цілісності мембран і зміна їхньої проникності, зміна рН, властивостей і стану

цитоплазми та ін. Вторинні порушення є наслідком первинних. До них відносять індукцію синтезу стресових білків і окремих притаманних нормі білків на фоні пригнічення тотального білкового синтезу, підвищення концентрації стресових фітогормонів – абсцизової кислоти (АБК) та етилену, а також інших ендогенних регуляторів росту, наприклад саліцилату і жасмонату, які задіяні в індукції стрес-реакцій; і, що важливо, поряд з цим – зниження рівня індолілоцтової кислоти (ІОК), цитокинінів (ЦК) і гіберелінів, гальмування ростових процесів. І, як результат, зміни ряду інтегральних показників організму, до яких відносять поглинання та утилізацію елементів мінерального живлення, приріст біомаси, врожай зерна тощо [8].

Центральною ланкою в регуляції формування реакцій-відповідей рослинних організмів на інфікування, імовірно, є гормональна система, до того ж, у цьому випадку має місце складна картина активного взаємовпливу гормональних систем двох організмів, який зумовлює характер розвитку захисних механізмів рослин до фітопатогенів і розвитку у фітопатогенів механізмів для забезпечення їхнього успішного паразитування. Про це свідчать, з одного боку, дослідження з аналізу балансу ендогенних гормонів хворої рослини і впливу екзогенних фітогормонів на різні процеси метаболізму рослинних клітин, які залучаються до захисту від патогенів, та роботи з оцінювання здатності грибних патогенів синтезувати речовини фітогормональної природи та динаміки їхнього вмісту в процесі життєвого циклу – з іншого боку.

Серед стресових фітогормонів АБК посідає перше місце. Саме цьому гормону відводять ключову роль у перемиканні функціональної активності клітин з нормальних на так звані стресові програми за дії несприятливих факторів середовища [4].

Ряд дослідників [5; 9] виявили збільшення вмісту АБК при адаптації рослин до різних за природою стресових впливів, у тому числі й ураженні фітопатогенними грибами. Вважається, що стрес-індуковане накопичення АБК може бути віднесене до універсальної неспецифічної реакції і є одним з проявів реакцій захисного гальмування метаболізму, що дозволяє рослинам "пережити" стресові ситуації з найменшими втратами [9].

За даними Шакирової [8] інфікування зерна пшениці збудниками кореневих гнилей родів *Fusarium* та *Helminthosporium (Bipolaris)* ініціює різке, майже стократне накопичення АБК у рослинах, що підтримується впродовж онтогенезу (і у фазу куціння, і у фазу трубкування). Це неминуче має призводити до зниження активності метаболізму рослин, що цілком сприятливо для збудників кореневої гнилі, оскільки вони є некротрофами й чудово розвиваються в уражених рослинних тканинах з послабленим тургором.

Максимов із співроб. [4] при дослідженні реакції клітин калюсу пшениці на ураження збудником твердої сажки *Tilletia caries* також спостерігали накопичення АБК, кількість якої до 15-ї доби втричі перевищила контроль. Інфікування насіння пшениці теліоспорами даного біотрофа давало слабке короткотривале накопичення АБК.

Значне збільшення вмісту ендогенної АБК спостерігали у тканинах листків флокса при ураженні збудником борошнистої роси *Erysiphe cichoracearum* [6].

У досліджах Васюк [1] виявлено, що інокулювання проростків пшениці сприйнятливих сортів суспензією спор гриба *Septoria nodorum* (збудник септоріозу) індукує різке оборотне накопичення АБК у рослинах, мак-

симум якого припадає на 2-гу добу з моменту ураження і втричі перевищує контрольне значення. У наступні дні дослідні й контрольні рослини за вмістом АБК майже не відрізнялись.

Отже, АБК відіграє особливу роль у формуванні відповіді рослинного організму на стрес.

Антагоністами АБК у нормі виступають ауксини та цитокиніни.

У досліджах Максимова із співробітниками [4] виявлено, що інфікування калюсів пшениці збудником твердої сажки *Tilletia caries* викликало швидке збільшення рівня ІОК, яке на 9–15-ту добу втричі перевищує контроль. Автори пов'язують це з високим вмістом ауксинів у теліоспорах цього патогену. Така зміна вмісту ІОК може стати передумовою для гіпертрофованого росту рослинних клітин у подвійній культурі, що вигідно для живлення і розмноження типового біотрофа *T. caries*. Інфікування ж насіння пшениці теліоспорами даного гриба викликало слабке короточасне накопичення ІОК у проростках.

Збудники кореневих гнилей некротрофні патогени родів *Fusarium* та *Helminthosporium (Bipolaris)* продукують у культуральне середовище речовини ауксинової природи [3], але інфікування пшениці названими патогенами викликає стійке падіння рівня ІОК у тканинах листків у фазу куціння і трубкування, тому не варто говорити про помітний вклад ауксину грибного походження в тотальну ІОК. З огляду на роль ауксинів у процесах життєдіяльності рослин і тип живлення патогенів родів *Fusarium* та *Helminthosporium (Bipolaris)*, можна зробити висновок, що затухання метаболічних реакцій, втрата тургору і подальша загибель рослини провокується активним впливом хімреагентів гриба на гормональну систему регуляції рослини.

Інокуляція проростків сприйнятливих до септоріозу сортів пшениці суспензією спор *Septoria nodorum* [1] одразу ж приводить до короточасного збільшення кількості ІОК, а згодом – до поступового стійкого накопичення цього гормону в інфікованих рослинах (до 9-ї доби відмічається збільшення ІОК у 2,5 рази). Первинне транзитне накопичення ІОК у проростках одразу ж після інфікування, імовірно, відбувається за рахунок рослинного ауксину, оскільки за такий короткий проміжок часу патоген ще не зміг накопичити достатньої біомаси. Подальше накопичення ІОК, імовірно, пов'язане із суперпродукуванням цього фітогормону грибними клітинами, оскільки ауксини необхідні для росту та розвитку гриба *S. nodorum*.

Динаміку вмісту ІОК у тканинах рослин, інфікованих грибами *Oculimacula yallundae* і *O. aciformis* у різні фази онтогенезу не з'ясовано.

Що стосується захисної дії ЦК, то вважають, що вони підвищують стійкість рослин до фітопатогенів, беручи участь в експресії ряду захисних генів, а також у синтезі антифунгальних алкалоїдів [19]. Захисний ефект екзогенного цитокиніну за дії стресових факторів виявляється як на гормональному, так і на трансляційному рівнях, а саме: у запобіганні зменшенню вмісту ІОК, гальмуванні різкого накопичення АБК і деградації білоксинтезуючого апарату [8].

З іншого боку, існують відомості про негативну регуляцію ЦК захисної відповіді. З'ясувалося, що вони можуть пригнічувати активність хітинази *Phaseolus vulgaris*, продукцію активних форм кисню та синтез фітоалексинів [14; 17].

Інфікування калюсів пшениці збудником твердої сажки *Tilletia caries* індукує значне (у 2,7 рази) збільшення вмісту ЦК упродовж 4-х діб культивування, стимулюючи неконтрольований ріст калюсів поряд із розвитком некротичної реакції. При подальшому культивуванні рівень гормону знижується, але майже постійно перевищує контрольне значення [4]. Оскільки ЦК у значних кількостях продукується збудником твердої сажки *T. caries*, цей гормон міститься в теліоспорах гриба, то в даному випадку складно оцінити окремий внесок рослини та патогену в накопичення рівня ЦК.

Досить недавно до групи речовин, які відіграють важливу роль у регуляції росту й розвитку рослин, а також у взаємодії рослин з іншими організмами, віднесли давно відому лікарську речовину рослинного походження саліцилову кислоту (СК).

Є дані, які свідчать про участь СК у індукції та розвитку системної набутої стійкості (СНС) (або набутої системної резистентності – НСР). Відомо, що резистентні сорти рослин обмежують розповсюдження грибних, бактеріальних і вірусних патогенів появою невеликої некротичної зони, що є свідченням виникнення індукованої стійкості (ІС), яку поділяють на локальну, котра знаходиться в зоні контакту з патогеном, та системну (СІС), яка проявляється у вільних від патогену частинах рослини. СІС розвивається через деякий час після інфікування і може зберігатись достатньо тривалий час [18].

Характерним для розвитку СІС є системний синтез PR-білків [13]. Локалізація, час дії та функції деяких PR-білків підтверджує їхню участь у СІС. Стійкість до патогенів у рослин та індукування ними деяких PR-білків можуть викликатися СК або ацетилсаліциловою кислотою (АСК) навіть за відсутності патогенних організмів.

З тканин тютюну виділили, очистили та ідентифікували білок, з яким зв'язується СК. Білок виявився каталазою – ферментом, який перетворює пероксид водню до кисню та води. Зв'язування з СК блокує його активність, викликає накопичення H_2O_2 , який сам, або через інші види активного кисню активує експресію захисних генів, виступаючи як внутрішньоклітинний месенджер. Таким чином індукується синтез PR-1-білка, що є молекулярним маркером СНС і розвитку стійкості. Вважається, що накопичення H_2O_2 , крім того, приводить до інтоксикації патогенів, а також цілого ряду важливих для розвитку стійкості наслідків: до реакції надчутливості (РНЧ), зміцнення клітинних стінок, стимулювання утворення інгібіторів протеїназ [13].

У культурі клітин тютюну СК та її біологічно активні аналоги [10], що підвищують експресію PR-генів, підвищували також хворобостійкість, інгібували каталазу та індукували накопичення продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Також з'ясовано [15], що СК зв'язує не тільки каталазу, а й багато які із залізовмісних ферментів, наприклад: аскорбатпероксидазу, ліпоксидазу, пероксидазу, аконітазу.

Максимовим із співорб. [4] на калюсі пшениці досліджено характер змін гормонального балансу та інтенсивність ростових процесів під впливом СК у початковій фазі встановлення відносин між рослинними клітинами та грибом *Tilletia caries* (збудником твердої головної). Інфікування калюсів пшениці названим патогеном приводить до гіпертрофованого росту за рахунок збільшення розмірів клітин. Але під впливом екзогенної СК швидкість накопичення сирої речовини суттєво знижу-

ється вже до 10-ї доби. Крім того, у присутності СК у калюсних клітин, які контактують з міцелієм гриба, розвивається некротична реакція. Дослідження показали, що наявність СК запобігала помітному збільшенню кількості ІОК відносно контролю в інфікованих зразках, з чим, імовірно, і пов'язане гальмування накопичення сирої речовини. Інкубування заражених калюсів у середовищі, що містить СК не викликає майже ніяких змін у вмісті цитокінінів відносно контролю, тобто кількісний цитокініновий сплеск, притаманний у перші три доби інфікованим калюсам не відбувається. Ймовірно, цитокініни не належать до числа інтермедіаторів у ланцюгу дії СК. СК має стабілізуючий ефект на вміст цього гормону в умовах патогенезу. Можливо саме цим пояснюється мала кількість відомостей про зміни вмісту цитокінінів при фітопатогенезі. Ураження калюсів пшениці збудником твердої сажки викликає збільшення вмісту АБК до 15-ї доби у 3,3 рази відносно контролю. Наявність екзогенної СК суттєво знижує цей показник – кількість АБК у інфікованих калюсах у присутності СК збільшується поступово й до 15-ї доби перевищує контроль удвічі. Збільшення рівня АБК у калюсах під дією СК може свідчити про індукцію у клітинах синтезу захисних сполук, які, у свою чергу, можуть сприяти адаптації до стресових впливів і зниженню ступеню їхніх пошкоджувальних дій. Вважається, що стабілізація гормонального балансу рослинних клітин при патогенезі є одним із можливих механізмів захисної дії СК *in vitro* та *in vivo*.

При дослідженні трансгенних рослин тютюну та арабідопсису, які містять бактеріальний фермент саліцилатгідроксилазу й не здатні накопичувати СК, з'ясувалося [12], що вони втрачають здатність до індукції СНС. Це супроводжується підвищенням чутливості до патогенів вірусного, бактеріального та грибного походження, причому навіть у тих випадках, коли відносно до нормальної рослини-живителя паразит авірулентний. Автори роблять висновок, що біосинтез СК є необхідним для запуску цілої низки захисних реакцій рослин.

Однак не можна вважати СК універсальним індуктором СНС. Роль екзогенної СК у патогенезі різних рослин достатньо складна та суперечна. Прояв її захисних функцій залежить від багатьох факторів (концентрації, інтервалу між обробками та інфікуванням, виду рослин тощо) [2]. Крім того, деякі неуразжені патогенами рослини, наприклад картопля, містять досить високий початковий рівень СК, який у 40–100 разів перевищує такий у рослин тютюну й арабідопсису [20], проте не забезпечує конституційну стійкість до *Phytophthora infestans*. Здорові рослини рису теж мають дуже високий вміст СК [16], на порядок більший, ніж листки тютюну. Ураження ж патогенами не викликає її накопичення в тканинах, тому автори вважають, що в рослинах рису СК, імовірно не є індуктором стійкості.

Безперечно, дуже важливим є з'ясування всього ланцюгу реакцій сприйняття та передачі сигналів, які індукуються зовнішніми факторами та ролі в ньому СК.

Отже, питання тонких механізмів взаємовпливу рослин та патогенів на рівні фітогормонів залишається відкритим. Спосіб живлення патогенних організмів, стійкість/сприйнятливність сорту рослин, фаза онтогенезу, роль кожного гормону та їхня взаємодія між собою та з іншими активними речовинами накладають відбиток на весь процес взаємовідношень рослина – патоген.

1. Васюк В.А., Андріанова Т.В., Мусатенко Л.І. // Укр. ботан. журн. – 1996. – Т. 53, № 4. – С. 341–345. 2. Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецкая О.Л. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 5. – С. 557–563. 3. Волюнец А.П., Пшеничная Л.А., Кароза С.Э., Манжелесова Н.Э. // Докл. АН Беларуси. – 1993. – Т. 39, № 1. – С. 166–168. 4. Максимов И.В., Сурина О.Б., Сахабудинова А.Р. и др. // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 2. – С. 256–261. 5. Максимов И.В., Шакирова Ф.М., Хайруллин Р.М., Безрукова М.В. // Микология и фитопатология. – 1996. – Т. 30. – С. 75–83. 6. Таллиева М.Н., Бельинская Е.В., Кондратьева В.В. // Изв. АН. Сер. Биология. – 1999. – № 3. – С. 290–295. 7. Тютеев С.П. // Защита и карантин растений / Приложение. Протравливание семян зерновых колосовых культур. – 2001. – № 3. – С. 3–11. 8. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа, 2001. 9. Шакирова Ф.М., Максимов И.В., Хайруллин Р.М. // Физиология и биохимия культурных растений. – 1994. – Т. 26. – С. 40–45. 10. Conrath U., Silva H., Klessig

D.F. // Plant J. – 1997. – Vol. 11, № 4. – P. 747–757. 11. Crous P., Groenewald J., Gams W. // Eur. J. Plant. Path. – 2003. – № 109. – P. 841–850. 12. Delaney Terrence P., Uknes Scott, Vernooij Bernard et al. // Science. – 1994. – Vol. 266, № 5188. – P. 1247–1250. 13. Dumer J., Shah J., Klessig D.F. // Trends Plant Sci. – 1997. – № 2. – P. 266–274. 14. Hughes R.K., Dickerson A.G. // Plant Cell Physiol. – 1990. – Vol. 31. – P. 667–675. 15. Ruffer M., Steipe B., Zenk M.N. // FEBS Letters. – 1995. – Vol. 377, № 1. – P. 175–180. 16. Silverman P., Seskar M., Kanter D. et al. // Plant Physiol. – 1995. – Vol. 108, № 2. – P. 633–639. 17. Tamogami S., Rahwal R., Kodama O. // FEBS Lett. – 1997. – Vol. 412. – P. 61–64. 18. Vernooij B., Friedrich L., Morse A. et al. // Plant Cell. – 1994. – Vol. 6, № 6. – P. 959–965. 19. Yahia A., Kevers C.B., Gaspar T.B. et al. // Plant Science. – 1998. – Vol. 133. – P. 9–15. 20. Yu D., Xie Z., Chen C. et al. // Plant Mol. Biol. – 1999. – Vol. 39. – P. 477–788.

Надійшла до редколегії 10.10.05

УДК 633.811.615:625.77:551.510.04.001.8

О. Ткачук, канд. біол. наук

ПЕРСПЕКТИВНІ СОРТИ ТРОЯНД ДЛЯ ОЗЕЛЕНЕННЯ ТЕРИТОРІЙ ПРОМИСЛОВИХ ПІДПРИЄМСТВ

Представлено перспективні для озеленення промислових (машинобудівних) підприємств сорти троянд, досліджені безпосередньо в умовах систематичного забруднення атмосферного повітря.

In the article the kinds of roses perspective for gardening of industrial (mechanical engineering) firms are shown. They studied directly in conditions of systematic pollution of free air.

Вступ. Троянда – одна з основних декоративних культур, яку часто використовують в озелененні різних об'єктів, але до цього часу дуже мало наукової інформації щодо поведінки окремих сортів троянд в умовах промислового забруднення середовища. Це можна пояснити тим, що об'єктами досліджень науковців у першу чергу були рослини, які мають господарську чи санітарно-гігієнічну цінність. Троянди в цьому відношенні відіграють другорядну роль, але декоративне значення їх безсумнівне.

Як показали наші дослідження, не всі сорти троянд здатні нормально рости, розвиватися і протистояти токсичній дії промислових викидів, де вони в атмосферному повітрі значно перевищують допустимі норми. Окремі з них втрачають свої декоративні якості, скорочують строки життєдіяльності і, навіть, передчасно гинуть [5; 7; 8]. Тому добір сортів троянд для трансформованого середовища є актуальним і необхідним.

Існують різні методи відбору рослин для вирощування в зоні промислового забруднення довкілля, але, як показала наша практика, випробування їх щодо росту, розвитку, декоративності та газостійкості безпосередньо в зоні постійного задимлення є найефективнішим.

У таких умовах на рослинний організм впливає сумарна дія токсичних викидів різного хімічного складу, а це для рослин є більш згубним, ніж послідовна дія кожного газу окремо.

Сучасний різноманітний асортимент троянд дає змогу відібрати з них найперспективніші сорти, яким притаманні такі форми газостійкості, як біологічна – спроможність рослин відновлювати пагони упродовж сезону декілька разів, морфолого-анатомічна, яка визначається щільною шкірястою покривною тканиною листків, що гальмує проникнення газів і пилу в середину рослини, і фізіологічна – спроможність рослинного організму в процесі метаболізму зв'язувати та нейтралізувати адсорбовані токсичні речовини.

Саме ці та інші положення стали приводом для всебічного дослідження культури троянд безпосередньо на території машинобудівного підприємства, у викидах якого основними складовими були суміш вуглеводнів (бензин, бензол, уайт-спірит), сполуки сірки, азоту та хрому в концентраціях, що в 1,5–5 разів перевищували гранично допустимі норми.

Об'єкт і методи досліджень. Об'єктами досліджень були перевірені нами попередньо та відібрані з колекції саду сорти чайно-гібридної (НТ), флорибунда (Fl), гібридно-поліантової (НPol), поліантової (Pol) та виткої (LCI, S) груп троянд, які придатні для озеленення територій різних об'єктів.

Досліди – багаторічні, проводили їх у культурі відкритого ґрунту. Оцінку успішності культури вивчали методом порівняльного аналізу еколого-біологічних і морфолого-фізіологічних особливостей та декоративних якостей окремих сортів троянд паралельно в Ботанічному саду ім. акад. В. Фоміна й на території машинобудівного підприємства м. Києва. Усього перевірено 28 сортів троянд.

Погодні, ґрунтові умови та агротехнічний догляд за рослинами описано нами раніше [6; 9].

Ріст, розвиток, декоративність, газостійкість вивчали за методикою, прийнятою ботанічними садами [3; 4].

Опис сортів, рекомендованих нами для озеленення територій промислових підприємств, подано на підставі власних багаторічних досліджень, а також з використанням літературних джерел [1; 2].

Результати та їх обговорення. **'Alain' HPol.** Квітки кармінно-червоні, яскраві, до 7 см у діаметрі, напівмахрові (до 17 пелюсток), ледь пахучі, зібрані в суцвіття по 10–12 квіток. Листочки темно-зелені, шкірясті. Кущі до 70 см заввишки, прямі, густі. Цвіте дуже рясно, з невеличкими перервами 2–3 рази протягом літа. Сорт зимостійкий. У період тривалої дощової погоди пошкоджується борошнистою росою. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря. Поміт-

ної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду у роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень у вигляді рабаток і бордюрів.

'Border King' Pol. Бутони круглясті. Квітки сунично-червоні з білим центром, чашоподібні, до 6 см у діаметрі, напівмахрові (до 16 пелюсток), зібрані у великі суцвіття до 45 квіток. Листочки великі, темно-зелені, шкірясті, блискучі. Кущі до 60 см заввишки, прямі, з міцними пагонами. Цвіте дуже рясно, майже безперервно до морозів. Сорт зимостійкий. У період тривалої дощової погоди злегка пошкоджується борошнистою росою. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень у вигляді рабаток і бордюрів.

'Centenaire de Lourdes' Fl. Бутони круглясті, загострені. Квітки ніжно-рожеві, до 9 см у діаметрі, напівмахрові (до 25 пелюсток), пахучі, зібрані в суцвіття до 10 квіток. Листочки шкірясті, блискучі. Кущі до 1,5 м заввишки, прямі, густі. Цвіте дуже рясно, до морозів. Сорт зимостійкий. Стійкий до грибних хвороб. Сорт досить стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря. Зменшення кількості й розмірів пагонів і зниження декоративності у рослин на території промислового підприємства порівняно з тими, що в ботанічному саду відмічено в літньо-осінній розвиток троянд. Рекомендуємо для невеличких групових насаджень і штамбової культури на тлі газону.

'Champs-Elysees' HT. Бутони круглясті. Квітки темно-червоні з оксамитовим відтінком, чашоподібні, до 12 см у діаметрі, махрові (до 40 пелюсток), ледь пахучі, переважно по одній на пагоні, на сонці колір майже не втрачають. Листочки зелені, блискучі. Кущі до 80 см заввишки, густі. Цвіте рясно, до заморозків. Сорт досить зимостійкий. Майже не пошкоджується грибними хворобами. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень великими масивами та штамбової культури на тлі газону.

'Chatter' HPol. Бутони загострені. Квітки темно-червоні з оксамитовим відтінком, чашоподібні, до 8 см у діаметрі, напівмахрові (до 17 пелюсток), зібрані у суцвіття по 10–20 квіток. Листочки темно-зелені. Кущі до 60 см заввишки, компактні, густі. Цвіте дуже рясно і тривалий час. Сорт зимостійкий. Майже не пошкоджується грибними хворобами. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень у вигляді рабаток і бордюрів.

'Dame de Coeur' HT. Квітки вишнево-червоні, круглясті, з гострим центром, до 12 см у діаметрі, густомахрові (понад 60 пелюсток), ледь пахучі, здебільшого по одній на пагоні, на сонці колір майже не втрачають. Листочки великі, темно-зелені, шкірясті, блискучі. Кущі до 1 м заввишки, прямі, компактні, з міцними пагонами. Цвіте рясно, до морозів. Сорт зимостійкий. У період тривалої дощової погоди трохи пошкоджується борош-

нистою росою. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень.

'Europeana' HT. Бутони кулясті. Квітки криваво-червоні, до 8 см у діаметрі, густомахрові (до 70 пелюсток), пахучі, зібрані у великі суцвіття до 15 квіток. Листочки темно-зелені, молоді – з бронзовим відтінком. Кущі до 60 см заввишки, компактні, густі. Цвіте рясно, до морозів. Сорт зимостійкий. У період тривалої дощової погоди трохи пошкоджується борошнистою росою. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду у роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень у вигляді рабаток і куртин.

'Flammentanz' LCl. Квітки темно-червоні, яскраві, до 8 см у діаметрі, махрові (до 30 пелюсток), ледь пахучі, зібрані в суцвіття до 15 квіток. Листочки великі, темно-зелені, шкірясті. Кущі до 3 м заввишки з міцними пагонами. Цвітіння рясне і тривале, в окремі роки ремонтує. Сорт зимостійкий. Стійкий до грибних хвороб. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для вертикального озеленення, невеличких групових насаджень або у вигляді солітерів на газоні.

'Gratitude' HT. Бутони круглясті. Квітки червонувато-жовтогарячі, чашоподібні, 5–7 см у діаметрі, махрові (до 40 пелюсток), ледь пахучі, зібрані у суцвіття по 4–10 квіток, на сонці колір не втрачають. Листочки середні, темно-зелені, шкірясті, блискучі. Кущі до 60 см заввишки, прямі, компактні, густі. Цвіте дуже рясно, до заморозків. Сорт зимостійкий. У період тривалої дощової погоди трохи пошкоджується грибними хворобами. Сорт досить стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря. Зменшення кількості та розмірів пагонів і зниження декоративності у рослин на території промислового підприємства порівняно з тими, що в ботанічному саду відмічено в літньо-осінній розвиток троянд. Рекомендуємо для групових насаджень.

'Iceberg' Fl. Бутони видовжені, загострені. Квітки сніжно-білі, до 8 см у діаметрі, махрові (до 30 пелюсток), ледь пахучі, зібрані в суцвіття до 8 квіток. Листочки середні, світло-зелені, блискучі. Кущі до 1 м заввишки, ледь розлогі. Цвіте дуже рясно, до морозів. Сорт зимостійкий. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень і штамбової культури на тлі газону.

'Kordes' Sondermeldung' Fl. Квітки жовтогарячо-червоні, чашоподібні, до 10 см у діаметрі, махрові (до 40 пелюсток), зібрані в суцвіття до 7 квіток. Листочки темно-зелені, блискучі, молоді – з бронзовим відтінком. Кущі до 70 см заввишки, густі, ледь розлогі, з міцними пагонами. Цвіте дуже рясно, до морозів. Сорт зимостійкий. У період тривалої дощової погоди трохи пошкоджується борошнистою росою. Сорт досить стій-

кий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря. Зменшення кількості й розмірів пагонів і зниження декоративності у рослин на території промислового підприємства порівняно з тими, що в ботанічному саду відмічено в літньо-осінній розвиток троянд. Рекомендуємо для групових насаджень і штамбової культури на тлі газону.

'Lagerfeuer' Fl. Бутони загострені. Квітки криваво-червоні з оксамитовим відтінком, чашоподібні, до 8 см у діаметрі, махрові (до 25 пелюсток), зібрані в суцвіття по 5–15 квіток, на сонці колір не втрачають. Листочки темно-зелені, шкірясті. Кущі до 80 см заввишки, прямі, густі. Цвіте дуже рясно, до заморозків. Сорт зимостійкий. Досить стійкий до грибних хвороб. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень.

'Maigold' S. Бутони видовжені, загострені. Квітки бронзово-жовті, чашоподібні, до 10 см у діаметрі, напівмахрові (до 17 пелюсток), пахучі, зібрані в суцвіття до 7 квіток, на сонці колір не втрачають. Листочки великі, шкірясті, блискучі. Кущі розлогі, пагони до 2 м завдовжки. Цвіте рясно, два рази за літо. Сорт зимостійкий. Стійкий до грибних хвороб. Сорт досить стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря. Зменшення кількості й розмірів пагонів і зниження декоративності в рослин на території промислового підприємства порівняно з тими, що в ботанічному саду відмічено в літньо-осінній розвиток троянд. Рекомендуємо для невеличких групових насаджень і штамбової культури на тлі газону.

'Marlena' Fl. Бутони яйцеподібні. Квітки темно-червоні з оксамитовим відтінком, до 8 см у діаметрі, махрові (до 35 пелюсток), зібрані в суцвіття по 3–10 квіток. Листочки темно-зелені, шкірясті. Кущі до 50 см заввишки, компактні, густі. Цвіте рясно, до осені. Сорт зимостійкий. Досить стійкий до грибних хвороб. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень у вигляді рабаток і бордюрів.

'New Dawn' LCl. Бутони загострені. Квітки ніжно-рожеві чи майже білі, до 8 см у діаметрі, махрові (до 30 пелюсток), з ніжним яблучним ароматом, частіше зібрані в суцвіття до 5 квіток. Листочки маленькі, майже кулясті, шкірясті, блискучі, цупкі. Кущі густі, до 2 м заввишки, з дугоподібними міцними пагонами. Цвіте рясно, до морозів. Сорт зимостійкий. Стійкий до грибних хвороб. Сорт стійкий в умовах промислового

забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для вертикального озеленення, живоплотів і штамбової культури на тлі газону.

'Nina Weibull' Fl. Бутони овальні. Квітки темно-червоні, чашоподібні, до 7 см у діаметрі, махрові (до 50 пелюсток), зібрані в суцвіття по 4–15 квіток, на міцних квітконіжках, на сонці колір не втрачають. Листочки темно-зелені, шкірясті, блискучі. Кущі до 90 см заввишки, прямі, компактні. Цвіте дуже рясно, до осені. Сорт зимостійкий. Стійкий до грибних хвороб. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для групових насаджень у вигляді рабаток і бордюрів.

'Paul's Scarlet Climber' LCl. Бутони круглясті, червоні. Квітки яскраво-червоні, кулясті, до 8 см у діаметрі, повні (до 40 пелюсток), ледь пахучі, зібрані в суцвіття по 4–10 квіток, на сонці колір не втрачають. Листочки великі, темно-зелені, блискучі. Кущі до 2,5 м заввишки, розлогі, з товстими міцними пагонами. Цвіте дуже рясно упродовж 28–35 днів, в окремі роки ремонтує. Сорт зимостійкий. У період тривалої дощової погоди трохи пошкоджується борошнистою росою. Сорт стійкий в умовах промислового забруднення атмосферного повітря, помітної різниці в рості, розвитку та декоративності рослин на території промислового підприємства і ботанічного саду в роки досліджень не відмічено. Рекомендуємо для вертикального озеленення, живоплоту, штамбової культури та невеличкими групами на газоні.

Висновки. Багаторічні дослідження культури троянд в умовах промислового забруднення атмосфери дають нам підстави констатувати, що значна кількість сортів здатні нормально рости, розвиватися, не знижуючи своїх декоративних та інших якостей, в окремих помітне зниження регенераційних процесів відмічено у літньо-осінній розвиток рослин.

1. Былов В.Н., Михайлов Н.Л., Сурина Е.И. Розы. – М., 1988.
2. Клименко В.Н. Розы. – Симферополь, 1962.
3. Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР / Под ред. П.И. Лапина. – М., 1975.
4. Раскатов П.Б. Методы учета роста растений // Физиология растений с основами микробиологии. – М., 1958. – С. 230–233.
5. Ткачук О.О. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Інтро-дукція та збереження рослинного різноманіття. – 2001. – Вип. 33. – С. 30–32.
6. Ткачук О.О. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2003. – Вип. 40. – С. 75–76.
7. Ткачук О.О. // Вісн. Київ. ун-ту ім. Т. Шевченка. Біологія. – 2005. – Вип. 46. – С. 71–72.
8. Ткачук О.А., Ткачук О.О. // Охорона, вивчення і збагачення рослинного світу. – 1991. – Вип. 18. – С. 118–121.
9. Ткачук О.А., Ткачук О.О. Троянди. – К., 1993.

Надійшла до редколегії 10.10.05

УДК 615.28

О. Радченко, канд. біол. наук, Л. Степура, канд. техн. наук

БАКТЕРИЦИДНА ТА СПОРОЦИДНА ДІЯ КАТІОННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН І ДЕЗІНФЕКТАНТІВ, СТВОРЕНИХ НА ЇХНІЙ ОСНОВІ

Катіонні поверхнево-активні речовини відомі як група перспективних дезінфектантів. На їхній основі створюються різноманітні сучасні бактерициди. Показано, що бактерицидний ефект сучасних препаратів деконексу та септодору в порівнянні з активною речовиною не перевищує біоцидні властивості індивідуальної КПАР бензалконіум хлориду.

Cationic surfactants are known as perspective disinfectants. The different modern bactericides are created on its basis. It was shown that bactericide effect of such modern disinfectants as Deconex and Septodur are not exceeded the activity of the pure benzalkonium chloride (in the same concentration of the active compound).

Вступ. Поверхнево-активні речовини (ПАР) – це велика група синтетичних хімічних сполук, які завдяки дифільній молекулярній структурі здатні концентруватися на міжфазних поверхнях, змінюючи їхні властивості. За характером дисоціації всі ПАР поділяють на аніонні, катіонні, неіоногенні та амфолітні. Ці речовини широко використовуються в хімічній, нафтопереробній, целюлозно-паперовій, металургійній, приладобудівельній, харчовій, парфюмерній, текстильній, поліграфічній, медичній та інших промисловостях як стабілізатори, гідрофобізатори, модифікатори поверхні, емульгатори, диспергатори, піноутворювачі, мийні засоби, інгібітори корозії та антистатики [2].

Серед усіх ПАР, що виробляються у світі, найперспективнішою є група катіонних поверхнево-активних речовин (КПАР), які поєднують у собі ознаки всіх інших груп ПАР зі значними дезінфікуючими властивостями. На відміну від інших відомих дезінфектантів КПАР мають ряд суттєвих переваг, а саме: вони не агресивні, не леткі, практично не мають запаху та смаку, стійкі при зберіганні, не розкладаються і не втрачають своїх властивостей протягом довгого часу, мають нейтральні значення рН і гарно поєднуються з багатьма іншими хімічними речовинами [4]. Завдяки вказаним властивостям група КПАР – четвертинні амонійні сполуки – останнім часом широко використовується для розробки нового покоління дезінфікуючих засобів [5]. Однак дані про бактерицидні, спороцидні та бактеріостатичні концентрації дезінфектантів на їхній основі дуже різні й залежать від багатьох факторів [6]. Наразі механізми дії КПАР на мікробні клітини остаточно не з'ясовані. Існує дві теорії їхнього бактерицидного впливу. Згідно з першою теорією КПАР змінюють фізико-хімічні властивості поверхневих структур клітини та проникність цитоплазматичних мембран. Друга теорія пов'язана з впливом КПАР на метаболізм клітини, а саме: порушення окисного фосфорилування та дегідрогеназної активності [1].

Метою даної роботи було вивчити бактерицидну дію КПАР і дезінфікуючих препаратів на їхній основі на вегетативні бактеріальні клітини та ендоспори.

Об'єкти й методи дослідження. У роботі використовували індивідуальну четвертинно-амонійну сполуку гіамін 2389 (бензалконіум хлорид фірми "Merck", Німеччина) та сучасні дезінфікуючі препарати "Деконекс", що містив ряд четвертинних амонійних сполук і "Септодор", створений на основі попередників синтезу КПАР – солей амінів.

Експерименти проводили на штамах бактерій з музею кафедри мікробіології та загальної імунології КНУ імені Тараса Шевченка: *Bacillus pumilis*, *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*.

Для визначення бактерицидної дії КПАР до суспензії добової культури в дистильованій воді, що містила приблизно 10^8 – 10^9 КУО/мл, додавали гіамін 2389 до кінцевої концентрації 15–75 мг/л; деконекс – 10–2355 мг/л та септодор – 25–2355 мг/л. Концентрації розраховували за активною речовиною. Для визначення спороцидної дії суспензію *B. pumilis*, в якій було до 90 % спор у полі зору мікроскопа, перед експозицією прогрівали на водяній бані при 100°C протягом 10 хв для інактивації вегетативних клітин. Час експозиції становив для вегетативних клітин 15 хв, а для спор – 15–60 хв при кімнатній температурі. КУО/мл підраховували через 48 год інкубації на МПА та картопляному агарі при 32 – 37°C . Кількість бактерій, що вижили після такої обробки визначали за методом секторних висівів [7]. Частку клітин, що вижили, розраховували відносно N_t / N_0 , де N_t – це число бактерій, які вижили, а N_0 – початкова кількість бактерій, що була в розчині КПАР [3]. Контрольна суспензія клітин у дистильованій воді ПАР не містила.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень було показано (табл. 1), що при концентрації гіаміну 2389 10 мг/л клітини *S. aureus* інактивувалися на 2 lg. За тих самих умов життєздатність клітин *E. coli* зменшувалася на 1,3 lg. Збільшення концентрації гіаміну 2389 до 20 мг/л призводило до інактивації *S. aureus* на 4,7 lg, а *E. coli* на 2 lg, тобто кишкова паличка була у 2,35 рази менш чутливою до дезінфектанту, ніж стафілокок. При концентрації 40–75 мг/л спостерігалася інактивація обох культур на 5–5,5 порядків, тобто на 99,999 %. Отже, показано, що для інактивації *S. aureus* та *E. coli* на 99,999 % можна використовувати гіамін 2389 у концентрації 40 мг/л протягом 15 хв.

Сучасні дезінфікуючі препарати окрім активної речовини містять ряд сполук, які мають синергійний ефект, тобто підвищують її бактерицидні властивості. Було перевірено вплив деконексу на виживання клітин *S. aureus* та *E. coli* за тих самих умов. Показано, що кількість КУО/мл *S. aureus* зменшувалася на 4 lg (99,99 %) при концентрації активної речовини 20 мг/л. За цієї самої концентрації деконекс практично не впливав на *E. coli* – загибель клітин відбувалася лише на 0,2 порядки. Деконекс задовільно (на 4–5,7 lg) інактивував грамотрицативну *E. coli* лише при збільшенні концентрації дезінфектанту до 50–60 мг/л.

Вивчення впливу деконексу на спори *B. pumilis* показало відсутність спороцидних властивостей у цього препарату. При його концентрації активної речовини 2355 мг/л спори гинули всього на 0,7 lg при 60 хв контакту.

Септодор задовільно (на 99,99999 %) інактивував клітини *S. aureus* при концентрації 25 мг/л. Що стосу-

ється *E. coli*, то щодо неї септодор виявився менш активним. Інактивацію на рівні 6,5 lg за 15 хв вдалося досягти лише при його концентрації 185 мг/л. Було вста-

новлено, що септодор також не мав спороцидних властивостей – спори гинули на 0,5 порядку лише при експозиції 60 хв і концентрації 2355 мг/л.

Таблиця 1. Бактерицидна дія гіаміну 2389, деконексу та септодору на планктонні бактеріальні клітини при експозиції 15 хв при 20 °С

Дезінфектанти	Концентрація активної речовини, мг/л	Виживання культур, lg (N _i / N ₀)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Гіамін 2389	10	-2	-1,3
	20	-4,7	-2
	30	-5,3	-4,5
	40	-5,18	-5
	75	-5,3	-5,5
Деконекс	10	-2	-0,1
	20	-4	-0,2
	30	-5	-0,3
	40	-5,7	-1
	50	-6,3	-4
	60	-6,8	-5,7
Септодор	25	-7	0
	185	-	-6,5

Позначення: "-" – дослідження не проводилися

Відмінність у бактерицидному ефекті КПАР та препаратів на їхній основі на грамнегативні та грампозитивні бактерії можна пояснити різним механізмом дії на клітинні стінки. За даними Шандала [5] при контакті КПАР з грамнегативною клітинною стінкою спочатку відбувається витіснення кальцію та магнію з ліпополісахаридів, утворення комплексу ліпополісахарид-КПАР, руйнування зв'язку ліпополісахаридів із фосфоліпідами. Це призводить до відшарування і дезінтеграції другої мембрани. Таке руйнування поверхневого шару оголює клітину й робить її досяжною для прямої дії дезінфектанту. У випадку грампозитивної клітинної стінки КПАР не зустрічає опору на своєму шляху, проходить крізь пептидоглікан у периплазму, розчиняється у ліпідних бішарах ЦПМ і руйнує клітину. Тому зрозуміло, що бактери-

цидний ефект по відношенню до грампозитивних бактерій може спостерігатися при нижчих концентраціях дезінфектанту, ніж до грамнегативних.

Для оцінки впливу дезінфектанту на мікроорганізми існує такий емпіричний показник як Ct [6]. Це добуток концентрації реагенту та часу експозиції, за яких відбувається загибель 99 % клітин, тобто 2 lg. Показник Ct виражається у мгхв/л і може використовуватися для оцінки ефективності дезінфектантів на один або різні організми; для виявлення впливу факторів довкілля на бактерицидну дію хімічних сполук; для визначення рівня резистентності мікроорганізмів до певного бактерициду. У табл. 2 наведено значення Ct для гіаміну 2389, деконексу та септодору.

Таблиця 2. Рівень показника концентрація-час (Ct, мгхв /л) при 99 % інактивації бактерій дезінфікуючими засобами на основі четвертинних амонійних сполук

Бактерії	Гіамін 2389			Септодор			Деконекс		
	C, мг/л	t, хв	Ct, мгхв /л	C, мг/л	t, хв	Ct, мгхв/л	C, мг/л	t, хв	Ct, мгхв /л
<i>S. aureus</i>	5,6	15	83,6	25	2,5	62,5	20	5	100
<i>E. coli</i>	15	15	225	185	2,5	462,5	58	7,5	435

Як видно з табл. 2, найкращі бактерицидні властивості демонструвала індивідуальна КПАР гіамін 2389: Ct для стафілокока становило 83,6, а для кишкової палички 225 мг·хв/л. У той же час, септодор активніше впливав на стафілокок – Ct становило 62,5 мг·хв/л. Резистентність кишкової палички до всіх реагентів була значно вищою, ніж стафілокока, але септодор діяв на неї найменш ефективно. Слід відмітити, що незважаючи на простоту розрахунку і легкість використання показника Ct для порівняння ефективності бактерицидів, значення Ct не завжди об'єктивно характеризує дезінфікуючу дію препаратів. Воно достовірне лише у випадках, коли крива виживання має лінійну будову. Якщо ж крива виживання з тих чи інших причин [6] має сигмоїдальну форму, показник Ct може занижувати дані про ефективність препарату, як у випадку деконексу.

Висновки. Таким чином, у результаті проведеної роботи було показано, що КПАР гіамін 2389 інактивує *S. aureus* та *E. coli* на 99,999 % при концентрації 40 мг/л за 15 хв. Деконекс для інактивації *S. aureus* на 99,99 % та *E. coli* на 99,9999 % може бути використаний у кон-

центраціях 20 і 60 мг/л (за активною речовиною) відповідно. Септодор для інактивації *S. aureus* на 99,99999 % та *E. coli* на 99,99999 % може бути використаний у концентраціях 25 і 185 мг/л (за активною речовиною) відповідно. Деконекс та септодор не мають спороцидної активності при концентрації 2355 мг/л за активною речовиною та експозиції 60 хв.

1. Виевский А.Н. Механизмы биологического влияния катионных поверхностно-активных веществ. – К., 1991. 2. Поверхностно-активные вещества. Справочник / Под ред. А.А. Абрамзона, Г.М.Гаевого. – Л., 1979. 3. Поталченко Н.Г., Свалук О.С., Иппашенко В.В. // Хим. и технолог. воды. – 1992. – Т. 14, № 12. – С. 935–940. 4. Таранова Л.А. // Вісн. АН УРСР. – 1987. – № 8. – С. 40–49. 5. Шандала М.Г. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2000. – № 2. – С. 4–7. 6. Block S.S. Disinfection, Sterilization and Preservation. – Philadelphia; London, 1991. 7. Yauld J.P. // Brit. J. Urol. – 1965. – 37, № 1. – Р. 7–12.

Надійшла до редколегії 14.10.05

УДК 502.1(477)

Л. Олійник, асп.

СУЧАСНИЙ СТАН І ОСНОВНІ ЗАВДАННЯ ОХОРОНИ ВИЩОЇ ВОДНОЇ ФЛОРИ Й РОСЛИННОСТІ ЛІВОБЕРЕЖНОГО ЛІСОСТЕПУ

Охарактеризовано сучасний стан охорони вищої водної флори й рослинності Лівобережного Лісостепу України. Здійснено соціологічну категоризацію раритетних видів і угруповань та запропоновано першочергові заходи щодо їхнього збереження.

Present-day state and main tasks of the higher water flora and vegetation protection of the left-bank forest-steppe of Ukraine has been characterized, sozological categorization of spoil species and urgent measures of their protection have been proposed.

Вступ. Питання охорони вищої водної флори і рослинності регіону залишалися досі вивченими недостатньо. У більшості соціологічних робіт вони розглядаються в комплексі з видами й угрупованнями інших типів організації рослинності. З огляду на специфічні особливості організації вищої водної рослинності, це не сприяє ефективному виконанню завдань щодо їхньої охорони. Крім цього, дані праці є фрагментарними й не охоплюють багатьох територій Лівобережного Лісостепу, які відзначаються водоймами з раритетним фіторізноманіттям. Досі відсутнє узагальнене зведення стосовно сучасного стану рідкісних і зникаючих видів та їхніх угруповань, що стримує опрацювання заходів щодо їхньої охорони та збереження.

Метою роботи є аналіз сучасного стану охорони вищої водної флори й рослинності Лівобережного Лісостепу України та опрацювання заходів щодо їхньої охорони.

Об'єкт і методи досліджень. Об'єктом виконаної роботи є вища водна флора і рослинність Лівобережного Лісостепу. Дослідження проведені на території регіону протягом 2001–2004 рр. детально-маршрутним методом. Використано методи фітогеографії, флористики, фітоценології та фітосоціології. Фітосоціологічну оцінку раритетних видів і угруповань здійснено за прийнятою в Україні шкалою категоризації. Під час проведення роботи використовувалися різноманітні фондові матеріали обласних управлінь екології і природних ресурсів Мінприроди України в межах регіону дослідження.

Результати та їх обговорення. Вища водна флора регіону нараховує 111 видів судинних рослин і відзначається багатством та різноманітністю [5]. В її складі значну питому вагу становлять рідкісні та зникаючі види. Один вид, *Ceratophyllum tanaiticum*, занесено до Європейського Червоного списку й чотири – *Aldrovanda vesiculosa*, *Trapa natans*, *Nymphoides peltata*, *Trapa natans* – до Червоної книги України [6].

Проведеною згідно з Міжнародною шкалою рідкісності видів МСОП, категоризацією виявлено 25 видів раритетної фракції вищої водної флори Лівобережного Лісостепу, що складає 22,5 % від загальної кількості флори. До першої категорії (види, що знаходяться під загрозою зникнення, а також види, які зростають на межі ареалу, який унаслідок антропогенного впливу та історичних причин скорочується) відносять п'ять видів (*Aldrovanda vesiculosa*, *Trapa natans*, *Nymphoides peltata*, *Ceratophyllum tanaiticum*, *Sparganium minimum*). До другої – види, яким тепер ще не загрожує зникнення, але внаслідок зміни екологічних умов вони можуть зникнути, відповідно їх п'ять (*Potamogeton compressus*, *P. gramineus*, *P. obtusifolius*, *Ceratophyllum submersum*, *Sparganium neglectum*). До третьої – види, які нині не є рідкісними, але характеризуються скороченням площ місцезростань унаслідок антропогенного впливу. Таких

видів вісім – *Nymphaea alba*, *N. candida*, *Salvinia natans*, *Lemna gibba*, *Alisma gramineus*). До четвертої групи належать види, рідкісність яких не встановлена, але чисельність у регіоні достатньо обмежена – сім видів (*Cicuta virosa*, *Calla palustris*, *Hottonia palustris*, *Potamogeton acutifolius*, *P. praelongus*, *Sparganium erectum*, *Najas mayeri*).

Із перерахованих видів у існуючих об'єктах природно-заповідного фонду на достатніх для оптимального розвитку площах представлено лише 12.

Відзначається різноманіттям рослинність водойм регіону, зокрема виявлено шість рідкісних асоціацій. 13 синтаксонів занесено до "Червоного списку угруповань водних макрофітів України" [1] (*Aldrovandetum vesiculosa*, *Ceratophylletum submersi*, *C. tanaitici*, *Hydrochareto-Nymphoidetum peltatae*, *Nuphareto lutei* – *Nymphaetum albae*, *Nymphoidetum peltatae*, *Potameton natantis* – *Nymphaetum candidae*, *Potameton obtusifolii*, *Salvinio* – *spirdeletum*, *Sparganietum minimi*, *Trapetum natantis*, *Wolffietum arhizae*, *Wolffio* – *Lemnetum gibae*).

11 синтаксонів у ранзі формації (за домінантною класифікацією) занесено до "Зеленої книги України" (*Salvinietum natantis*, *Aldrovandeta vesiculosae*, *Trapeta natantis*, *Nymphoideta peltatae*, *Ceratophylleta tanaitici*, *Nymphaeta albae*, *N. candidae*, *Nuphareta lutei*, *Sparganietum minimi*, *Potametea obtusifolii*, *Ceratophylleta submersae*) [3].

Пряма охорона вищої водної флори і рослинності в регіоні здійснюється на територіях регіональних ландшафтних парків – Диканського та "Кременчуцькі плавні" (Полтавська обл.), "Печенізьке поле" (Харківська обл.), а також у багатьох заказниках державного й місцевого значення. Непряма охорона, як і в Україні в цілому, має здійснюватися відповідно до існуючого природоохоронного законодавства. Насамперед, це закони України "Про рослинний світ України" (1999) і "Про охорону навколишнього" (1991), а також Постанова Ради України "Про національну Програму екологічного оздоровлення басейну Дніпра та поліпшення якості питної води" (1997). Охорона вищої водної флори і рослинності має забезпечуватися також згідно з міжнародними угодами, ратифікованими Україною, зокрема "Конвенцією про охорону біологічного різноманіття" (Ріо-де-Жанейро, 1992) і "Конвенцією про водноболотні угіддя, що мають міжнародне значення, головним чином як середовище існування водоплавних птахів" (Рамсар, 1971). Незважаючи на названі та інші законодавчі та нормативно-правові документи стан охорони вищої водної флори й рослинності в регіоні, як і в Україні в цілому залишається незадовільним.

Провідними факторами впливу, які зумовлюють скорочення місцезростань, зокрема раритетних видів, а також зміну угруповань у регіоні є зміна гідрорежиму водойм, їхнє антропогенне евтрофування та забруднення елементами і сполуками, які надходять із стічни-

ми водами. Не менший непрямий вплив здійснюється внаслідок руйнування прибережних смуг.

Установлено, що умовно непорушені угруповання вищої водної рослинності існують лише на територіях названих природоохоронних об'єктів. Середньопорушені (друга-третья стадія антропогенної дегресії) характерні для більшості водойм середніх річок (Полтавська, Сумська, Харківська, Черкаська обл.), а також мілководді Кременчуцького (Черкаська, Полтавська обл.) і Канівського (Черкаська, Київська обл.). Провідними негативними факторами антропогенного впливу, крім названих, виступають техногенне руйнування прибережних смуг, забруднення їх побутовими відходами тривалого розкладання, спорудження гребель і зарегулювання стоку, а також рекреаційний вплив. Надмірно порушені угруповання вищої водної рослинності (третья-четверта стадія антропогенної дегресії) характерні для водойм середніх річок, розташованих біля населених пунктів, а також малих річок регіону [4]. Провідними негативними факторами антропогенного впливу виступають забруднення стоку та знищення екотопів унаслідок надмірної експлуатації прибережних територій.

Охорона вищої водної флори й рослинності в регіоні може бути забезпечена достатньою мірою лише за умови створення національної екологічної мережі України. При проектуванні, зокрема регіональної мережі, мають бути враховані особливості вищої водної рослинності. Це стосується насамперед динамічності водних екотопів і угруповань. У зв'язку з цим до складу територій елементів екомережі, як зазначає Д.В.Дубина [2], мають бути включені ділянки розвитку, на яких у перспективі будуть формуватися угруповання вищої водної рослинності. Ефективна охорона їх може бути забезпечена лише за умови широкого формування інтерактивних елементів екомережі, тобто не з'єднаних між собою відгалужень, які охоплюють функціонуючі поза межами екомережі водойми.

Не менш важливими є диференційований підхід до формування буферних зон і зон потенційної ренатуралізації, в яких у кожному конкретному випадку має бути враховане забезпечення захисту водойм від промислового, сільськогосподарського і побутового забруднення.

Висновки. Установлено, що охорона вищої водної флори й рослинності в об'єктах природно-заповідного фонду Лівобережного Лісостепу не забезпечує збереження всього її багатства і різноманіття в регіоні. У зв'язку з цим пропонується система заходів спрямованих на мінімізацію локального і регіонального впливу. Вона включає систему дій, спрямованих на відновлення і збереження фіторізноманіття водойм і підтримання його на належному рівні функціонування. Пропонується розширення територій існуючих об'єктів природно-заповідного фонду і створення нових, в яких основними об'єктами охорони виступала б вища водна флора й рослинність. Обґрунтована необхідність перегляду функціонального зонування Диканського регіонального ландшафтного парку з метою більш повного представлення в охоронному режимі досліджуваних об'єктів. Відповідні матеріали підготовлено для передачі до обласних управлінь екології і природних ресурсів Мінприроди України в регіоні дослідження. Крім цього, обґрунтована необхідність реставрації місцезростань рідкісних і зникаючих видів, а також переселення їх на території зі сприятливими умовами.

1. Дубина Д.В., Гейни С., Гроудова З. и др. Макрофиты – индикаторы изменений природной среды. – К., 1987. – С. 97–99. 2. Дубина Д.В. Стратегія збереження та невиснажливого використання біорізноманіття водно-болотних угідь України // Збереження і невиснажливе використання біорізноманіття України: стан та перспективи. – К., 2003. – С. 153–162. 3. Зелёная книга Украинской ССР / Под ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко. – К., 1987. 4. Олійник Л.В. Проблема збереження фіторізноманіття водойм Лівобережного Лісостепу // Матеріали міжнарод. наук. конф. "Проблеми збереження, відновлення та збагачення біорізноманітності в умовах антропогеннозміненого середовища", Кривий Ріг, 16–19 трав. 2005 р. – Дніпропетровськ, 2005. – С. 125–127. 5. Олійник Л.В. Фіторізноманіття малих річок Лівобережного Лісостепу як показник їх стану // Матеріали XI з'їзду Українського ботанічного товариства. – Харків, 2001. – С. 273–274. 6. Червона книга України. Рослинний світ. – К., 1996.

Надійшла до редколегії 28.09.05

УДК 57.013

Н. Толчій, канд. біол. наук, С. Демидов, д-р біол. наук,
С. Шкляр, інж. і кат., К. Скрипка, провід. інж.

НЕГІСТОНОВІ БІЛКИ ХРОМАТИНУ

Охарактеризовано основні властивості негістонових білків, зокрема HMG-білки, та їхню участь у різноманітних біологічних процесах.

In given clause the characterized basic properties nonhistone DNA-binding proteins, in particular HMG-proteins and their participation in various biological processes.

Одним з важливих і актуальних завдань біології є вивчення структурно-функціональної організації хроматину – молекулярної основи генетичного апарату еукаріотів. Хроматин еукаріотів є складно організованим нуклеопротеїдним комплексом. Ядерні білки – гістони і негістонові білки (НГБ) – значною мірою визначають як структуру хроматину, так і механізми його функціонування.

Зацікавленість ядерними білками зросла у зв'язку з вивченням механізму регуляції на рівні геному. Основні зусилля направлені на поділ та ідентифікацію білків. Нині найбільш вивченими рівнями організації хромати-

ну є нуклеосомний і наднуклеосомний рівні. У стабілізації цих рівнів основну роль відіграють ядерні білки: гістони та негістонові білки.

Негістонові білки зустрічаються в усіх ядерних структурах – в ядерному соку, у скелетних структурах, в ядерній оболонці та в хроматині. Їхня молекулярна маса коливається від 5000 до 200000, ізоелектрична точка – від рН 3 до 10 [3].

Негістонові білки хроматину збагачені кислими амінокислотними залишками. Відношення кислих до основних амінокислот у складі негістонових білків становить

© Н. Толчій, С. Демидов, С. Шкляр, К. Скрипка, 2006

1,2–1,9. Ці білки утримують значну кількість аспарагінової та глутамінової кислот. На відміну від гістонів, негістонові білки утримують триптофан. Первинна структура деяких негістонових білків характеризується нерівномірним розміщенням заряджених амінокислот [2]. Ці білки хроматину синтезуються в цитоплазмі на протязі всього клітинного циклу й пригнічування реплікації ДНК не впливає на їх синтез.

Негістонові білки хроматину складають приблизно половину від загальної кількості хромосомних білків. За сучасними даними їх умовно підрозділяють на три підгрупи: ферменти, структурні та регуляторні білки [4].

Ферменти, що є негістоновими білками хроматину, здійснюють реплікацію, репарацію, релаксацію ДНК, синтез і процесінг РНК, постсинтетичні модифікації білків, процесінг і деградацію білків хроматину. До цієї групи належать внутрішньоядерні ферменти та білкові фактори, які необхідні для роботи генетичного апарату клітини. До таких ферментів належать кінази, протеази, ацетілази, деацетілази, ДНК-топоізомерази, ДНК-полімераза, РНК-полімераза, нуклеаза та ін.

Структурні негістонові білки відіграють важливу роль у структурно-функціональних перебудовах хроматину, пов'язаних з організацією та активацією транскрипції, процесами реплікації.

Після відкриття негістонових білків були спроби класифікувати їх за декількома критеріями з урахуванням:

- 1) методів екстракції:
 - а) водорозчинні;
 - б) кислоторозчинні;
 - в) кислотонерозчинні;
- 2) ступеня дисоціації при різних іонних силах:
 - а) які дисоціюють у 0,35 моль/л NaCl (HMG-білки);
 - б) які дисоціюють в інтервалі 0,35–2 моль/л NaCl;

в) які дисоціюють у 3 моль/л NaCl – 5 моль/л сечовини (міцно зв'язані);

- 3) функції або можливої функції:
 - а) регулятори експресії, реплікації;
 - б) які взаємодіють з гормонорецепторним комплексом;
 - в) структурні, котрі беруть участь в організації певних ділянок хроматину;
 - г) ферменти;

4) характеру взаємодії з головними компонентами хроматину:

- а) які взаємодіють тільки з ДНК;
- б) які взаємодіють тільки з білками;
- в) котрі взаємодіють і з ДНК, і з білками. Проте один і той самий білок може потрапити у декілька або навіть у всі групи (зокрема, білок HMG-1).

Е. Джонс у 1960-х рр. виділив новий клас ядерних білків, названий ним "групою білків з високою рухливістю", або HMG-білки [1, с. 24–30]. Ця група білків була виявлена ним як домішка, котра виявлялася під час одержання гістонів. Звідси їхня друга назва – "білки Джонса". Назва HMG залежала від високої рухливості цих білків під час електрофорезу в гелі. Після первинного описання про них не згадували майже 10 років. Але починаючи з 1973 р. інтерес до цих білків істотно зріс, що було пов'язано в першу чергу з достатньо легким процесом їхньої екстракції та значною кількістю їх у хроматині відносно інших негістонових білків.

Фракція HMG-білків розподіляється на ряд індивідуальних компонентів. Серед них найвагоміші й добре охарактеризовані HMG-1, 2 та HMG-14, 17. Сумарний вміст HMG-білків у ядрах клітин у ~10 разів менший, ніж гістонів. Ці білки розділяють на три основні підкласи: HMG 14/17, HMG 1/2 та HMG I/Y. За новою класифікацією відповідно HMG-N, HMG-B та HMG-A (рис. 1).

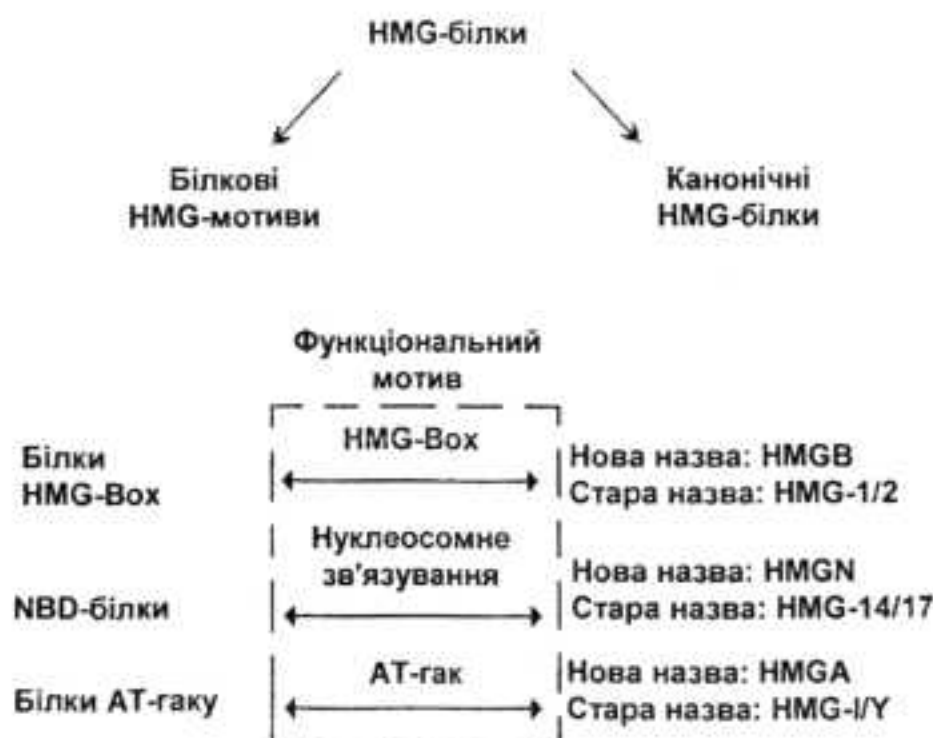


Рис. 1. Хромосомні білки HMG

Уперше білки групи HMG були виділені з хроматину клітин тимусу теляти з використанням 0,35 моль/л NaCl [1]. У випадках, коли білки цієї групи не щільно упаковані та їх не дуже багато, їх можна дуже легко екстрагувати іншими сольовими розчинами [5].

HMG-білки виявлені в усіх досліджуваних видах еукаріотів (за виключенням комах) і в усіх їхніх тканинах. Висока еволюційна стабільність їхніх властивостей свідчить про важливу роль цих білків для функціонування клітин.

Білки HMG розчиняються у 2–5 %-й перхлорній кислоті; їхня молекулярна маса не перевищує 30 кДа.

Ці білки рухаються під час електрофорезу в різних системах швидше за гістон H1, виявляючи наступні молекулярні маси: HMG-1 – 26500; HMG-2 – 26000; HMG-14 – 10000, HMG-17 – 9247.

При цьому HMG-14 рухається трохи повільніше за гістон H3. У суміші оцтової кислоти й сечовини, коли білки мають максимальний позитивний заряд, вони також високорухомі: HMG-1 та HMG-2 рухаються трохи повільніше гістону H1, що напевно пов'язано не тільки з їхнім меншим зарядом, але й суттєво більшою молекулярною масою, а HMG-14 та HMG-17 набагато випереджають

гістон H4 [7; 9]. Така висока рухомість під час розподілу за зарядом визначається насамперед їхнім амінокислотним складом. Уже в цій важливій для HMG-білків характеристиці виявились не тільки загальні властивості, але й деякі відмінності, припускаючи попарну схожість окремих компонент цієї групи між собою, а саме HMG-1 і HMG-2; HMG-14 і HMG-17.

Спільним для всієї групи білків HMG є високий вміст заряджених амінокислот (55 %), з них 25 % – позитивно заряджені амінокислоти. Також ці білки характеризуються дуже високим вмістом у порівнянні з іншими амінокислотними залишками (19–20 мол. %), нагадуючи цією властивістю гістон H1 [6; 9]. До підгрупи структурних білків крім негістонових білків групи HMG (HMG-1, HMG-2, HMG-14, HMG-17) належить білок A24 (H2A, ковалентно зв'язаний з убіквітином), скоротливі білки (актин, тропоміозин, тубулін), скелетні боки хромосом (білки скефоду) та деякі інші. Ці білки присутні в усіх тканинах організму, до того ж кількість їх у ядрах клітин перевищує вміст інших негістонових білків, які є специфічними для тканин. Вміст HMG-білків становить приблизно 1/10 від вмісту гістонів. В ядрах різних типів клітин він може варіювати. Аналіз розміщення HMG-білків у складі хроматину дозволив установити факт присутності HMG-14 і 17 у складі нуклеосом. Стосовно HMG-1 і 2 існують суперечливі думки.

Відома первинна структура всіх HMG-білків, яка дозволила виявити високий ступінь попарної гомології цих структур. Установлено, що у структурах HMG-1 і HMG-2 є протяжні ділянки, ідентичні одна одній. Під час вивчення первинної структури виявлено нерегулярний розподіл заряджених амінокислот в усіх чотирьох HMG-білках: позитивно заряджені амінокислоти розташовані в основному на N-кінцевій частині молекули, а кислі – на C-кінцевій [3].

HMG вважаються убіквітиновими ядерними білками, які регулюють і сприяють реалізації процесів транскрипції, реплікації, рекомбінації та репарації. Їхня діяльність пов'язана з активністю різних регуляторних молекул, у тому числі рецепторів гормонів, p53, гомеотичного білка HOXD9, а також деякими транскрипційними факторами. Функціональні мотиви убіквітинових HMG-білків широко розповсюджені й пов'язані з ДНК-зв'язувальними доменами численних регуляторних білків.

Білки HMG можуть відігравати значну роль у порушенні життєдіяльності людини. Порушення і перебудови кодування генів деяких білків цієї родини асоціюються з етіологією різноманітних доброякісних пухлин, зокрема міом матки, ендометріальних поліпів, ліпом. HMG-1 і HMG-2 білки беруть активну участь у механізмах впливу різноманітних антиканцерогенних препаратів. Антитіла до білків HMG були знайдені у пацієнтів, що страждали на аутоімунні захворювання [8, с. 45–55; 12]. Дослідження структури і функції цих білків дозволить краще зрозуміти молекулярні механізми етіології основних захворювань людини.

Білки HMG 14/17 (HMG-N). HMG 14/17 являють собою невеликі білки з молекулярною масою 10–12 кДа. Характерним для HMG-17 є відсутність у складі метіоніну, цистеїну, ароматичних амінокислотних залишків і велика кількість спіральдестабілізуючих залишків проліну (Pro)₁₁, гліцину (Gly)₉, серину (Ser)₂, що складають приблизно 25 % загальної кількості амінокислот. Білок HMG-14 мало відрізняється амінокислотним складом від HMG-17 і має також високий вміст спіральдестабілізуючих залишків до 23 %. Поліпептидні ланцюги білків HMG 14/17 несуть великий локальний електричний заряд при фізіологічних значеннях pH. N-кінцеві частини їхніх поліпептидних ланцюгів мають основні властивос-

ті, тоді як C-кінцеві – кислі. Корові частки нуклеосом містять на своїй поверхні дві молекули HMG 14/17, котрі з'єднують між собою ланцюги ДНК двох сусідніх витків. Білки HMG 14/17 добре зв'язуються з ДНК у розчинах з низькою іонною силою. При співвідношенні білок/ДНК $\leq 0,5$ нуклеопротеїновий комплекс не агрегує і знаходиться в розчині. При збільшенні співвідношення HMG-17/ДНК до 1,0 комплекс випадає в осад, що вказує на іонну природу взаємодії білка з молекулою ДНК, але не має властивості змінювати суперспіралізацію ДНК при взаємодії.

HMG-білки цієї групи можуть заміщувати гістон H1 в активно транскрибуючих генах. *In vivo* ~10 % корових часток нуклеосом можуть містити білки.

Усі ці дані, одержані незалежно, дозволили припустити, що HMG-14 і 17 якимось чином зв'язані з активацією генів. Механізм активації був повністю не зрозумілим. HMG-14 і 17 не могли бути первинними факторами, що вмикають ген, оскільки вони не мають специфічності. Можливо припустити, що вони беруть участь у підтриманні "відкритої конформації" активного хроматину.

Білки групи HMG 1/2 (HMG-B) є одними з переважаючих ядерних білків з молекулярною масою 25–30 кДа. Характеризуються вони незвичайним амінокислотним складом і нерівномірним розподілом заряджених амінокислот. Вміщують у своєму складі 25 % основних і 30 % кислих залишків амінокислот. Аналіз конформації негістонових білків HMG-1 і 2 виявив, що вони є глобулярними білками, які містять до 50 % α -спіральних ділянок і не мають ділянок з β -конформацією. За цим параметром HMG-17 і HMG-14 відрізняються тому, що вони не мають у розчині впорядкованої конформації.

Ці білки специфічно зв'язуються з одноланцюговими ділянками ДНК, а також ділянками ДНК, які утворюють хрестоподібні структури в місцях, котрі містять паліндромні послідовності. Це вказує на їхню можливу участь у процесах рекомбінації, репарації і (або) реплікації.

Показано, що білки HMG 1/2 сприяють збірці нуклеосом *in vitro*, однак фізіологічне значення цього факту залишається незрозумілим, оскільки багато від'ємно заряджених молекул в експериментальних умовах також прискорюють утворення нуклеосом.

При вивченні функцій HMG-1/2 білків стало відомо, що у складі хроматину вони зв'язуються з ДНК і дисоціюють при концентрації солі вище 0,35 моль/л NaCl і pH 7. У модельних дослідженнях у стабілізації комплексу беруть участь, як правило, позитивно заряджені залишки лізину (N-кінцева ділянка молекули білка). C-кінцева ділянка залишається практично вільною в розчині, можливо, вона відповідає за білок-білкові взаємодії з гістонами нуклеосом у хроматині.

Деякі дані вказують на можливу участь HMG-1 і 2 у процесах реплікації у тканинах з різним мітотичним індексом [10]. Було встановлено, що в тканині, котра активно ділиться, кількість HMG-2 збільшується. Сюди ж відносять дані з дослідження вмісту цих білків на різних етапах еволюції тимусу теляти. Показано, що згідно з еволюцією вміст HMG-2 зменшується аж до його зникнення, а кількість HMG-1 збільшується [5].

Функціональні мотиви HMG-білків. Протягом вивчення кінетики деградації білків HMG-1 і HMG-2 трипсином виявилось, що вона залежить від іонної сили середовища. За допомогою електрофоретичного аналізу стійких до трипсину фрагментів молекул білків встановлено залежність від концентрації солі та виявлено в розчині 0,5 моль/л NaCl два стійкі до дії трипсину фрагменти у вигляді двох різних поліпептидних ділянок молекули. Вони отримали назву доменів Vox-1 та Vox-2. Ці домени розташовані в третинній структурі білків HMG-1

і HMG-2 між 12–170 амінокислотами. Домени Vox-1 і Vox-2 утворюють L-форму й поділяються на два субдомени (мажорне і мінорне крило). Мінорне крило відповідає за специфічний зв'язок з визначеними послідовностями ДНК. Vox-1 (білок HMG-1) складається з одного триптофану та трьох тирозинів. Гомологічний йому Vox-2 має один залишок триптофану в тому ж положенні, що й Vox-1 та чотири тирозину. У мінорному крилі Vox-1 і Vox-2 міститься однакова кількість залишків тирозину – три. У Vox-2 чотири тирозини упаковані в мажорному крилі. Порівнюючи структуру Vox-1 і Vox-2, можна припустити, що залишки тирозину саме в мінорному крилі можуть експонуватись у розчинник. Ароматичні кислоти мажорного крила знаходяться всередині структури субдомену Vox-1 і Vox-2 [12, с. 57–62].

HMG-доменні білки можуть бути поділеними на 2 класи, які відрізняються за числом HMG-доменів і за специфічністю розпізнавання ДНК. До першого класу належать негістонові білки хроматину HMG-1 і 2 та UBF (UBF1 і UBF2), один з базальних транскрипційних факторів РНК-полімерази I. Ці білки, що присутні в усіх клітинних типах, не володіють селективністю щодо послідовностей ДНК і можуть містити кілька HMG-доменів (Boxes) [4]. Домени (мотиви або бокси) цих білків гомологічні, проте відрізняються за кількістю. Білок HMG-1 рослин, наприклад, має 1 бокс, а UBF1 ссавців – 5 боксів.

До другого класу відносять білки з одним HMG-доменом, який з високою специфічністю розпізнає послідовності ДНК, що збагачені АТ-парами і приєднуються до них [11]. Вони, як правило, зустрічаються тільки в обмеженого числа клітинних типів (наприклад, фактор визначення статі SPY/SOX/TCF). Усі відомі доменні білки здатні розпізнавати нерегулярні структури ДНК і зв'язуватись з ними. Вони взаємодіють з малою бороною подвійної спіралі ДНК.

Установлено, що ізолювані HMG-домени зв'язуються з ДНК з тією ж спорідненістю, що й цілий білок. Структура ізолюваних HMG-доменів була вивчена двома групами дослідників за допомогою двовимірної ЯМР-спектроскопії (спектроскопія на базі ядерно-магнітного резонансу). У HMG-домени 2 з білків HMG-1 було локалізовано три α -спірально ділянки, які утворюють L-подібну згортку. Ці спіралі містять 75 % амінокислотних залишків усього домену. При дослідженні контактного білка HMG-1 та ізолюваних HMG-доменів за допомогою оптичних методів – кругового дихроїзму, ультрафіолету та флуоресцентно виявлено, що HMG-домени складаються з двох субдоменів, кожний з яких денатурує як окрема і незалежна кооперативна одиниця.

HMGА (стара назва – HMG-I/Y/C фактори транскрипції білків). Допоміжні фактори для інших факторів транскрипції, таких як NF- κ B або ATF-2, полегшують включення їх у транскрипційний комплекс. Родина білків HMGА називається "АТ-гак" (AT-hook).

Білки HMGА переважно взаємодіють з АТ-багатими ділянками ДНК, що є характерним і для гістона H1. Передбачається, що ці білки конкурують з гістоном H1 *in vivo* за промотори і в ділянці початку реплікації ДНК.

Важливою властивістю HMG-білків є їхня здатність піддаватись модифікаціям. Для них характерні всі відомі типи модифікацій. Однак виявлені деякі відмінності в середині цієї групи. Так, HMG-1 і HMG-2 фосфорилуються мало і містять 1–3 % неорганічного фосфору, а білки HMG-14 і HMG-17 мають високу здатність до фосфорилування. Існує припущення, що фосфорилування відіграє певну роль у деактивації транскрипції. Подібну роль відводять АДФ-рибозилуванню. Крім

того, є думка, що фосфорилування посідає певне місце в репаративних процесах [14]. При вивченні модифікації HMG-1,2 (і в меншій мірі HMG-14, 17) додаванням АДФ-рибози встановлено, що глюкокортикоїдна індукція вірусу пухлин молочних залоз мишей у клітинах культури тканин корелювала зі зниженням АДФ-рибози у HMG-14,17, тоді як зв'язування АДФ-рибози з HMG-1, 2 не змінювалося [13].

Ацетилювання хромосомних білків може мати в цілому значний вплив на структуру й активність генів. Можуть бути ацетилювані всі білки групи HMG, хоча ступінь ацетилювання у них нижчий за гістони. Більша частка ацетилюваних залишків розміщена в N-кінці білків. HMG-14, 17 інгібують дію гістонових деацетилаз. Інгибування залежить від типу HMG і джерела ферменту. Здатність HMG інгібувати деацетилювання гістонів може пояснити переважний зв'язок HMG з ацетилюваними нуклеосомами.

HMG також можуть бути модифіковані додаванням різних кількостей карбогідрату. Глікозилювання HMG могло б відіграти роль під час локалізації білків у ядрі. Глікозилювані білки HMG-14, 17 переважно зв'язуються з ядерним матриксом клітин ссавців [2]. Видалення бічного ланцюга з глікозилів призводить до розриву зв'язків HMG з ядерним матриксом.

При дослідженні впливу Ca^{2+} на динаміку зв'язування негістонового білка хроматину HMG-1 з ДНК встановлено різний ступінь впливу іонів Ca^{2+} на комплекси повнорозмірного і вкороченого білка, ефективність залежала від іонної сили розчину. На протязі підвищення концентрації білка в системі спостерігалась досить різка Ca^{2+} -залежна агрегація комплексів HMG-1/ДНК.

Функціональне значення цих модифікацій поки незрозуміле, модифікаційна мінливість може значною мірою пояснювати гетерогенність фракцій HMG-білків.

На завершення слід зазначити, що ціла низка питань про властивості та функціональне значення HMG-білків залишаються невирішеними. У цілому ж вивчення негістонових білків є одним з найактуальніших завдань, безпосередньо зв'язаних з регуляцією генетичної експресії. Участь цих компонентів хроматину в регуляторних процесах, незважаючи на відсутність прямих даних, залишається вірогідною.

На відміну від гістонів, синтез негістонових білків не пов'язаний з реплікацією ДНК і відбувається протягом усього клітинного циклу [15].

Негістонові білки беруть активну участь у регуляції транскрипції. Деякі з них ідентифіковані й характеризуються частковою асоціацією з "активними" нуклеосомами, ядерним матриксом і з гетерогенними ядерними рибонуклеопротейновими частками.

1. Гинейтис А. Белки хроматина. – Вильнюс, 1988.
2. Караваев А.А., Афанасьев Б.Н. // Молекулярная биология. – 1983. – Т. 17, вып. 2. – С. 213–233.
3. Bustin M. // Mol. Cell. Biol. – 1999. – Vol. 19. – P. 5237–5246.
4. Bharath M., Chandra N., Rao M. // Proteins. – 2002. – Vol. 49, № 1. – P. 71–81.
5. Bustin M., Reeves R. // Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. – 1996. – Vol. 54. – P. 35–100.
6. Eink L., Bustin M. // Exp. Cell. Res. – 1985. – Vol. 56. – P. 295–310.
7. Elton T.S., Reeves R. // Analytical Biochemistry. – 1985. – Vol. 144. – P. 403–416.
8. Goodwin G., Methew C. HMG chromosomal proteins Cell. – New York, 1982.
9. Komberg R. // Ann. Rev. Biochem. – 1977. – Vol. 46. – P. 931–954.
10. Peters R., King Ch., Ukiyama E. et al. // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34. – P. 4569–4576.
11. Read Ch., Cary P., Preston N. et al. // The EMBO J. 1994. – Vol. 13, № 23. – P. 5639–5646.
12. Takashi Oh. DNA conformation and transcription. – New York, 2005.
13. Tang Y., Nilsson L // Proteins. – 1999. – Vol. 35, № 1. – P. 101–113.
14. Tyrrel D., Reeck G.R. // Anal. Biochem. – 1982. – Vol. 119. – P. 433–439.
15. Walker J.M., Goodwin G.H., Johns E.W. // FEBS Lettens. – 1979. – Vol. 100. – P. 394–398.

Надійшла до редколегії 18.10.05

УДК 616.33 + 616.45

Н. Євтушенко, канд. біол. наук,
В. Ковальова, канд. біол. наук, Л. Кузьменко, асп.

АКТИВНІСТЬ АМІНОТРАНСФЕРАЗ ЗА ДІЇ РІЗНИХ ЧИННИКІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ВИРАЗЦІ

Установлено, що за умов розвитку експериментальної виразки у тварин спостерігається зменшення активності амінонотрансфераз у слизовій оболонці шлунка. Уведення "Аммівіту" та сквалену призводить до певної корекції змін активності досліджуваних ферментів.

It was shown that the stomach's aminotransferases activities are decrease under conditions of stomach ulcer development in animals. Administration of the composite of "Ammivit" and scvalen are resulted in certain amendment of alterations the investigated enzyme's activities.

Вступ. Суттєве значення в розумінні біохімічних процесів, що проходять у нормальних тканинах і за патологічних змін, належить амінонотрансферазам. Ці ферменти відіграють важливу роль у процесі синтезу й розпаду амінокислот, посідають важливе місце в обміні речовин. Вміст аланінамінонотрансферази (АЛТ) та аспартатамінонотрансферази (АСТ) в організмі та їхня каталітична активність найвищі порівняно з усіма іншими амінонотрансферазами. У деяких випадках [1] зберігається їхня здатність синтезувати аміді дикарбонових амінокислот шляхом переамінування, що узгоджується з високою активністю білоксинтезуючої системи. Останнім часом предметом численних досліджень є з'ясування впливу різних біологічно активних речовин на репаративні та цитопротективні можливості клітин організму. Вважається [3], що при підвищенні активності зазначених ензимів варто припинити введення лікарських препаратів або застосовувати менші дози. Пригнічення регенерації клітин слизової оболонки і, як результат, зменшення продукції шлункового слизу, посилення процесу деструкції білків при утворенні виразки шлунка роблять актуальним дослідження активності амінонотрансфераз.

Тому метою нашої роботи було визначити активність АЛТ і АСТ у клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментальної моделі виразки при дії "Аммівіту" та сквалену.

Об'єкт і методи досліджень. Досліди проводились на нелінійних щурах масою 180–230 г. Експериментальну

виразку шлунка викликали пероральним введенням 1 мл етанолу в концентрації 80 %. Дослід проводили в контрольній групі у тварин з експериментальною виразкою, а також при введенні препарату "Аммівіту" з третьої по сьому добу та сквалену [6] – з п'ятої по сьому добу в комплексі з "Аммівітом". Слизову оболонку шлунка піддавали гомогенізації в 0,01 моль/л трис-НСІ буфері (pH 7,4) у співвідношенні 1:10. Білок визначали за методом Лоурі [4]. Активність аланін- та аспартатамінонотрансфераз визначали на третю, п'яту та сьому добу процесу утворення виразки у шлунку за методом Reitman S., Frankel S. [7]. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій Стюдента.

Результати та їх обговорення. Нами було з'ясовано, що в перші дні утворення виразки намічалася тенденція до зниження активності АСТ та АЛТ (рис. 1 ($M \pm m$; $n = 6$)), а через 3 доби активність АЛТ вірогідно зменшувалась на 15 %. Установлений факт можна пояснити як зниженням кількості аланіну в досліджуваних об'єктах, так і тим, що при виразковій хворобі з підвищеною функцією утворення пепсину головних клітин збільшується потреба в аланіні та гліцині, які входять до структури пепсиногену. Крім того, у слизовій оболонці шлунка при виразковій хворобі зростає кількість і активність фібробластів, з'являється багато фібрилярних і колагено-подібних структур, в яких відмічається високий вміст аланіну [5].

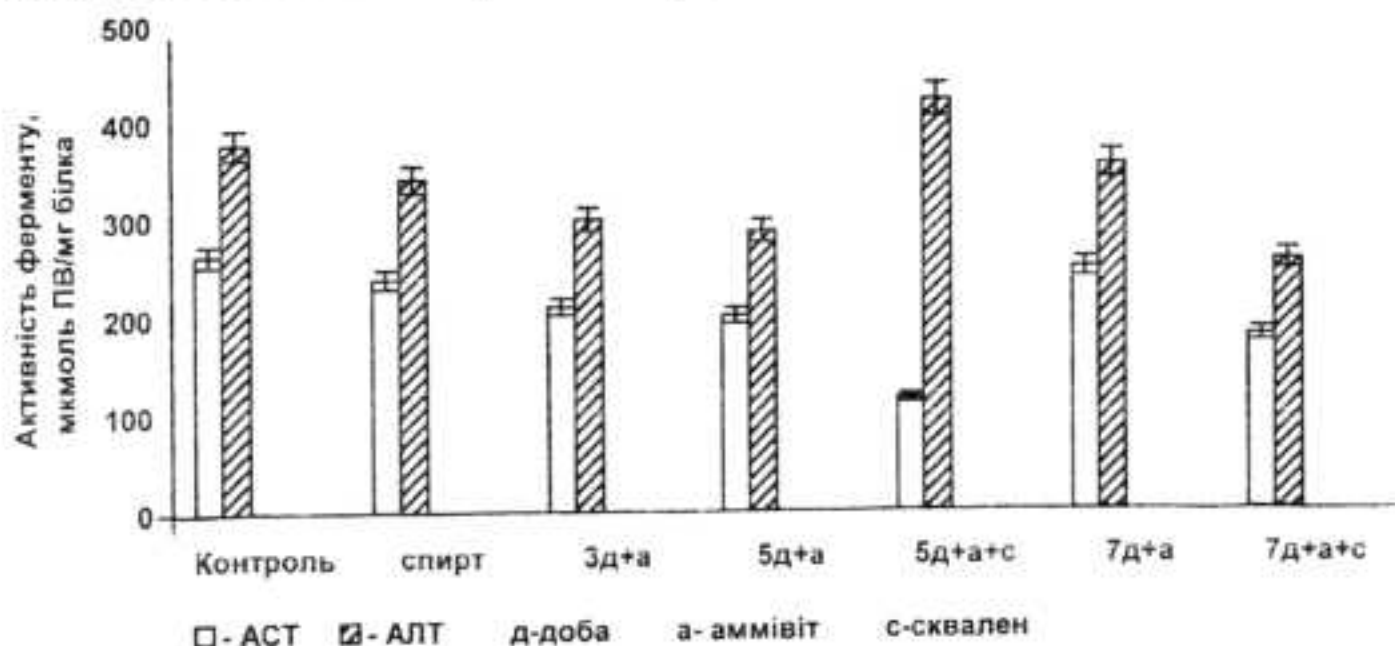


Рис. 1. Вплив аммівіту та сквалену на активність аланін- і аспартатамінонотрансферази

У зв'язку зі зниженням рівня активності АЛТ і АСТ та дисбалансом певних амінокислот [2] у слизовій оболонці шлунка на стадії загострення виразкової хвороби, а також для можливої корекції згаданих вище процесів, був застосований біологічно-активний препарат "Аммівіт", до складу якого входить комплекс амінокислот і вітамінів. Показано, що протягом 7 днів введення цього

препарату позитивно впливає на регенерацію тканин, про що може свідчити підвищення активності ферментів до контрольного рівня.

Досліджувався вплив комплексного введення "Аммівіту" та сквалену на вищезазначені показники. Сквален – це біологічно активна речовина, яка сприяє підвищенню резистентності організму, підсилює імун-

ну систему, впливає на процеси загоєння будь-яких пошкоджень тканин внутрішніх органів і нормалізує холестериновий обмін [6].

Цікавим є той факт, що зразу після введення сквалени (п'ята доба) активність АСТ підвищується у 12 разів. У той же час, активність АЛТ зменшується в 2,5 рази. На сьому добу при комплексному введенні "Аммівіту" зі скваленом показники активності обох ферментів досягають 70 % рівня контролю. Отже, у тварин залишається здатність синтезувати амінокислоти.

На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що за умов експериментальної виразки активність амінотрансфераз слизової оболонки шлунка знижується і спостерігається вплив дії аммівіту та сквалени на зазначені ферменти.

Висновки. При спиртовій експериментальній моделі виразки шлунка відбувається зменшення активності АЛТ і АСТ у слизовій оболонці шлунка щурів. Уведення

"Аммівіту" та сквалени призводить до певної корекції змін активності досліджуваних ферментів і сприяє мобілізації захисних реакцій організму. Використання цих препаратів у свою чергу може відкривати перспективи для діагностики та лікування виразки шлунка.

1. Березов Т. Обмен аминокислот нормальных тканей и злокачественных опухолей. – М., 1969. 2. Коротько Г.Г., Фаустов Л.А. Функциональные и морфологические аспекты язвенной болезни. – Краснодар, 2002. 3. Шустов Е., Ихалайнен А. // Гастроэнтерология. – 2004. – Вып. 1. 4. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A. et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 2. – P. 265–275. 5. Nagata, K., Nagata, Y., Sato, T. et al. // Microbiology. – 2003. – Vol. 149. – P. 2023–2030. 6. Ostapchenko L., Kovalova V., Seleznova L. Scvalen influence on the lipids peroxidation processes in the way of aspirin stomach ulcer // Abstract book of International conference Neuro-humoral and cellular regulatory mechanisms of digestion processes. October 1–3, 2003. Ukraine. – Lviv, 2003. – P. 30–31. 7. Reitman S., Frankel S. // Amer. J. Clin. Pathol. – 1957. – Vol. 28. – P. 56–59.

Надійшла до редколегії 21.09.05

УДК 574.632+597-12

М. Вудмаска, канд. біол. наук, В. Найдьонов, канд. біол. наук,
О. Ногарев, асп., Л. Буцацький, д-р біол. наук

ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РЕТРОВІРУСУ ЛІМФОСАРКОМАТОЗУ ЩУК

Знайдено оптимальні умови постановки полімеразної ланцюгової реакції з метою діагностики вірусу лімфосаркоматозу щук. Отримані рекомбінантні плазмиди, які містять у своєму складі ділянки гена РНК-залежної ДНК-полімерази цього ретровірусу.

Found optimal conditions of raising of polimerase chain reaction with the purpose of diagnostics of pikes lymphosarcomatose virus. Got recombinant plasmids, which contain area of gene of RNA-dependent DNA-polymerase of this retrovirus.

Лімфосаркоматоз щук – неопластичне захворювання, що викликає значну загибель статевозрілих риб. Уперше це захворювання було описане в Ірландії у щук *Esox lucius* у 1963 р. [6]. У континентальній Європі лімфосаркоматоз уперше описаний нами у щук, відловлених у Київському водосховищі в 2000 р. [1]. Подальші дослідження показали, що лімфосаркоматоз щук широко поширений також в Канівському [4], Кременчуцькому [3] і Каховському [2] водосховищах Дніпровського каскаду.

Ретровірус, асоційований з лімфосаркоматозом щук, здатний в експериментах передаватися молодим особинам [5], він і дотепер є маловивченим представником недавно утвореного роду вірусів *Epsilonretrovirus*.

У цій статті нами представлені результати роботи з підбору праймерів і постановки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з метою діагностики і вивчення біологічних властивостей цього ретровірусу.

Матеріали і методи

Очищення геномної ДНК. Сумарна геномна ДНК щуки (з видимими симптомами лімфосаркоматозу, а також здорової) була очищена з використанням набору "Genomic DNA Purification Kit" фірми Qiagen по методиці, запропонованій виробником.

Праймери для ПЛР. У першому варіанті дослідів підбір праймерів здійснювався на основі аналізу нуклеотидних послідовностей, які кодують цикліни ретровірусів риб, а саме вірусу епідермальної гіперплазії судака 1-го і 2-го типів. Вибрані праймери мали такі послідовності:

WEHV1f1 5'-ATGGARAARTAYCTNAAAYC-3'

WEHV1f2 5'-ACTGCATATGGARAARTAYCTNAAAYCCNCARGC-3'

WEHV1r 5'-CTACTCGAGRTCNGCRCANARATCNARDATYTT-3'

У другій серії дослідів послідовності праймерів для ПЛР були складені на підставі аналізу консервативних ділянок гена РНК-залежної ДНК-полімерази різних ретровірусів (включаючи, окрім згаданих, ВІЛ-1, ВІЛ-2, ретровірус змієголова, вірус лейкозу ВРХ, вірус саркоми Рауса, вірус дермальної саркоми судака). Перша пара праймерів фланкувала відносно консервативну ділянку *pol*-гена завдовжки близько 120 нуклеотидів, друга пара відповідала ділянкам послідовності в межах згаданого вище 120-нуклеотидного фрагмента і призначалася для другого раунду ПЛР з використанням як матриці продукту першого раунду.

ПЛР геномної ДНК щуки. У першому раунді ПЛР як матрицю використовували 1 мкг сумарної ДНК, виділеної

з уражених ділянок шкіри і м'язів хворої щуки, а також з аналогічних зразків тканин риби, яка не мала видимих ознак захворювання (передбачувано здорової).

Реакційна суміш для ПЛР містила в об'ємі 50 мкл:

20 ммоль/л тріс HCl, pH 8.5;

10 ммоль/л (NH₄)₂ SO₄;

2 ммоль/л MgCl₂;

100 мкг/мл бичачого сироваткового альбуміну;

0,1 %-й тритон X-100;

0,2 ммоль/л кожного з чотирьох дезоксинуклеозидтрифосфатів;

1 мкг ДНК-матриці;

1 ммоль/л кожного з праймерів F1 і R1;

2,5 одиниці активності Taq полімерази (Fermentas)

© М. Вудмаска, В. Найдьонов, О. Ногарев, Л. Буцацький, 2006

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуски 47-48

Редактор В. Філь

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"
Виконавець Г. Пластуненко

Автори опублікованих матеріалів несуть повну відповідальність за підбір, точність наведених фактів, цитат, економіко-статистичних даних, власних імен та інших відомостей. Редколегія залишає за собою право скорочувати та редагувати подані матеріали. Рукописи та дискети не повертаються.

Засновник та видавець – Київський національний університет імені Тараса Шевченка. Свідоцтво Міністерства інформації України про державну реєстрацію засобів масової інформації КІ № 251 від 31.10.97. Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", директор Г.Л. Новікова. Адреса ВПЦ: 01601, Київ, б-р Тараса Шевченка, 14, кімн. 43. (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28



Підписано до друку 22.12.06. Формат 60x84^{1/8}. Вид. № 11. Гарнітура Arial. Папір офсетний. Друк офсетний. Наклад 500. Ум. друк. арк. 10,69. Обл.-вид. арк. 20,0. Зам. № 26-3734.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43,
(38044) 239 32 22; (38044) 239 31 72; (38044) 239 31 58; факс (38044) 239 31 28
E-mail: vydav_polygraph@univ.kiev.ua
WWW: <http://vpc.univ.kiev.ua>

Наукова бібліотека
ім. М. Максимовича

КНУ

ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА



11830JB

45 - чит зал періодики та дисерт Ц 37.00

ISSN 1728-3817



35>

9 771728 381009