

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.

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.

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.Е. 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. Макаrchук, 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) 526 9367
Затверджено	Вченою радою біологічного факультету 07.02.05 (протокол № 12)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/7 від 09.06.99
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	01030, Київ-30, 6-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 3172, 239 3222; факс 239 3128

ВИПУСК 45

Голда Д.М., Мариненко Т.В., Демидов С.В. До 70-річчя кафедри генетики	6
Лазаренко Л.М., Демидов С.В. Цитогенетична активність харчових добавок в <i>Allium</i> -тесті	8
Демидов С.В., Чорна І.В., Дергай Н.М. Вплив тималіну й тимогену на вміст ДНК та РНК у Т-лімфоцитах селезінки мурчаків при сенсibiliзації та анафілактичному шоку	9
Ковальова В.А., Кузьменко Л.І., Степанов Ю.В., Остапченко Л.І. Дослідження активності тирозинової протеїнкінази в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку виразки	11
Жук О.В., Козерецька І.А. Аналіз нової <i>miniature</i> (m^{42})-подібної лінії у <i>Drosophila virilis</i> за перерозподілом копій ретротранспозону <i>Penelope</i> та дисгенними властивостями	12
Чайка В.О., Гавриш Л.І., Скопенко О.В., Строцька Є.А. Участь H_3 рецептора у функціонуванні мембрано-зв'язаних ферментів парієтальних клітин слизової оболонки шлунка за умов експериментальної моделі виразки	14
Мельничук О.М., Ноздренко Д.М., Мірошніченко М.С. Динаміка відновлення параметрів скорочення м'язових волокон після дії розчину кверцетину	15
Ноздренко Д.М., Богуцька К.І. Температурно-залежні зміни нелінійної динаміки м'язового скорочення скелетного волокна жаби	17
Сорока В.М., Ноздренко Д.М., Мірошніченко М.С. Динаміка скорочення рухової одиниці м'яза щура за дії частотної модульованої стимуляції	19
Моргаснко О.О., Чайка В.О. Вміст циклічних нуклеотидів у парієтальних клітинах слизової оболонки та гладеньких міоцитах шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки	21
Богуцька К.І. АТФаза активність актоміозину й міозину за різних умов зберігання їхніх препаратів	22
Паталах І.І., Зеленюк М.А., Лемешко І.В., Капішнікова М.С. Роль вільнорадикальних процесів у регуляції еритропоезу	23
Бондаренко Л.Б., Гайдай Г.Л. Ефект навантаження раціону фенілаланіном на колаген І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена	26
Кисельова І.К., Майданюк А.В., Імедадзе С.П. Визначення активності ксантинооксидазної реакції тимуса щурів	28
Мариненко Т.В., Козерецька І.А., Толпій І.М., Корсун С.Г. Дослідження опосередкованого впливу важких металів на генетичні процеси у <i>Drosophila melanogaster</i>	29
Воробей Н.А., Коць С.Я., Пацко О.В., Паршикова Т.В. Вплив інокуляції насіння азотфіксуючими мікроорганізмами на ріст і розвиток рослин люцерни	31
Карпенко Н.І. Запасні білки насіння видів роду <i>Coronilla</i> L.	33
Лисецький І.Л., Давиденко І.В. Генетична структура й морфологічна характеристика сріблястого карася <i>Carassius auratus gibelio</i> (Bloch, 1782) водойм України	36
Макарчук М.Ю., Федорчук С.В., Трушина В.А., Тараненко В.І. Характер реакції на рухомий об'єкт залежно від рівня уваги та швидкості переробки інформації в операторів електростанцій	39
Міщенко Л.Т., Тороп В.В., Молчанець О.В., Токарчук Л.В., Янішевська Г.С., Кучинова Т.В. Дослідження реакції зернових культур на розвиток вірусної інфекції методом електропровідності	41
Футорний С.М., Позур В.К., Макарчук М.Ю. Вплив фізичних навантажень на гуморальну імунну відповідь	43
Проценко Т.Л., Хілько Т.Д., Якубцова І.В., Левківська Л.В., Савицька І.М., Чурілова Т.Я. Вплив ліпіну на фактори захисту слизової оболонки шлунка щурів за дії ульцерогенних чинників	46

CONTENTS

ISSUE 45

Golda D., Marinenko T., Demidov S. The department of genetics 70 years anniversary	6
Lazarenko L., Demidiv S. Cytogenetical activity of the food addition in <i>Allium</i> -test.	8
Demidov S., Chorna I., Dergay N. Influence of timalin and tymagen on content of DNA and RNA in spleen T-lymphocytes of guinea pigs after	9
Kovalyova V., Kuzmenko L., Stepanov Yu., Ostapchenko L. Investigation of tyrosine protein kinase activity in stomach mucous cells membranes in rats under the conditions of ulcer development	11
Zhuk O., Kozeretska I. New <i>miniature</i> (m^{42})-like mutation analysis for <i>Penelope</i> retrotransposon distribution and dysgenic features	12
Chayka V., Gavrish L., Skopenko O., Strotzka Ye. Participation of histamine H ₃ receptor in functioning of membrane enzymes in gastric mucous parietal cells under the experimental stomach ulcer formation.....	14
Melnichuk O., Nozdrenko D., Miroshnichenko M. Restoration dynamics of muscle fibres contraction after treatment with quercetin solution.....	15
Nozdrenko D., Bogucyca K. Temperature-depended changes of anuran stretch muscle contraction nonlinear dynamics	17
Soroka V., Nozdrenko D., Miroshnichenko M. Contraction dynamics of rats muscle driving unit under the frequency modulated stimulation.....	19
Morgaienko O., Chayka V. The content of cyclic nucleotides in in rat gastric mucosal parietal cells and smooth myocytes in stress model of ulcerogenesis	21
Bogutska K. Actomyosin and myosin ATPase activity at different conditions of the storage of their preparations.....	22
Patalakh I., Zelenuk M., Lemeshko I., Kapishnikova M. A possible role of peroxidation processes in erythropoiesis regulation	23
Bondarenko L., Gaidai G. Effect of phenylalanine load on skin type I collagen of rats with Guerin's carcinomas.....	26
Kiselova I., Maydanjuk A., Imedadze S. Xantine oxidase activity of rat thymus	28
Marinenko T., Kozeretska I., Topchii I., Korsun S. Mediate influence of heavy metals on genetic processes at <i>Drosophila melanogaster</i>	29
Vorobey N., Kots S., Patsko O., Parshikova T. The influence of inoculation the seeds by nitrofixation microorganisms on the growing and development the medicago I.....	31
Karpenko N. The seeds' storage proteins of species from genus <i>Coronilla</i> L.....	33
Lisetsky I., Davydenko I. The genetic structure and morphology of Silver Crucian Carp <i>Carassius auratus gibelio</i> (Bloch, 1782) from reservoirs of Ukraine.....	36
Macarchuk M., Fedorchuk S., Trushyna V., Taranenko V. Research of reaction to moving object in connection with features of attention and processing of the information at operators of power stations.....	39
Mishenko L., Torop V., Molchanets O., Tokarchuk L., Yanishevskaya G., Kuchynova T. Investigation of small grain crop reaction on the development of viral infection by the electric conductivity method.....	41
Futorny S., Pozur V., Makarchuk N. Influence of physical loadings on humoral immune answer.....	43
Protsenko T., Khilko T., Yakubtsova I., Levkivska L., Savitska I., Churilova T. Influence of lipin on gastric mucous protective factors under condition ulcerogenic agents action in rats	46

ВИПУСК 46

Ковальова В.А., Гавриш Л.І., Степанов Ю.В., Остапченко Л.І. Вплив меланіну на активність протеїнази слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку аспіринової виразки.....	48
Степанова Л.І., Клепко А.В., Ромась І.І., Лапоша О.А., Левченко Л.В., Хижняк С.В. Ліпопероксидація та антиокиснювальна активність апікальної мембрани еритроцитів слизової оболонки тонкої кишки після дії іонізуючої радіації.....	49
Імедадзе С.П., Майданюк А.В., Кисельова І.К. Визначення кінетичних параметрів 5'-нуклеотидазної реакції тимуса щурів.....	50
Дворченко К.О., Матишевська О.П., Майданюк А.В. Дослідження вмісту аденіннуклеотидів, аденозину й аденіну у опромінених тимоцитах щурів.....	52
Гавриленко В.В., Каніboloцький Д.С., Мірошніченко М.С., Зима В.Л., Давидовська Т.Л. Дослідження конформаційної рухливості ненасиченого іоном кальцію тропоніну с серцевого м'яза методом молекулярної динаміки.....	53
Корольова Д.С., Фролов А.Л., Гаман Н.О., Сівко Р.В., Гавриш Л.І. Дослідження активності H^+/K^+ -атфазі в гомогенаті слизової оболонки шлунка за умов експериментальної моделі виразки шлунка.....	56
Євтушенко Н.В., Галич І.П. Характеристика функціонування глікопротеїнів.....	58
Дьоміна Е.А., Рябченко Н.М., Кудрявцева А.Г., Войціцький В.М. Оцінка і прогнозування індивідуальної радіаційної чутливості на основі тест-системи лімфоцитів периферичної крові людини.....	63
Паталах І.І. Редокс-регуляція клітинних сигналів.....	64
Федорчук С.В., Тараненко В.І., Горго Ю.П. Показники реакції на рухомий об'єкт у операторів теплових електростанцій.....	67
Залоїло О.В., Філенко О.М., Буцацький Л.П. Порівняльна екотоксикологічна оцінка впливу новітніх інсектицидів на ґрунтових черв'яків.....	68
Ткачук О.О. Фізіолого-біохімічна стійкість троянд у трансформованому середовищі.....	71
Мазур Т.П. Адаптаційні особливості водних рослин уштучних басейнах захищеного ґрунту.....	73
Карпенко Н.І., Бойко В.Р. Електрофоретичні дослідження представників родів <i>Securigera</i> DC. і <i>Coronilla</i> L.	75
Чорна І.В., Демидов С.В., Дергай Н.М. Вивчення морфометричних показників Т-лімфоцитів селезінки мурчаків при сенсibiliзації під впливом тималіну та тимагену.....	77
Кургалюк Н.М., Ткаченко Г.М., Рибальченко В.К. NO-залежні ефекти функціонування мітохондрій міокарда щурів за умов інтервальної гіпоксії та стресу.....	78
Драницина А.С., Телегєєв Г.Д., Дибков М.В. Молекулярні маркери ДНК: маркери RAPD і мінісателіти.....	81
Перепелюк М.М., Слончак А.М., Оболенська М.Ю. Методичні підходи до вивчення експресії інтерферону альфа в інтактній та регенеруючій печінці щурів.....	86
Погоріла Н.Ф. Лектинологія – перспективна галузь наукових досліджень.....	88
Огородник Л.Є., Яковлева Л.М. Бактеріальне захворювання айру тростинного (<i>Acorus calamus</i> L.) в Україні.....	90
Воробець Н.М., Ніколайчук В.І., Козловський В.І., Бойко Н.В., Колесник А.І. Взаємозв'язок між накопиченням важких металів і водним потенціалом рослин при зростанні їх на забруднених територіях.....	91

CONTENTS

ISSUE 46

Kovalyova V., Gavrish L., Stepanov Yu., Ostapchenko L. Effect of melanine on proteinkinase's activity of membranes cells gastric mucous of the rat in the development aspirin's ulcer	48
Stepanova L., Klepko A., Romas I., Laposha O., Levchenko L., Hizhnyk S. Lipid peroxidation and antioxidative activity of small intestine mucous enterocyte apical membrane after ionizing radiation action	49
Imedadze S., Maydanjuk A., Kiselova I. Study of kinetic parameters of 5'-nucleotidase reaction in rat thymus	50
Dvorschenko K., Matyshevska O., Maidanyuk A. Research of the contents of adeninenucleotides, adenosine and adenine in the irradiated thymocytes of rats	52
Gavrilenko V., Kanibolotsky D., Miroshnichenko M., Zyma V., Davydovska T. Conformational Motions of Calcium-unsaturated Cardiac Troponin C: A Molecular Dynamics Study	53
Korolova D., Frolov A., Gaman N., Sivko R., Gavrish L. Investigation of H ⁺ /K ⁺ -ATPase activity in stomach mucosal gomogenate under the experimental stomach ulcer formation.....	56
Yevtushenko N., Galich I. Characterization functions of glycoproteides.....	58
Dyomina E., Ryabchenko N., Kudryavtceva A., Voitsitskiy V. Evaluation and prediction of the individual radiosensitivity based on the test system of human peripheral blood lymphocytes.....	63
Patalakh I. Redox-regulation of cell signalling.....	64
Fedorchuk S., Taranenko V., Gorgo Yu. Features of research of response to the moved object for operators of firms of a power engineering	67
Zaloilo O., Filenko O., Buchatsky L. A comparative assessment of the effect of the most recently developed insecticides on earthworms.....	68
Tkachuck O. Physiological and biochemical steadiness of roses in transformed environment.....	71
Mazur T. Adaptive peculiarities of aquatic plants in artificial reservoirs of greenhouses	73
Karpenko N., Boyko V. The electrophoretical investigation of representatives of genera <i>Securigera</i> DC. and <i>Coronilla</i> L.	75
Chorna I., Demidov S., Dergay N. Exploration of morphometric parameters of T-lymphocytes of guinea pigs after sensitization and anaphylactic shock	76
Kurhalyuk N., Tkachenko G., Rubalchenko V. NO-dependent effects of rat's myocardium mitochondria functioning under intermittent hypoxia and stress.	78
Dranitsyna A., Telegeev G., Dybkov M. Molecular DNA markers: RAPD markers and minisatellites.....	80
Perepelyuk M., Slonchak A., Obolenskaya M. Methodical approaches to investigation of IFN α -expression in intact and regenerating rat liver	85
Pogorila N. Lectinology is a very promising field of research activities.....	87
Ogorodnik L., Yakovleva L. Bacterial disease of sedge cane (<i>Acorus calamus</i> L.) in Ukraine	89
Vorobets N., Nikolaychuk V., Kozlovskiy V., Boyko N., Kolesnyk A. Interrealation between accumulation of heavy metals and plant water potential at their growth on contaminated soil	90

ДО 70-РІЧЧЯ КАФЕДРИ ГЕНЕТИКИ

Восени 2004 р. виповнюється 70 років з дня заснування кафедри генетики Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Наведено історичний огляд розвитку кафедри й сучасний стан наукової та викладацької роботи.

The Department of Genetics in National Taras Shevchenko Kiev University was founded 70 years ago. In this work the historical review of development of faculty and modern condition of scientific and teaching work is submitted.

Уперше почав читати курс "Учение о наследственности" професор С.Ю. Кушакевич у 1911–1912 рр. як окремих курс по кафедрі зоології.

Теоретичні питання генетики почали розроблятися в 1920–1930-х роках. Основними центрами генетичних досліджень в Україні стали АН УРСР, Київський, Одеський і Харківський університети. Великий вплив на формування генетики в Україні мав 5-й Міжнародний генетичний конгрес (Берлін, 1927 р.), на якому було продемонстровано великі успіхи хромосомної теорії спадковості та відкриття Меллером мутагенної дії рентгенівських променів.

У 1923 р. у Києві при АН УРСР було створено Комісію з експериментальної біології та генетики з метою координації всіх генетичних досліджень в Україні. Очолив її І.І. Шмальгаузен. У роботі Комісії брав участь М.І. Вавилов. І.І. Шмальгаузен не тільки був науковим керівником дослідницької роботи, а й сформував школу генетиків-еволюціоністів (Ф.Г. Добржанський, П.О. Ситько, Г.І. Шпет, М.І. Драгомиров, Б.І. Балінський, М.М. Синицький), які зробили гідний внесок у розвиток генетики та зоології в Україні й за її межами. У свою чергу І.І. Шмальгаузен був учнем і послідовником відомого біолога О.М. Северцова (1866–1936), основоположника еволюційної морфології тварин, котрий після ганебного рішення вченої ради Київського університету імені святого Володимира про відмову від участі у святкуванні 100-річчя від дня народження Ч. Дарвіна на знак протесту залишив Київський університет і переїхав до Москви, де з 1911 р. був зарахований професором Московського університету.

Професор Київського університету С.Ю. Кушакевич, повернувшись з наукового стажування в Ріхарда Гетвіга (Мюнхен), у 1911 р. започатковує на кафедрі зоології курс "Вчення про спадковість", який він викладав з позиції класичної генетики. У статті "Попытки цитологического обоснования законов наследственности", що вийшла в 1914 р. у № 10 журналу "Природа" і яка дістала схвальну оцінку М. Кольцова, Кушакевич детально описував картини мейозу та явище кросинг-оверу – обміну алетоморфними ділянками між гомологічними хромосомами.

Після смерті Кушакевича в 1920 р. дослідження явища спадковості гідно продовжив І.І. Шмальгаузен, котрий цього року повернувся до Києва. Тут він організовує кафедру динаміки розвитку, читає курси загальної біології, ембріології та динаміки розвитку. В основу курсу динаміки розвитку Шмальгаузен поклав генетичні закономірності. Як і Кушакевич, він викладає курс генетики студентам, залучає їх до генетичних досліджень. При університеті існувала науково-дослідна лабораторія зоології для підготовки аспірантів, котру очолював також Шмальгаузен. У 1929 р. до неї було прийнято перших аспірантів-генетиків. У 1930 р. у системі Академії наук організовано Зоолого-біологічний інститут, в який влилася ця лабораторія з усіма співробітниками й аспірантами. Директором інституту став Шмальгаузен. У відділі експериментальної зоології цього інституту було організовано групу генетиків –

наукових співробітників і аспірантів (І.І. Назаренко, Г.І. Шпет, П.І. Ситько, І.М. Крайовий). Ця група також працювала під керівництвом Шмальгаузена.

Новий етап у розвитку генетичних досліджень на Україні розпочався в 1934 р., коли в Інституті зоології АН УРСР було створено відділ генетики, який очолив І.І. Агол. До цього відділу, крім керованої Шмальгаузеном групи, увійшли й нові співробітники. У 1937 р. в ньому працювало понад 30 осіб, у тому числі 20 наукових співробітників і аспірантів (П.О. Ситько, М.П. Тарнавський, І.І. Клодницький, І.М. Крайовий, М.І. Сиротина та ін.). Відділ був добре оснащений оптичними приладами, термостатами, рентгенівським апаратом тощо. Щорічно видавались збірники наукових праць його співробітників, зокрема в 1935–1941 рр. вийшли друком п'ять томів "Збірників праць з генетики". Ряд праць співробітників відділу опубліковано у виданнях АН СРСР і АН УРСР.

Восени 1934 було організовано кафедру дарвінізму і генетики в Київському університеті. Професорами й доцентами кафедри були І.І. Клодницький, П.О. Ситько, Б.І. Балінський, П.А. Храновський. Безпосередню участь в організації кафедри брав І.І. Агол.

Після від'їзду І.І. Шмальгаузена до Москви в 1936 р., куди його запросили очолити Інститут морфології тварин АН СРСР (після смерті його засновника О.М. Северцова), ця кафедра розділилась на дві – механіки розвитку (завідувач – доц. Б.І. Балінський) і дарвінізму й генетики (її очолив акад. І.І. Агол). Після арешту І.І. Агола в 1937 р. місце завідувача кафедри залишилось вакантним. На цю посаду було рекомендовано доцента С.М. Гершензона, представника московської школи генетиків, учня М.К. Кольцова і С.С. Четверикова. Він керував кафедрою протягом 1937–1941 та 1944–1948 рр. Наукова робота на кафедрі велась у тісній співпраці з відділом генетики Інституту зоології АН УРСР. У Київському університеті проводились дослідження з радіаційної генетики, генетики популяцій, мікроеволюційних процесів. Вивчалась дія природного добору в природних умовах на мутантні форми різних видів дрозофіли. Праці з питань визначення ролі мутантів в еволюційному процесі були одними з перших у світовій літературі.

У Київському університеті в 1946–1948 рр. функціонувала ще одна кафедра – генетики й селекції рослин, яку очолив акад. АН УРСР М.М. Гришко – автор першого підручника з генетики українською мовою (М.М. Гришко-Лисенко, Курс загальної генетики, Держсільгоспвидав, Харків, 1933).

Період занепаду генетики почався після вже згаданої сесії ВАСГНІЛ у серпні 1948 р. Після цієї сесії генетика як наука була засуджена, фахівці генетики мусили шукати роботу, не пов'язану з спеціальністю, або пере-кваліфіковувались. Багато долів було зламано, наука понесла істотні втрати. Програму з генетики вилучили з навчальних планів біологічних, медичних і сільськогосподарських вищих навчальних закладів. Завідувачі кафедр дарвінізму й генетики та генетики й селекції рослин професора С.М. Гершензона й академіка

М.М. Гришка було звільнено з роботи в університеті. Обидві кафедри з'єднали в одну, яку назвали кафедрою творчого дарвінізму. Завідувачкою кафедри призначили цитолога професора К.Ю. Кострюкову (1948–1949), а потім професора М.А. Кравченка (1950–1953) – фахівця із селекції сільськогосподарських тварин. З 1953 по 1956 р. кафедру очолював проф. С.М. Бугай, фахівець у галузі рослинництва. У 1956 р. ця кафедра була з'єднана з кафедрою експериментальної біології, яку очолював проф. Б.Г. Новиков. На цій кафедрі доцент П.А. Храновський читав деякі спецкурси, базуючись на досягненнях класичної генетики. Частина співробітників кафедри творчого дарвінізму (доцента Є.Л. Голинську та ін.) було переведено на кафедру фізіології рослин.

Період стагнації тривав до жовтня 1964 р., коли на жовтневому Пленумі ЦК КПРС генетику було "реабілітовано". Треба зазначити, що аномальне становище в генетиці не могло тривати так довго. Життя брало своє і вже наприкінці 1950-х рр. почали "підпільно" відроджуватись дослідження з генетики. На прохання М.П. Дубиніна, відомий вчений-атомник І.В. Курчатова у 1955 р. привіз із США колекцію мутантних ліній дрозофіли – один з основних модельних об'єктів генетиків (свої лінії були втрачені). У 1958 р. у Новосибірську створено інститут цитології і генетики, який очолив лідер радянських генетиків М.П. Дубинін. Там знайшли роботу і вчені з України: П.К. Шкварников, якого Дубинін обрав своїм заступником з наукової роботи, колишній завідувач кафедри генетики Одеського університету Ю.П. Мірюта, науковці С.П. Коваленко, С.І. Стрільчук, В.К. Шумний та ін.

У 1960 р. у Києві було організовано відділ генетики рослин у Центральному ботанічному саду АН УРСР, який у березні 1963 р. переведено в Інститут ботаніки АН УРСР. У 1961 р. до відділу було прийнято перших аспіранти Д.М. Голду, С.С. Малюту, а через рік їхні ряди поповнили В.С. Левенко, В.А. Труханов, О.Ф. Андросчук. Організатором і керівником цього відділу був член.-кор. АН УРСР В.П. Зосимович. Відділ став осередком, навколо якого стала впроваджуватись генетика на Україні. У 1967 р. створено Сектор генетики при Академії наук УРСР на базі трьох відділів: генетики рослин (зав. В.П. Зосимович), експериментального мутагенезу (зав. П.К. Шкварников) і відділ генетики тварин (зав. М.М. Колесник). Очолював Сектор проф. П.К. Шкварников. У 1968 р. Сектор генетики було реорганізовано в Сектор молекулярної біології і генетики (зав. проф. С.М. Гершензон), а в 1973 р. – в Інститут молекулярної біології і генетики (директор Г.Х. Мацука).

Лише в 1963 р. у Київському університеті було відновлено кафедру генетики і селекції. До 1967 р. керував нею доц. П.А. Храновський. В 1967 р. на завідування кафедрою запрошено за сумісництвом проф. П.К. Шкварникова – завідувача Сектора генетики АН УРСР. Він залучив до роботи на кафедрі ряд науковців із Сектора генетики АН УРСР – Г.Д. Бердишева, Д.М. Голду, С.П. Коваленка, П.О. Ситька, С.І. Стрільчука.

У 1970 р. П.К. Шкварников залишив кафедру й рекомендував на цю посаду професора Г.Д. Бердишева – спеціаліста з молекулярної генетики, котрий і очолював кафедру з 1971 по 1985 р. У 1970–1971 рр. обов'язки завідувача кафедрою генетики виконувала доцент Є.Л. Голинська. У 1974 р. кафедра генетики і селекції було перейменовано на кафедру загальної та молекулярної генетики.

Протягом 1986–1997 рр. кафедрою завідував професор С.М. Храпунов, випускник кафедри генетики, а після його від'їзду до США – проф. С.В. Демидов, також випускник цієї самої кафедри.

Співробітники кафедри та створеної при ній у 1976 р. лабораторії генетики індивідуального розвитку прово-

дять спільні наукові дослідження з Інститутом фізіології рослин та генетики НАН України (м. Київ) з вивчення процесів старіння; з лабораторією "Біохімія хроматину" (А. Прюнель) Інституту Жака Моно (м. Париж, Франція) – з вивчення структури нуклеосоми в складі мініциклів ДНК; з Державним науковим центром Російської Федерації – Інститутом медико-біологічних проблем (м. Москва), Інститутом колоїдної хімії та хімії води НАН України (м. Київ) – з вивчення медико-біологічних властивостей легкої води (зі зниженим вмістом радіоактивних і важких стабільних ізотопів водню й кисню) та її використання в умовах космосу. Лабораторією разом з Інститутом фізіології рослин та генетики НАН України (м. Київ) та Інститутом ботаніки НАН України (м. Київ) виграно тендер "Молекулярно-генетичні особливості процесів прискореного старіння зародків насіння". Проводяться спільні наукові дослідження з Інститутом землеробства УААН з теми "Проведення екотоксикологічної оцінки ґрунту та рослинницької продукції за допомогою біотести мушки дрозофіли" і з Інститутом молекулярної біології та генетики НАН України з теми "Виділення та секвенування гена Delta у *Drosophila virilis*". На кафедрі ведуться роботи з наданого INTAS гранта "Comparative Population and Monitoring Research on Gentoo Penguins (*Pygoscelis papua*) in Antarctica".

На кафедрі проведено систематичні дослідження особливостей тирозинової флуоресценції в складі білків, які використані для вивчення структури білків хроматину – гістонів; з'ясовано молекулярні механізми тотальної репресії геному в процесі гаметогенезу; розроблено підхід до визначення індивідуальних особливостей нестабільності геному людини на основі цитогенетичних параметрів. Створено колекції генетичних ліній двох видів дрозофіл. Започатковано популяційно-генетичні дослідження на Українській антарктичній станції Академік Вернадський.

Результати наукових досліджень відображено в численних наукових публікаціях і представлено на вітчизняних і міжнародних форумах. За останні 20 років на кафедрі підготовлено 35 кандидатських і 7 докторських дисертацій.

На кафедрі читаються нормативні курси "Генетика з основами селекції" та "Молекулярна біологія", спецкурси: "Фізичні методи досліджень у молекулярній біології й генетиці", "Генетика дрозофіли", "Молекулярні основи спадковості та мінливості", "Хромосоми еукаріот", "Онкогенетика", "Цитогенетика", "Генетика людини", "Фармакогенетика", "Фізико-хімічні основи генетики", "Білково-нуклеїнові взаємодії", "Історія генетики", "Експериментальний мутагенез", "Генетика постнатального онтогенезу", "Імуногенетика", "Аналітична генетика", "Популяційна генетика", "Геноміка", "Генетичні основи інтелекту", "Нестабільність геному", "Основи біотехнології", "Основи селекції", "Політенні хромосоми", "Генетика мікроорганізмів", "Генетичні основи еволюції", "Генетичний моніторинг", "Генетичний аналіз", "Медична генетика", "Сучасні методи скринінгу кДНК бібліотек", "Генетика рослин". До викладання залучаються видатні вчені науково-дослідних установ м. Києва.

За роки існування на кафедрі підготовлено понад 600 фахівців-генетиків, серед них такі відомі вчені, як:

випускник 1948 р. Володимир Іванович Головченко (створив безалкалоїдний сорт люпину, який набув великого практичного значення в сільському господарстві);

випускник 1969 р. завідувач відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф., Лауреат премії ім. В.Я. Юр'єва, перший віцепрезидент Українського товариства генетиків та селекціонерів, Головний редактор журналу "Вісник Українського

товариства генетиків і селекціонерів імені Вавилова" Віктор Анатолійович Кунах;

випускник 1971 р. директор Інституту клітинної біології НАНУ, акад. НАН України, д-р біол. наук, член Європейської академії, академії Леопольдіна, Баварської академії наук, Світової академії мистецтва та наук, лауреат премії ім. В.Я. Юр'єва АН УРСР, Державної премії СРСР у галузі науки і техніки, дослідницької премії ім. О. фон Гумбольдта, засновник фундаментальних досліджень у галузі клітинної та генетичної інженерії рослин в Україні Юрій Юрійович Глеба;

завідувачка лабораторії генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, д-р біол. наук, проф., член-кореспондент НАН України Євгенія Борисівна Патон (випуск 1978 р.).

1. Генетика з основами селекції / С.І. Стрельчук, С.В. Демидов, Г.Д. Бердишев та ін. – К., 2000. – С. 3–10. 2. Голда Д.М., Бердишев Г.Д. // Цитология и генетика. – 1984. – Т. 1, № 5. – С. 393–394. 3. Голда Д.М. Історія, відкриття, персоналії, терміни. – К., 2004. – С. 3–127.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 575.224.23

Л.М. Лазаренко, канд. біол. наук, С.В. Демидов, д-р біол. наук

ЦИТОГЕНЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ХАРЧОВИХ ДОБАВОК В *ALLIUM*-ТЕСТІ

Досліджено цитогенетичну активність харчових добавок. Виявлено різного ступеня цитотоксичну й цитогенетичну активність деяких харчових добавок в Allium-тесті. Зокрема, генотоксичний ефект препарату "похудіння" виявляється в підвищенні частоти аберантних анафаз у клітинах кореневої меристеми батуну (Allium fistulosum L.), що свідчить про прискорення мутаційного процесу; препарат "vita" гальмує поділ клітин, не впливаючи на утворення хромосомних аберацій; інші досліджувані препарати ("конго" і "спорт") порушують генетичний апарат шляхом інших механізмів.

We have studied cytogenetical activity of several food additions. Some of them showed a cytotoxic and cytogenetical activity of different extent in Allium-test. In particular, a genotoxic effect of "Pohudinnya" drug is manifested as an increase in the frequency of chromosome aberration in root-meristeme cells of Welsh Onion (Allium fistulosum L.), an evidence of an increase in the mutation rate. The "vita" drug slowed down the cell division but did not influence to appearance of the chromosome aberrations. Others drugs ("kongo" and "sport") hurted genetical apparatus by other mechanisms.

Вступ. З підвищенням темпом мутаційного процесу пов'язують виникнення новоутворень [1], що спонукає до вивчення природи мутагенезу та його спонтанного рівня в організмів різного рівня біологічної організації [2]. Забруднення природного середовища мутагенами становить загрозу для спадкових структур всіх видів, не виключаючи людину. Заборонити надходження в довкілля генотоксичних речовин не реально, а обтяженість людських популяцій вантажем шкідливих мутацій не дозволяє встановлювати для генетичних змін будь-який допустимий рівень. Тому одним з напрямків у вирішенні проблеми захисту генофонду людства та охорони навколишнього середовища є контролювання мутаційної мінливості за первинними мутагенними ефектами – як один з аспектів системи гігієнічного регламентування [3]. Фундаментальні принципи будови й функціонування спадкових структур спільні для всіх таксономічних груп: мікроорганізмів, рослин, ссавців, – що дозволяє прогнозувати можливі генетичні ефекти на підставі результатів первинного тестування.

Однією з поширених сьогодні груп факторів, не зовсім безпечних для темпу мутаційного процесу, є харчові добавки. До цієї групи зокрема належать фарбники, сполуки, що імітують смак чи запах певних продуктів харчування (такі як гриби, курячий бульйон тощо), консерванти та ін. Але ж не виключено, що механізм дії харчових добавок, додавання яких у їжу має сприяти певному ефекту, не обмежується останнім. Швидке впровадження різних добавок у виробництво свідчить про те, що напевно чи згадані речовини пройшли всі дослідження спектру дії, зокрема на генетичну активність. Але, як відомо, потрапляючи до організму, харчові добавки залучаються до метаболізму, а через його зміни можуть впливати й на перебіг мутаційного процесу.

Для повного тестування речовин на генотоксичність застосовують тести з використанням як модельних об'єктів мікроорганізмів, клітин ссавців та рослин [4]. Для експрес-виявлення потенційної мутагенності деякі з рослинних об'єктів неперевірені за швидкістю і простотою. Таким зокрема є запропонований Леваном у 1934 р. *Allium*-тест, який у різних модифікаціях не втратив популярності й до сьогодні [5–7]. Наша модифікація

Allium-тесту полягає у використанні насіння цибулі батун (*Allium fistulosum* L.) [8].

У зв'язку з викладеними міркуваннями метою даної роботи було дослідження цитогенетичної активності деяких харчових добавок в *Allium*-тесті.

Матеріали та методика. Досліджували цитогенетичну активність харчових добавок, одержаних від Замовника й позначених ним як "vita", "конго", "спорт" і "похудіння". Речовини у воді не розчинялися. Оскільки препарати передбачалися до прийому *per os*, вирішено зробити витяжку за температури тіла людини. Препарати, заливши дистильованою водою об'ємом 300 мл, помістили на 6 год у термостат з фіксованою температурою 37 °С.

Тестування препаратів проводили в одній з модифікацій *Allium*-тесту. Насіння цибулі батун (*Allium fistulosum* L.) з рівнем контрольного мутування за частотою аберантних анафаз близько 8 % пророщували в дистилаті (контроль) та у витяжках досліджуваних препаратів (дослідні варіанти позначено відповідно назвам препаратів).

Для виявлення цитотоксичного ефекту обчислювали схожість через 72 год з моменту посіву насіння. Генотоксичний ефект оцінювали анафазним методом. Обчислювали частоту аберантних анафаз (ЧАА) як частку клітин з абераціями, виражену у відсотках та пошкодженість аберантної клітини (ПАК) – кількість аберацій, що припадає на 1 аберантну клітину, також виражену у відсотках.

Фіксацію проростків, приготування та аналіз препаратів проводили за загальноприйнятими, дещо модифікованими методиками. Математичну обробку одержаних результатів, достовірність відмінностей обчислювали за методом χ^2 [9].

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно з табл. 1, схожість насіння в усіх дослідних варіантах помітно знижена порівняно з контролем. Особливо це стосується препаратів "конго" і "спорт" (табл. 1). Оскільки тестування препаратів проводили методом "сліпого скринінгу", то не можна розглянути можливу природу як гальмування мітозу, так і мутаційних аномалій, про що йдеться нижче.

Таблиця 1. Вплив харчових добавок на схожість насіння та утворення хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми *Allium fistulosum* L.

Варіант досліду	Схожість насіння, % Через 72 год	Вивчено анафаз, n	Частота аберантних анафаз, %	X2	Пошкодженість аберантної клітини, %
Дистилят	74 ± 3,10	1053	8,17 ± 0,84	–	132,6
"vita"	55 ± 3,52	337	8,31 ± 1,48	0,17	126,0
"конго"	42 ± 3,49	426	1 1,50 ± 2,48	1,67	126,2
"спорт"	43 ± 3,50	601	7,15 ± 1,04	0,41	127,9
"похудіння"	68 ± 3,30	634	15,77 ± 1,46	22,57	133,0

Примітки: X20,05 = 3,84, X20,01 = 6,63

Як видно з табл. 1, частота аберантних анафаз у клітинах кореневої меристеми батуну у варіантах "vita" і "спорт" залишалась у межах контролю.

Помітне зростання частоти аберантних анафаз спостерігається в меристемних клітинах проростків з варіанту "конго". Однак тут можна говорити лише про тенденцію до наростання, оскільки відмінність між даним варіантом і контролем статистично не значима (табл. 1). Хоча відсутність статистично значимої відмінності в частоті аберантних анафаз між варіантом "конго" і контролем може пояснюватись іншими порушеннями, що привели до втрати життєздатності насіння (табл. 1). До того ж, у мітозних клітинах, крім зростання кількості аберацій, мали місце різні порушення ядра. Перш за все, це К-мітозні метафази, "розбиті" профазы – як перешкода для переходу клітини до стадії анафази, коли аберації враховуються. Багатополісні мітози, що мали місце, так само не враховуються як аберації, однак про цитогенетичну активність препарату загалом можуть свідчити.

Подібні цитогенетичні ефекти спостерігалися нами й у варіанті з препаратом "спорт", тоді як частота аберантних анафаз залишалась на рівні контролю (табл. 1).

У варіанті з препаратом "похудіння" спостерігалось значне підвищення частоти аберантних анафаз з високою оцінкою статистичної достовірності, як це видно з табл. 1.

Що стосується пошкодженості аберантної клітини, то, як видно з тієї ж таблиці, цей показник у дослідних варіантах мало відрізняється від контрольного. Однак статистично достовірне зростання ЧАА за незмінного рівня ПАК у варіанті "похудіння" свідчить про те, що під впливом даного препарату мутаційний процес інтенсифікується за рахунок пошкодження хромосом у нових, ще непошкоджених клітинах, а не шляхом зростання нестійкості хромосом у вже пошкоджених клітинах. Ще виразніша картина спостерігається у варіанті з препаратом "конго". Підвищення ЧАА (хай і не достовірне статистично) супроводжується зниженням показника

ПАК. Отже, і даний препарат, не пошкоджуючи хромосоми в уже пошкоджених клітинах, залучає до мутаційного процесу клітини ще не пошкоджені.

Таким чином, дослідженнями нами харчовим добавкам властива різного ступеню цитотоксична й цитогенетична активність. З них препарат "vita" гальмує поділ клітини, не впливаючи на утворення хромосомних аберацій. Інші досліджувані препарати, крім цитотоксичного ефекту, який позначився на схожості насіння, виявили цитогенетичні ефекти різних механізмів. Якщо пошкоджуюча дія препарату "похудіння" виявляється в підвищенні частоти аберантних анафаз, тобто в прискоренні мутаційного процесу, то препарати "конго" і "спорт" порушують генетичний апарат шляхом інших механізмів.

Незважаючи на закодованість досліджуваних нами препаратів, що не дозволяє проаналізувати можливі механізми впливу кожного з них як на мітотичний апарат, так і на хромосоми, нами було виявлено потенціальну здатність деяких харчових добавок пошкоджувати хромосомний матеріал. Той факт, що всі досліджувані препарати належать до харчових добавок, дозволяє робити висновки про необхідність обов'язкового генетичного тестування всіх харчових добавок, які надходять у виробництво.

1. Aimee L. Jackson and Lawrence A. Loeb. // Genetics. – 1998. – Vol. 148, № 4. – P. 1483–1490. 2. Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J.F. // Genetics. 1998. – Vol. 148, № 4. – P. 1667–1686. 3. Краєчук О.П. Принципові підходи до гігієнічного регламентування пестицидів з урахуванням їх мутагенної активності // Матеріали наук.-практ. конф. "Актуальні проблеми екологічної токсикології", Київ, 28–29 травня 1998. – К., 1998. – Ч. 1. – С. 136–142. 4. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. – М., 1989. – С. 13–160. 5. Grant W.F. // Mutat. Res. – 1982. – Vol. 99. – P. 273–291. 6. Rank J., Nielsen M.H. // Mutat. Res. – 1994. – Vol. 312. – P. 17–24. 7. Fiskesjo G. // Mutat. Res. – 1988. – Vol. 197. – P. 243–260. 8. Лазаренко Л.М. // Автореф. ... дис. канд. біол. наук. – К., 1999. 9. Лакін Г.Ф. Биометрия. – М., 1990. – С. 181–214.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 612.438.612.017.1

С.В. Демидов, д-р біол. наук, І.В. Чорна, пров. інж.,
Н.М. Дергай, пров. інж.

ВПЛИВ ТИМАЛІНУ Й ТИМОГЕНУ НА ВМІСТ ДНК І РНК У Т-ЛІМФОЦИТАХ СЕЛЕЗІНКИ МУРЧАКІВ ПРИ СЕНСИБІЛІЗАЦІЇ ТА АНАФІЛАКТИЧНОМУ ШОКУ

Установлено, що збільшення кількості ДНК при сенсibilізації та анафілактичному шоку свідчить про активацію проліферативних процесів в імунокомпетентних клітинах. Виявлено, що застосування тималіну й тимогену призводить до активації генетичного апарату клітин, що у свою чергу активує метаболізм імунокомпетентних клітин, що призводить до проліферації та диференціювання Т-лімфоцитів.

Increasing of DNA content by sensitization and anaphylactic shock reports about activation of proliferation in immunocompetent cells. Tymalin and tymagen use leads to genetic apparatus activation. As result general metabolism of immunocompetent cells is activated causing T-lymphocytes proliferation and differentiation.

Вступ. Розкриття біологічної ролі нуклеїнових кислот як матеріальних носіїв генетичної інформації, діючих на всіх рівнях (при передачі інформації від одного покоління до іншого, її збереженні в індивідуальному організмі, її фенотипічному вираженні) є одним із успіхів молекулярної біології.

ДНК посідає особливе місце, тому що генетична інформація записана в нуклеотидних послідовностях її величезних молекул. У ядрі еукаріот відбувається також утворення субодиниць рибосом шляхом комплексування синтезованих в ядрах рибосомних РНК з рибосомальними білками, які синтезуються в цито-

© С.В. Демидов, І.В. Чорна, Н.М. Дергай, 2005

плазмі й переносяться в ядро. Так, порушення репараційних процесів буде призводити до зміни первинної структури ДНК і автоматично – до зміни структури білків, що вірогідно позначиться на їхній специфічній активності, яка може просто щезнути чи перебудуватися так, що не буде забезпечувати клітинні функції, у результаті чого клітина загине.

Порушення редуплікації ДНК призведуть до зупинки розмноження клітин або до виникнення клітин з неповноцінним набором генетичної інформації, що також згубно для клітин. До такого самого наслідку приведе порушення процесів розподілення генетичного матеріалу (молекул РНК) під час поділу клітини. Випадання в результаті пошкодження ядра чи у випадку порушення будь-яких регуляторних процесів синтезу кожної форми РНК автоматично приведе до зупинки синтезу білка в клітині або до грубих його порушень [1–4]. Збільшення вмісту ДНК при сенсibiliзації та анафілактичному шоку свідчить про активацію проліферативних процесів в імункомпетентних клітинах. Оскільки активація проліферативних процесів у лімфоцитах селезінки сполучена з прискоренням синтезу ДНК, метою наших досліджень є вивчення вмісту нуклеїнових кислот за розвитку гіперчутливості негайного типу й анафілактичному шоку та вплив тималіну й тимогену на ці процеси. Ураховуючи ці міркування, вивчалися зміни вмісту ДНК і РНК у перерахунку на одну клітину селезінки мурчаків при розвитку цих процесів.

Об'єкт і матеріали досліджень. У дослідях використано 50 мурчаків масою 250 ± 25 г. Для розвитку гіперчутливості негайного типу взяли класичну модель імунізації тварин конячою сироваткою.

Спектрофотометричний метод виявлення нуклеїнових кислот заснований на вимірюванні різниці екстинцій перхлорних екстрактів тканин [5]. Наважку тканини від 5 до 500 мг поміщають у центрифужну пробірку з ретельно відміряною кількістю (5–10 мл) 0,5 Н розчину HClO_4 і підігрівують 20 хв на киплячій водяній бані. Після охолодження й центрифугування надосадову рідину використовують для вимірювання абсорбції в ультрафіолетовій області спектра на спектрофотометрі. Вимірювання проводять проти контролю, яким є 0,5 Н HClO_4 при 270–290 нм у кварцових кюветах в 1 см. Різниця між обома величинами, поділена на 0,19, дає кількість мікрограмів нуклеїнового фосфору в 1 мл досліджуваного розчину (0,19 – питома екстинція, яка в межах 270 нм є практично однаковою для РНК і ДНК. Для перерахунку фосфору на кількість нуклеїнових кислот використовують коефіцієнт перерахунку: для РНК – 10,5, для ДНК – 10,1. Таким чином,

$$C = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19},$$

де C – концентрація нуклеїнового фосфору в мл; D_{270} – оптична щільність досліджуваного гідролізату при 270 нм; D_{290} – оптична щільність досліджуваного гідролізату при 290 нм; 0,19 – питома екстинція

В усіх випадках додатково вимірюють оптичну щільність при 260 нм. Узагалі вона дорівнює оптичній щільності при 270 нм з невеликими відхиленнями в межах $\pm 15\%$. Велике відхилення вказує на наявність домішок не нуклеїнового характеру. Для усунення їх попередньо відмивають наважку тканини на холоді 0,2 Н розчином HClO_4 чи знижують температуру нагрівання зі 100 до 70 °C і скорочують термін нагрівання з 20 до 10 хв.

Таблиця 1. Вплив тималіну (2) і тимогену (3) на вміст ДНК і РНК у Т-лімфоцитах селезінки мурчаків при сенсibiliзації та анафілактичному шоку

№	Інтактні тварини		Сенсibiliзовані тварини		Тварини з викликанням анафілактичним шоком	
	ДНК	РНК	ДНК	РНК	ДНК	РНК
1	$3,6 \pm 0,4$ $P_{1,2} > 0,05$	$3,7 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,5^*$ $P_{1,2} > 0,05$	$8,1 \pm 0,4^*$ $P_{1,2} < 0,05$	$5,4 \pm 0,5^*$ $P_{1,2} < 0,05$	$5,6 \pm 0,4^*$
2	$4,2 \pm 0,4$ $P_{1,3} > 0,05$	$4,4 \pm 0,6$	$10,3 \pm 0,9$ $P_{1,3} < 0,05$	$10,7 \pm 0,7$	$7,1 \pm 0,6$ $P_{1,3} < 0,05$	$7,4 \pm 0,7$
3	$4,9 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,7$	$12,6 \pm 0,8$	$12,5 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,5$

1 – тварини, які не отримували препарати; * – імовірність розходжень між показниками в групі тварин, які не отримували препарати; $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Дослідження показали, що розвиток гіперчутливості негайного типу супроводжується збільшенням кількості ДНК у 2,2 раза і становить $7,8 \pm 0,5$ пг на клітину порівняно з $3,6 \pm 0,4$ пг у інтактній групі тварин.

У групі тварин, які перенесли анафілактичний шок, кількість ДНК у клітині була вища, ніж у інтактної, $5,4 \pm 0,3$ пг, однак суттєво нижче, ніж у сенсibiliзованих тварин.

У мурчаків, які отримували препарати, відмічалось підвищення вмісту ДНК у Т-лімфоцитах селезінки (табл. 1). Найбільший стимулюючий ефект мав тимоген. Так, в інтактній групі тварин застосування тимогену призводило до збільшення вмісту ДНК на 40 %, а в групі сенсibiliзованих тварин – на 190 %, у тварин з анафілактичним шоком – на 100 %. Така сама динаміка у тималіну, але з меншими показниками (табл. 1). Отже, і в цьому разі підтверджується, що збільшення вмісту ДНК при сенсibiliзації та анафілактичному шоку свідчить про активацію проліферативних процесів в імункомпетентних клітинах. Застосування препаратів тимуса (тималіну, тимогену) суттєво впливає на ці процеси. Однією з головних властивостей ядерця є синтез рибосомальної РНК. Відомо, що існує залежність між об'єктом

ядерець і концентрацією в них РНК, з одного боку, і кількістю РНК і білка в цитоплазмі з іншого боку.

Отже, розміри, число ядерця можуть бути показниками метаболічних процесів у клітинах, а також критерієм активності ділянок ДНК, які кодують рибосомальні гени за кількісними показниками їхніх продуктів [6, 7]. Характер змін морфологічних показників ядерця відповідає змінам РНК у клітині. Так, сенсibiliзація тварин конячою сироваткою призводить до збільшення концентрації РНК в 1,2 раза. Така сама залежність і при застосуванні препаратів з тимусу.

Висновки. Розвиток алергічних реакцій негайного типу супроводжується змінами імунореактивності лімфоїдних клітин.

Зміна функціональної активності Т-лімфоцитів при сенсibiliзації та анафілактичному шоку є наслідком експресії генетичної інформації (процесів редуплікації та транскрипції).

Збільшення кількості ДНК при сенсibiliзації та анафілактичному шоку свідчить про активацію проліферативних процесів в імункомпетентних клітинах.

Сенсibiliзація тварин конячою сироваткою приводить до збільшення відношення РНК/ДНК у Т-лімфо-

цитах з 1,04 в інтактної групи тварин до 2,28 у сенситивізованих, що показує на активацію процесів транскрипції в Т-лімфоцитах.

Застосування тималіну й тимогену приводить до активації генетичного апарату клітин, а це у свою чергу активує метаболізм імунотетентних клітин, що приводить до проліферації та диференціації Т-лімфоцитів. Найбільшу активність має тимоген.

УДК 616.34+577.115

1. Свенсон К., Узбестер П. // Клетка. – М., 1980. 2. Де Робертис Е., Новинский В., Сазс Ф. // Биология клетки ядра. – М., 1974. 3. Ченцов Ю.С., Поляков В.Ю. // Ультраструктура клеточного ядра. – М., 1974. 4. Зегенбуш Г. // Молекулярная и клеточная биология. – М., 1982. – Т. 1, 2. 5. Кучеренко М.С. // Биохимия нуклеиновых кислот. – К., 1976. – С. 190–204. 6. Хесин Л.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. – М., 1967. – С. 14. 7. Zweite L., Dex.V. // Activity of bith mouse and Chinese hamster ribosomal RNA genes in somatic cell hybrids // Exptl. cell Res. – 1979. – Vol. 123. – P. 424–428.

Надійшла до редколегії 10.04.04

В.А. Ковальова, інж., Л.І. Кузьменко, асп.,
Ю.В. Степанов, канд. біол. наук, Л.І. Остапченко, д-р біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ТИРОЗИНОВОЇ ПРОТЕЇНКИАЗИ В МЕМБРАНАХ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ВИРАЗКИ

Досліджено активність тирозинової протеїнкінази в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів у нормі й за дії різних ульцерогенних чинників. Показано, що у тварин з ерозивно-виразковими ушкодженнями слизової, викликаними аспірином, етанолом і стресом, активність тирозинової протеїнкінази змінюється по-різному: при аспіриновій і етаноловій виразках вона зменшується, а при стресовій підвищується.

Activity of tyrosine protein kinase in stomach mucous cell membranes in rats under different ulcerogenic factors action was investigated. It was shown that activity of tyrosine protein kinase changes in different ways in animals with erosive-ulcerous damages of mucous caused by aspirin, ethanol and stress. Under aspirin and ethanol ulcers it decreases but it increases under stress model.

Протягом останніх десятиріч у сфері інтенсивних наукових досліджень знаходиться патологія органів травлення. Виразкова хвороба шлунка – найпоширеніше захворювання органів травлення. Виразковий процес у шлунка є кінцевим етапом складного захворювання, у патогенез якого включені центральна нервова система, загальна ендокринна система, біогенні аміни та поліпептиди травної системи. Крім того, у механізмах утворення виразки беруть участь місцеві агресивні фактори й порушення механізмів захисту епітелія слизової оболонки [1].

Сьогодні виявлено суттєві зміни у функціонуванні тирозинових протеїнкіназ при патології органів травлення. Дослідження цих ферментів викликає певний інтерес, тому що тирозинові протеїнкінази залучені до здійснення важливих метаболічних процесів, зокрема ростових функцій, передачі внутрішньоклітинних сигналів, імунної відповіді тощо. Активність тирозинових протеїнкіназ дуже часто асоціюється з проліферацією пухлин.

Метою роботи було дослідити активність протеїнкіназ у мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів в умовах дії різних ульцерогенних чинників.

Матеріали та методи. Експерименти проводили на щурах-самцях з масою тіла 150–200 г. Тварин було поділено на 4 групи (по 10 тварин у кожній). 1 група – контроль; 2, 3, 4 групи – щури, в яких моделювали аспіринову, етанолову та стресову виразку [2]. Визначення активності тирозинових протеїнкіназ проводили за рекомендаціями [3]. Про активність тирозинових протеїнкіназ судили за включенням $^{32}\text{P}_n$ із ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -АТФ) в ангіотензин II.

Результати та їх обговорення. Тирозинові протеїнкінази – це бісубстратні ферменти, які каталізують переніс фосфатних груп від АТФ на Туг залишки білкових субстратів. Фізіологічна активність рецепторних тирозинових протеїнкіназ забезпечується компенсаторною дією системи рецепторних тирозинових фосфатаз, яка спрямована на автофосфорильовані тирозинові залишки, що входять до структури каталітичних доменів рецепторів ЕРФ. Таким чином, зв'язування рецепторних тирозинових протеїнкіназ цілком залежить від ступеня їх автофосфорильовання [4].

Надмірна чи невідповідна продукція гормонів, лігандів (ростових факторів), рецепторів, тирозинових протеїнкіназ або їхніх субстратів може призводити до надлишкового росту клітини. Будь-яке помилкове збільшення активності тирозинових протеїнкіназ у рамках сигнальної трансдукції

викликає дисбаланс системи контролю росту нормальних клітин, що спричиняє клітинну трансформацію [5].

Відомо, що активація ЕРФ-рецепторних тирозинових протеїнкіназ відбувається за міжмолекулярним механізмом шляхом взаємодії з цитокінами родини ЕРФ. ЕРФ регулює регенерацію епітеліоцитів слизової оболонки шлунка. Зниження секреції ЕРФ веде до підвищення секреції НСІ.

Визначення активності указаної кінази показало, що за умов розвитку різних експериментальних моделей виразок шлунка, його активність змінюється по-різному: при аспіриновій і етаноловій моделях виразки шлунка спостерігалось зниження активності тирозинової кінази, а при стресовій активність ферменту зростає (рис. 1).

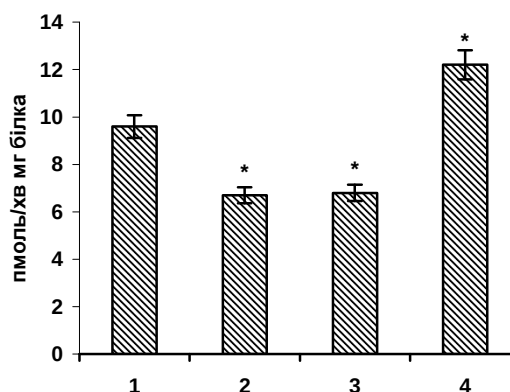


Рис. 1. Активність тирозинової протеїнкінази в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів при різних експериментальних моделях виразки (1–контроль; 2–аспірин; 3–етанол; 4–стрес)

Підвищення активності ЕРФ-рецепторних тирозинових протеїнкіназ при стресовій виразці може свідчити про виникнення порушень у взаємодії ЕРФ з його мембранними рецепторами. Крім того, виявлений ефект може бути пов'язаним із залученням інших механізмів, які викликають гіперактивацію ЕРФ-рецепторних тирозинових кіназ за умов розвитку даної патології. Серед таких механізмів, перш за все, можуть бути конформаційні перебудови структури ферменту, які можуть привести до порушення його взаємодії з субстратами фосфотрансферної реакції та з регуляторами його активності.

Порушення функціональної активності ЕРФ-рецепторних тирозинових протеїніназ, які виникають у результаті виразкоутворення, надають підстави очікувати дисбаланс тригерних внутрішньоклітинних сигнальних послідовностей, які мають місце при трансдукції сигналу від ЕРФ і його рецепторів. Відомо, що в процес передачі сигналу від ЕРФ і його рецептора є залученою ще одна регуляторна система – аденілатциклазна. Нами показана участь вищезгаданої системи в біохімічних механізмах розвитку різних за походженням виразок. Зміни цАМФ-залежної протеїніназної активності в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів цілком співпадають з порушеннями в функціонуванні мембранної тирозинкінази.

Можливою причиною зміни активності тирозинової кінази може бути посилення синтезу інтерлейкінів викликане утворенням виразки шлунка [6], які відіграють суттєву роль у регуляції активності саме цього ферменту. Іншим фактором, здатним впливати на активність даної кінази, може бути збільшення кількості амінокислот, зокрема ти-

розинових, у зв'язку з посиленням процесу деструкції білків за умов утворення виразки шлунка [7].

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що досліджувані протеїнінази є чутливим ланцюгом ув каскаді біохімічних реакцій, що є залученими до метаболічних шляхів які беруть участь у розвитку даного патологічного процесу.

1. Nardone G., d'Armiento F., Corso G. et al. // Gastroenterology. – 1994. – Vol. 107 (2). – P. 362–368.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К., 2001.
3. Boutin J.C. Tyrosine protein kinase assays // J. of Chromatogr. – 1996. – Vol. 684 – P. 179–199.
4. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности // Под ред. С.Е. Северина, М.Н. Кочетковой. – М., 1985. – С. 287.
5. Dariach J., Bara M., Guet Betra A. Magnesiura et cancer // Med. et nutr. – 1993. – Vol. 29, № 2. – P. 75–79.
6. Nishisaki H., Sakamoto C., Konda Y. et al. Effect of antiulcer drugs on phosphatidylcholine synthesis in isolated guinea pig gastric glands // Dig Dis Sci. – 1992. – P. 1593–1698.
7. Nishisaki H., Sakamoto C., Konda Y. et al. Effect of teprenone and H2-receptor antagonists on phosphatidylcholine synthesis in the isolated guinea pig gastric glands // Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi. – 1990. – Oct. – P. 2352–2357.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 595.773.4

О.В. Жук, інж., І.А. Козерецька, канд. біол. наук

АНАЛІЗ НОВОЇ *miniature* (m^{42})-ПОДІБНОЇ ЛІНІЇ У *DROSOPHILA VIRILIS* ЗА ПЕРЕРОЗПОДІЛОМ КОПІЙ РЕТРОТРАНСПОЗОНУ *PENELOPE* ТА ДИСГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Описано нову крилова *miniature*-подібну мутацію, яку було виділено серед нащадків схрещувань ліній 9 і 160 *Drosophila virilis* унаслідок гібридного дисгенезу, який виникає при схрещуванні цих ліній за рахунок активації ретротранспозону *Penelope*. У новій лінії визначено розташування сайтів *Penelope* з метою порівняння їх з розподілом у лінії 160, що є батьківською. Установлено цитотип лінії, передбачено причино виникнення мутації та ймовірну локалізацію локусу *miniature* на цитологічній карті хромосом.

New miniature-like mutant m^{42} was observed in *Drosophila virilis*. It was received by hybrid dysgenesis process, which is induced by mobilization of *Penelope* retrotransposon in dysgenic traits of strains 9 and 160. We have compared the distribution of *Penelope* sites in 160 and m^{42} chromosomes by *in situ* hybridization and have tested strain m^{42} for ability to induce hybrid dysgenesis in dysgenic traits. It was suggested cause of mutation appearance and most probable localization of *miniature* locus in *Drosophila virilis*.

Порушення функції генів, що відповідальні за ріст, диференціацію та розвиток клітин призводить до появи особин з різноманітними порушеннями, дослідження яких дозволяє встановити роль того чи іншого локусу в процесах формування організму. Існують загальновізані методи отримання мутантів у *Drosophila*, кожний з яких має свої переваги та недоліки. Явище гібридного дисгенезу є ефективним методом, який активно використовують для виділення широкого спектра мутацій. Закономірності переміщення, активації та розмноження Р-елемента *Drosophila melanogaster* вивчаються з 1977 року і є сьогодні найкраще вивченими на генетичному та молекулярному рівнях. Відомо, що основними ознаками гібридного дисгенезу, викликаного Р-М системою нестабільності, є збільшення частоти мутацій у нащадків, рекомбінація у самців та високий рівень стерильності особин обох статей унаслідок редукції клітин зародкового шляху [1]. У *Drosophila virilis* було описано декілька родин мобільних генетичних елементів, але ключовим елементом, що здатний викликати класичну картину гібридного дисгенезу та мобілізувати інших під час своєї активації є ретротранспозон *Penelope* [2]. Нині вивчено його структуру, визначено спосіб розмноження, але невідомо, яким чином відбувається регуляція його активності та вплив на копії мобільних елементів інших родин. Отримання мутацій у даній системі гібридного дисгенезу дозволяє дослідити закономірності їх виникнення та прослідкувати подальшу поведінку мобільних елементів в новоутворених лініях.

За допомогою системи нестабільності, пов'язаної з функціонуванням *Penelope*, нами отримано низку мутацій. Одна з них характеризується ознаками, що загалом відповідають відомій у *Drosophila melanogaster* мутації гену *miniature* (m), але також має свої, описані вперше, особливості. Відомо, що *miniature* *Drosophila melanogaster* входить до m - du генного комплексу, продукту якого є трансмембранні білки кутикули, що забезпечують формування кутикули й необхідні для диференціації епітеліальних клітин крила [3]. У даній роботі розглянуто характеристики мутантного алелю m^{42} , розподіл копій ретротранспозону *Penelope* та особливості ефектів, що виникають у дисгенних схрещуваннях отриманої лінії.

Матеріали та методи. Лінії *Drosophila virilis*. У роботі використані лабораторні лінії *Drosophila virilis*: 9 – лінія дикого типу з М-подібним цитотипом (популяція м. Батумі); 160 (маркована рецесивними мутаціями генів *broken* (b : 2–188,0), *gap* L2 (gp L2: 3–118,5), *cardinal* (cd : 4–32,2), *peach* (pe : 5–203,0) та *glossy* (gl : 6–1,0) по всіх аутосомах) є лінією з сильним Р-подібним цитотипом; лінія m^{42} , що містить *miniature*-подібний мутантний алель. Лінії підтримували шляхом масових схрещувань при температурі 25 °С на стандартному середовищі [4].

Наявність гонадного дисгенезу (gonadal dysgenesis – GD – assay). Для встановлення цитотипу лінії використовували схрещування двох типів: А-тест – схрещування самок лінії з М-подібним цитотипом (9) із самцями досліджуваної, та А*-тест – схрещування самок лінії, що тестується, із самцями лінії з сильним Р-подібним цитотипом (160). Отже, М-цитотип відповідає високому рівню редукції

© О.В. Жук, І.А. Козерецька, 2005

гонад в А*-тесті й низькому – в А-тесті, Р-цитотип – навпаки. Нащадків від дисгенних схрещувань розсаджували по пробірках на 7–10 діб для досягнення повного статевого дозрівання. Далі аналізували наявність редукції гонад шляхом їхнього виділення, оцінюючи ступінь розвитку візуально. Ураховували лише повну редукцію яєчників і сім'яників. Використовували особин лінії 9, m^{42} , 160 для визначення фонового рівня редукції гонад. Відсоток GD обчислювали за такою формулою:

$$\%GD = 1/2 \%GD(1) + \%GD(2),$$

де: $\%GD(1)$ – відносна кількість особин з одним редукованим яєчником/сім'яником у відсотках від загальної кількості; $\%GD(2)$ – відносна кількість особин з двобічною редукцією гонад у відсотках від загальної кількості [1].

Помилку частки (m) визначали за формулою

$$\sqrt{\frac{\%GD \times (100 - \%GD)}{N}}$$

де N – загальна кількість проаналізованих особин.

Довірчий інтервал розраховувався (для рівня значущості 0,95) як: $m \pm 1,96 (N > 30)$

Гібридизація in situ на політенних хромосомах. Для приготування давлених препаратів політенних хромосом видаляли слинні залози личинок третього віку, що розвивались при температурі 18 °С, у краплі 45 %-ї оцтової кислоти. Біотин-мічені фрагменти ретротранспозону *Penelope* отримували шляхом нік-трансляції [5]. Локалізацію проводили за цитогенетичними картами політенних хромосом *Drosophila virilis* [6].

Результати та обговорення. Загальна характеристика. Нова крилова мутація була виділена серед нащадків схрещувань ліній 9 і 160 *Drosophila virilis* унаслідок гібридного дисгенезу, що виникає при схрещуванні цих ліній за рахунок активації ретротранспозону *Penelope*. З'ясовано, що мутація є рецесивною, зчепленою зі статтю, гомозиготи життєздатні. Основним проявом є зменшення у розмірі пластинки крила приблизно в 1,4 рази порівняно з диким типом у зв'язку зі зменшенням розміру клітин, що формують крило. Межі клітин крила мутантних особин залишаються видимими у світловому мікроскопі, на відміну від крила мух дикого типу. Порушується орієнтація крилових волосків, крила менш прозорі, темніші, край крила має хвилясту форму, кут між жилками L2 і L5 зменшується. Мутантні особини мають розставлені крила на 45 градусів щодо повздовжньої осі тіла, однак пенетрантність цієї ознаки становить близько 50 %. Досліджена мікроструктура крилових жилок мутантів m^{42} . Виявлені темні, округлі або невірної форми структури (*nvs* – *neomorphic vein structures*), що відсутні в особин дикого типу. Продемонстровано, що *nvs* являють собою потовщення кутикули крила [7].

Гібридизація in situ на політенних хромосомах. Відомо, що гібридний дисгенез призводить до підвищення частоти мутацій унаслідок вбудовування нових копій мобільного елемента та неточного вирізання старих з порушенням нормального функціонування генів. Дисгенні схрещування супроводжуються перерозподілом сайтів на хромосомах за рахунок рекомбінаційних процесів, що може змінювати як роботу генів, так і активність самого транспозону. Тому було цікавим перевіри-

ти наявність і розподіл сайтів ретротранспозону *Penelope* в лінії m^{42} . За результатами гібридизації *in situ* на політенних хромосомах лінії m^{42} було виявлено 20 чітких копій *Penelope*, тоді як у лінії 160 – 36. Порівнюючи картину розташування копій *Penelope* в лінії m^{42} та 160, у першу чергу слід відмітити відсутність копій ретротранспозону в X хромосомі m^{42} лінії. Тобто, поява мутації в локусі *miniature* ймовірно пов'язана або з вбудовуванням іншого мобільного елемента, що активується внаслідок експресії *Penelope*, або внаслідок вирізання саме *Penelope* з певного сайту X хромосоми. Лінія 160 має 6 місць розташування цього ретротранспозону, це ділянки 8A, 8C, 9C, 10A, 11A і 11CD. За попередньою локалізацією мутантний локус картований у X-хромосомі на відстані 28 одиниць генетичної карти від локусу *white* [7]. Таким чином, локалізація локусу збігається з сайтами *Penelope* в 160 лінії, і найбільша ймовірність його розташування в ділянках 10A та 11A. Необхідно відмітити також, що видимі перебудови в X хромосомі лінії m^{42} відсутні.

Загальна картина розподілу ретротранспозону в інших хромосомах в m^{42} подібна до такої в 160 лінії, вони мають 12 спільних сайтів. Один з них – 40A – є характерним лише для ліній з Р-подібним цитотипом, тобто є ймовірною активною копією [8].

Дослідження рівня редукції гонад. Наявність активних копій *Penelope* в m^{42} була підтверджена за її поведінкою у дисгенних схрещуваннях, тобто при визначенні цитотипу лінії за допомогою тесту на редукцію гонад. Виявилось, що самки m^{42} мають підвищений рівень редукції гонад поза дисгенними схрещуваннями (9,09 %), що є характерним для ліній із сильним Р-подібним цитотипом. Однак, в дисгенних схрещуваннях ця лінія веде себе нетипово: редукція сім'яників у нащадків від $9 \times m^{42}$ складає всього 12,5 %, а редукція яєчників спостерігається у 71,11 % особин. У схрещуваннях самок лінії m^{42} з самцями лінії 160 (А*-тест) редукція гонад самців повністю репресується, однак у самок залишається високою (табл.1). Така картина не характерна для ліній, які здатні викликати гібридний дисгенез внаслідок активності *Penelope*. Цей ефект може бути пов'язаний як з перерозподілом мобільних елементів геному, їхніх активних та репресорних копій, так із плейотропною дією досліджуваної мутації. Відомо, що геном 160 лінії містить копії мобільних елементів різних родин, але з них лише ретротранспозон *Penelope* здатний викликати явище гібридного дисгенезу, що супроводжується мобілізацією і інших елементів [2]. Також зрозуміло, що не всі копії *Penelope* є активними, має значення повнорозмірність, ймовірно, сайт розташування та інші, ще не вивчені, фактори. В літературі вказано і на існування особливих дефективних копій, які не викликають дисгенних ефектів, однак репресують інші активні МЕ тієї ж родини [9]. Таким чином, лінія m^{42} , отримана нами в результаті дисгенезу, внаслідок процесів мобілізації і переміщення рухливих елементів може бути несподіваною з точки зору патерну, функціонування *Penelope* в її геномі та особливостей прояву гібридного дисгенезу, який вона викликає. До того ж, сам ген *miniature* задіяний у процеси регуляції формування клітин і не можна виключити його впливу й на розвиток гонад у самок.

Таблиця 1. Рівень редукції гонад в лініях 9, 160, m^{42} у різних типах дисгенних схрещувань

Лінія	Фоновий рівень, %		А-тест, %		А*-тест, %	
	самки	самці	самки	самці	самки	самці
9	0	0	–	–	–	–
160	21,77 ± 8,09	0	27,18 ± 8,72	47 ± 9,78	–	–
m^{42}	9,09 ± 5,64	0	71,11 ± 8,88	12,5 ± 6,49	62,3 ± 9,51	0

Висновки. По-перше, лінія m^{42} , отримана в результаті гібридного дисгенезу, є лінією зі слабким Р-подібним цитотипом. По-друге, характер гібридного дисгенезу, який вона викликає в дисгенних схрещуваннях є незвичним для інших подібних ліній. По-третє, визначена ймовірна генетична локалізація локусу *miniature* у *Drosophila virilis*.

Автори висловлюють подяку О.С. Зеленцовій (Інститут молекулярної біології ім. Енгельгардта, м. Москва), І.С. Губенко (Інститут молекулярної біології та генетики, м. Київ) за підтримку в забезпеченні реактивами й матеріалами для проведення досліджень.

УДК 577.391:311

1. Kidwell M.G., Kidwell J.F., Sved A. // Genetics. – 1977. – Vol. 86. – P. 813–833.
2. Evgen'ev M., Zelentsova H., Shostak N. et al. // Genetics. – 1997. – 94. – P. 196–201.
3. DiBartolomeis S.M., Akten B., Genova G. et al. // Mol. Genet. Genomics. – 2002. – Vol. 267. – P. 564–576.
4. Roberts D.B. *Drosophila a practical approach*. – Oxford, 1986.
5. Lim J.K. // Drosophila Inf. Serv. – 1993. – Vol. 72. – P. 73–77.
6. Gubenko I., Evgen'ev M. // Genetica. – 1982. – Vol. 65. – P. 127–139.
7. Kozaretska I., Gubenko I., Gorb S. // J. of Morphology. – 2004. – Vol. 219. – P. 270–275.
8. Zhuk O. // Thesis on conference on molecular biology and genetics, Kyiv, Ukraine, 2003. – K., 2003.
9. Marin L., Lehmann M., Nouaud D. et al. // Genetics. – 2000. – Vol. 155. – P. 1841–1854.

Надійшла до редколегії 30.09.04.

В.О. Чайка, асп., Л.І. Гавриш, канд. біол. наук,
О.В. Скопенко, канд. біол. наук, Є.А. Строцька, інж.

УЧАСТЬ H_3 РЕЦЕПТОРА У ФУНКЦІОНУВАННІ МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНИХ ФЕРМЕНТІВ ПАРІЄТАЛЬНИХ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ВИРАЗКИ

Установлено, що агоніст H_3 гістамінового рецептора R-альфа-метилгістамін знижує активність 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФази в плазматичних мембранах парієтальних клітин слизової шлунка щурів за умов стресової моделі виразки. Введення антагоніста H_3 рецептора тіопераміда приводило до зростання активності обох ферментів.

It was shown that H_3 -receptor agonist (R)-alpha-methylhistamine decrease of 5'-nucleotidase and Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase activity in plasma membrane of rat gastric parietal cells under the experimental stress – induced stomach ulcer formation. The histamine H_3 -receptor antagonist, thioperamide, enhanced 5'-nucleotidase and Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase activity in above-stated cells.

Вступ. Сьогодні відомо, що виразка шлунка – хронічне рецидивне захворювання, що розвивається у результаті розладу нейрогуморальної, ендокринної регуляції, порушення взаємин факторів захисту й агресії слизової оболонки, при цьому в патогенез залучаються кислотний і судинний фактори, а також імунна системи [1]. Особливого значення при вивченні патогенезу захворювання надається парієтальним клітинам слизової, що є основним кислотопродукуючим елементом. Відомо, що функціональна діяльність даного типу клітин контролюється багатьма нейроендокринними сигналами, серед яких особливо важливими є неврональна стимуляція через блукаючий нерв і місцеву невральне сплетення; ендокринна стимуляція через гастрин, що вивільняється з G-клітин і соматостатин, що виділяється D-клітинами; паракринна стимуляція шляхом місцевого виділення гістаміну з ентерохромофіноподібних (ECL) клітин [2]. Останнім часом велику зацікавленість при розробці противиразкових препаратів надається ролі H_3 гістамінового рецептора, який представлений як у центральній та ентєральній нервовій системах, так і на мембранах D-, G- і ECL-клітин і може опосередковано регулювати кислотну продукцію [3]. Дослідження механізмів впливу H_3 -сигналів на структурно-функціональний стан мембран парієтальних клітин допоможе краще оцінити його потенційну терапевтичну дію.

У нашій експериментальній роботі для характеристики стану мембран досліджуваних клітин було обрано ферменти – 5'-нуклеотидазу та Na^+, K^+ -АТФазу. Метою цієї роботи було дослідити, як змінюється активність 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФази в мембранах парієтальних клітинах слизової оболонки шлунка за умов активації H_3 рецептора при експериментальній моделі виразки шлунка.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на нелінійних щурах (самцях) масою 180–220 г. Стрессова виразка викликала за методикою С.Д. Гройсмана і Т.Г. Каревіної ("імобілізаційний стрес") [4]. Парієтальна

клітини виділялись за описаною методикою (ферментативне відщеплення клітин слизової з наступним ультрацентрифугуванням на сахарозо-фікольному градієнті) [5]. R-альфа-метилгістамін і тіоперамід (специфічні агоніст і антагоніст H_3 рецептора, відповідно) вводились внутрішньочеревно в дозах 0,5 і 1,0 мг/кг на другий день формування експериментальної виразки.

Фракцію плазматичних мембран (102 000g) отримували на градієнті сахарози (26 %) за рекомендаціями [6]. Активність 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФази визначали за описаною методикою [7]

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента при $P < 0,05$

Результати досліджень та їх обговорення. Відомо, що при розвитку виразкового захворювання зростає активність 5'-нуклеотидази – ферменту, який слугує загальновідомим маркером запальних процесів. За умов розвитку виразки збільшується кислотна продукція у шлунку, що є пов'язаним з активацією H^+, K^+ -АТФази; активність Na^+, K^+ -АТФази при цьому також змінюється. Оскільки дані про вплив H_3 рецепторів на продукцію соляної кислоти клітинами слизової шлунка у щурів досить суперечливі, визначення активності вищезгаданих ферментів розширює можливість розуміння участі H_3 рецептора в патогенезі виразкової патології.

Дослідження участі H_3 рецептора в роботі 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФази мембран парієтальних клітин слизової оболонки шлунка проводились за умов розвитку стресової виразки. При цьому одній групі тварин з експериментальною стресовою виразкою внутрішньочеревно вводився R-альфа-метилгістамін, а іншій тіоперамід – специфічний агоніст і антагоніст H_3 рецептора відповідно.



Рис. 1. Активність 5'-нуклеотидази (1) і Na^+, K^+ -АТФази (2) мембран парієтальних клітин слизової оболонки шлунка за умов стресової моделі виразки шлунка у щурів

Було показано, що при введенні R-альфа-метилгістаміну активність 5'-нуклеотидази знижувалась на 20 %; активність Na^+, K^+ -АТФази зменшувалась на 37,5 %. Уведення тіопераміду підвищувало активність обох ферментів, при цьому активність 5'-нуклеотидази зростала на 30 %; Na^+, K^+ -АТФази – на 25 %. (рис. 1)

Отримані дані свідчать про залучення H_3 рецептора в регуляцію функціонального стану мембран парієтальних клітин за умов стресової моделі виразкової хвороби шлунка. Установлений факт може бути пов'язаним із пошкодженням структури мембрани, на що вказують зміни в її фосфоліпідному складі [8], білковій

компоненті (змінюється активність мембранозв'язаних ферментів), та з порушенням взаємодії білкових компонентів з фосфоліпідами.

Важливими є експериментальні дані з дослідження взаємодії H_3 рецептора з R-альфа-метилгістаміном, який є специфічним агоністом H_3 рецептора. Установлено, що активність зазначених ферментів, навпаки, знижується, що можна розглядати як можливий механізм нормалізації функціонального стану мембран парієтальних клітин слизової оболонки за умов експериментальної моделі виразки.

На підставі отриманих результатів можна зробити висновки про можливу цитопротекторну дію R-альфа-метилгістаміну. Ураховуючи літературні дані про можливу гальмівну дію на секрецію соляної кислоти [9] та наші дані, отримані під час досліджень, можна припустити ймовірний терапевтичний ефект R-альфа-метилгістаміну при лікуванні виразкової хвороби шлунка.

1. Ургин А.И., Сорокин А.В., Евдокимов В.Г. Избранные лекции по внутренним болезням. Ч. 7 // Медицинский вестник. – 2002. – № 5.
2. Yao X, Forte J.G. // Ann. Rev. Physiol. – 2003. – Vol. 65. – P103–131.
3. Coruzzi G., Morini G., Adami M., Grandi D. // J. Physiol. Pharmacol. – 2001. – Vol. 52. – № 4. – P. 539–553.
4. Гройсман С.Д., Каревина Т.Г. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс. – Рукопись деп. в ВИНТИ, № 452/79, 131 с.
5. Таиров М.М., Берсимбаев Р.И., Араутинская С.В., Салганик Р.И. // Биохимия. – 1983. – Т. 48, вып. 6. – С. 1035–1041.
6. Древалъ В.И., Финаин А.В., Баранник Е.А. // Укр. биохим. журн. – 1989. – Т. 61, № 2.
7. Рибальченко В.К., Коганов М.М. Структура і функції мембран. Практикум. – К., 1988.
8. Хилько Т.Д., Проценко Т.Л., Якубцова І.В., Чайка В.О. Вплив меланіну та ультрафіолетового випромінювання на фосфоліпідний склад слизової оболонки шлунка у щурів // Вісн. Київ. ун-ту. – 2003. – Вип. 41. – С.120–122.
9. Barocelli E, Chiavarini M, Ballabeni V. et al. // Br. J. Pharmacol. – 2001. – Vol. 133. – P. 243.

Надійшла до редколегії 30.09.04.

УДК: 577.3

О.М. Мельничук, асп., Д.М. Ноздренко, канд. біол. наук,
М.С. Мірошніченко, д-р біол. наук, проф.

ДИНАМІКА ВІДНОВЛЕННЯ ПАРАМЕТРІВ СКОРОЧЕННЯ М'ЯЗОВИХ ВОЛОКОН ПІСЛЯ ДІЇ РОЗЧИНУ КВЕРЦЕТИНУ

Досліджено відновлення динамічних параметрів скорочення скелетних волокон м'яза *m. tibialis* жаби *Rana temporaria* в ізотонічному режимі під впливом модульованої стимуляції, після дії розчину кверцетину. Виявлено, що в процесі відмивання кверцетину відбувається поступове лінійне збільшення генерації сили та ріст зміни довжини м'язових волокон. Установлено, що відновлення динамічних параметрів скорочення м'язового волокна відбувається асиметрично. Обговорено можливі молекулярні механізми, які зумовлюють виникнення зміни параметрів скорочення скелетного м'яза.

The recovery of the dynamic parameters of the skeletal muscle fibers contraction (from *m. tibialis* *Rana temporaria*) at isotonic condition during modulating stimulation under quercetin effect was studied. It was shown that washing after quercetin treatment leads to gradual linear increase of the strength generation and length changing. It was established that the recovery of the dynamic parameters of the skeletal muscle fiber contraction is asymmetric.

Вступ. Флавоноїдні сполуки охоплюють велику групу речовин природного походження та мають широкий спектр впливу на діяльність біологічних об'єктів, зокрема на роботу м'язових систем. Дані речовини знижують проникність капілярів і тонус гладенької мускулатури, розширюють судини, позитивно впливають на скоротливу функцію міокарда, здатні сповільнювати ритм серцевих скорочень і збільшувати їхню амплітуду [1–3]. Установлено, що кверцетин інгібує АТФазу саркоплазматичного ретикулума скінованих м'язів [4, 5]. Разом з тим, речовини флавоноїдної природи, зокрема кверцетин, стимулює роботу кальцієвих каналів саркоплазматичного ретикулума скінованих скелетних волокон жаби [6–8]. Кверцетин меншою мірою інгібує АТФазу міозину, ніж актоміозину, ефективно пригнічує суперпреципітацію актоміозину та скорочення міофібрил [4, 9]. Ефект інгібування більшою мірою виявляється на міофібрилах,

ніж на актоміозині. На молекулярному рівні флавоноїди впливають на функціональні властивості скоротливих білків м'язів [4, 9]. Це зумовлено конформаційними змінами, що відбуваються при зв'язуванні флавоноїдів з регуляторними ділянками поблизу активного центру головки міозину. У той же час, дія флавоноїдів на скелетні м'язи вивчена недостатньо.

У наших попередніх роботах досліджено динаміку скорочення м'язових волокон жаби в умовах модульованої електростимуляції під впливом розчину кверцетину в концентраціях від 10^{-5} до 10^{-4} моль/л. Було виявлено, що починаючи з третьої хвилини дії розчину кверцетину в концентраціях 10^{-4} моль/л м'язові волокна переходять в ізометричний режим. Усе це й стало підґрунтям для дослідження динамічних змін параметрів скорочення м'язових волокон під час відмивання розчину кверцетину фізіологічним розчином.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на пучках волокон м'яза *m. tibialis* жаби *Rana temporaria*. Нативні волокна виділяли механічним шляхом після декапітації піддослідних тварин. Ізольоване м'язове волокно інкубували протягом 2 год в інтервалі $(+3 \pm 1)^\circ\text{C}$ для адаптації до подальших умов експерименту. Фіксацію м'язового препарату здійснювали за допомогою алюмінієвих затискачів зміцнених нейлоновими лігатурами. Досліджувані об'єкти розміщали в плексигласовій камері з постійно циркулюючим фізіологічним розчином Рінгера (NaCl 67,5 мл, KCl 2,95, MgCl_2 0,08, глюкоза 5,18, CaCl_2 2,8 мл, HEPES 2,763 г). Один кінець волокна приєднували до ємнісного датчика сили, чутливість якого дорівнює 0,1 г на 1000 мВ. Датчик сили має бути жорстко зафіксований на мікроманіпуляторі з кроком 0,8 мкм, що дозволяє прикладати зовнішнє навантаження шляхом натягу волокна. Другий кінець препарату жорстко фіксували до датчика довжини. Стимуляцію здійснювали за допомогою двох срібних електродів, розміщених у дослідницькій камері на відстані 4 мм по обидва боки м'язових волокон. Стимуляцію проводили прямокутними імпульсами тривалістю 2 мс з частотою 30 Гц. Період релаксації становив 3 хв. Стимуляцію задавали з комп'ютера за допомогою ге-

нератора імпульсів. Усі досліджувані процеси контролювали візуально через осцилографи й фіксували на комп'ютері. Циркулюючий фізіологічний розчин Рінгера подавали в камеру через систему трубок. За отриманими даними будували криві залежності сили скорочення та зміни довжини м'язового скорочення в результаті відмивання розчину кверцетину з концентрацією 10^{-4} моль/л.

Результати досліджень та їх обговорення. На рис. 1 наведено результати зміни сили скорочення та довжини м'язових волокон у результаті відмивання розчину кверцетину з досліджуваного об'єкта. Відмивання здійснювалося циркулюючим фізіологічним розчином Рінгера за модульованої стимуляції частотою 30 Гц. Кожна із зображених на рисунку кривих є результатом усереднення 10–15 окремих дослідів. Верхній ряд кривих показує зміну амплітуди довжини м'язових волокон унаслідок відмивання кверцетину. Нижня група кривих відображає зміну сили м'язового скорочення при відмиванні кверцетину, а кожна з груп кривих – процес скорочення скелетних волокон після припинення використання розчинів кверцетину вказаної концентрації. Час релаксації становив 3 хв.

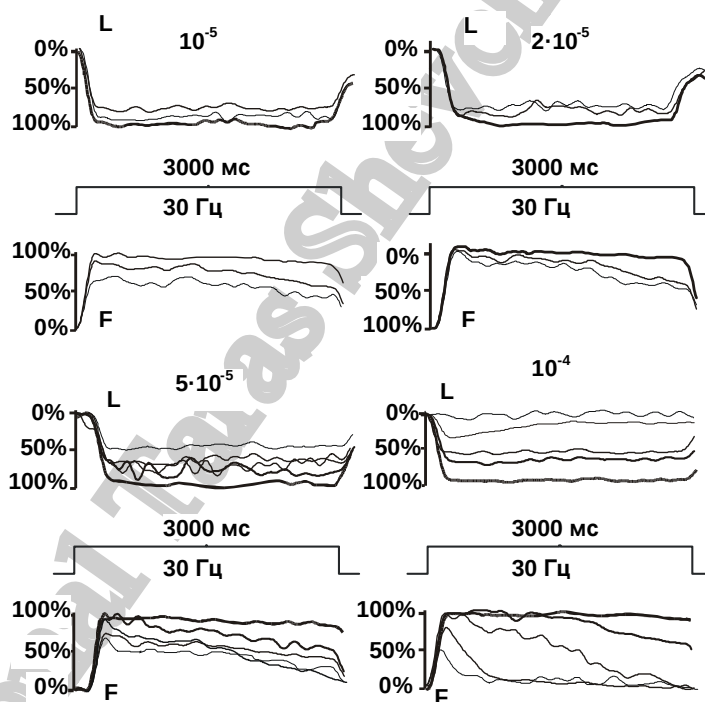


Рис. 1. Динамічні характеристики скорочення м'язового волокна в циркулюючому розчині Рінгера після використання розчинів кверцетину. Частота стимуляції 30 Гц, тривалість 3 с. L – зміна довжини м'яза; F – зміна генерації сили. По осі абсцис позначено збільшення сили й амплітуди довжини м'язового скорочення до 50 і 100 % від максимального рівня внаслідок відмивання розчинів кверцетину

При відмиванні розчину кверцетину 10^{-5} моль/л не спостерігали значних конформаційних змін кривих міотичної відповіді. Сила й довжина м'язового скорочення плавно та поступово виходили на початковий рівень і на 9-й хвилині досягали 100 %-го рівня. У разі припинення дії розчину флавоноїду в концентрації $2 \cdot 10^{-5}$ (початок процесу відмивання) довжина й сила м'язового скорочення виявляли незначні флуктуаційні спалахи рівнів генерації сили на тетанічній ділянці скорочення (до 6-ї хвилини відмивання). Починаючи з 6-ї хвилини ек-

перименту відмічали поступове відновлення динамічних характеристик скорочення які також досягали 100 %-го рівня (9-та хвилина). Сила м'язового скорочення відновлювалась інтенсивніше порівняно з параметром довжини. Відмивання наступної концентрації кверцетину – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л викликало значне лінійне підвищення сили й довжини м'язових волокон на протязі усього процесу відмивання, з появою численних флуктуацій обох досліджуваних параметрів з 3-ї по 12-ту хвилину та швидким відновленням вихідних характери-

стик, починаючи з 12-ї хвилини досліду. Слід зазначити, що амплітуда сили скорочення зростала швидше порівняно зі зміною довжини м'язового волокна. На 16-й хвилині експерименту відбувалося повне відновлення показників сили й довжини м'язового волокна до їхнього вихідного рівня. Процес повного відновлення параметрів скорочення скелетного волокна при відмиванні розчину кверцетину в концентрації 10^{-4} моль/л відбувався також дуже повільно. Повне відновлення параметрів скорочення відбувалось тільки після 15-ї хвилини досліду, з проясом численних флуктуацій рівнів динамічних параметрів скорочення великої амплітуди та тривалості.

У результаті проведених експериментів було встановлено, що відмивання розчину кверцетину викликає повне відновлення параметрів скорочення м'язових волокон. Поновлення параметрів м'язового скорочення відбувається асиметрично. Отримані експериментальні результати можна пояснити в рамках попередніх досліджень на молекулярному рівні, що стосувалися впливу флавоноїдів на АТФазу активності міозину й актоміозину. У більшості проведених експериментів [9] невеликі концентрації флавоноїдів ($10\text{--}20$ мкмоль/л) кверцетину та рутину активували АТФазу актоміозину. Подальше збільшення концентрації флавоноїдів викликало поступове інгібування АТФази актоміозину. При концентрації кверцетину 150 мкмоль/л АТФаза активності актоміозину зменшувалась в $1,8$ раза, а міозину – в $1,33$ раза. У разі додавання до розчину актоміозину АТФ і дво валентних іонів (за фізіологічної іонної сили) відбувалась суперпреципітація актоміозину, яка є спрощеною моделлю м'язового скорочення. Кверцетин викликав значний інгібуючий ефект суперпреципітації актоміозину в інтервалі концентрацій від 10 до 50 мкмоль/л. При 50 мкмоль/л

кверцетину ступінь преципітації актоміозину зменшувалась більше ніж у чотири рази [9]. Показано, що навіть додавання невеликих концентрацій флавоноїдів (менше 10 мкмоль/л) викликає пригнічення скорочення міофібрил, за концентрації 50 мкмоль/л кверцетин майже повністю інгібував скорочення міофібрил.

Проведені експерименти показали, що для повного відновлення параметрів м'язового скорочення після дії розчину кверцетину необхідно пропорційно збільшувати тривалість відмивання препарату в міру підвищення використаних концентрацій кверцетину. Показано, що поява флуктуаційних спалахів у процесі відновлення параметрів скорочення не відбувається за низьких концентрацій кверцетину, а з'являється при відмиванні розчинів кверцетину в концентраціях від $5 \cdot 10^{-5}$ до 10^{-4} моль/л. На нашу думку, механізм впливу кверцетину на механіку м'язового скорочення слід у першу чергу пов'язувати з впливом даної речовини на роботу АТФазних систем скелетних волокон.

1. Apisariyakul A., Chaichana N., Takemura H. – 1999. – Vol. 1, № 105 (1–2). – P. 129–138.
2. McKenna E., Smith J.S., Coll K.E. et al. // The American soc. for biochem. and molec. biol. – 1996. – Vol. 271, № 40. – P. 24517–24525.
3. Umarova F.T., Khushbactova Z.A., Batirov E.H. // Membr. cell. biol. – 1998. – Vol. 1, № 12 (1). – P. 27–40.
4. Middleton E., Kandaswami J.C., Theoharides T.S. // Pharmacol. Rev. – 2000. – Vol. 52, № 4. – P. 673–751.
5. Shoshan V., MacLennan D.H. // J. of biol. chem. – 1981. – Vol. 256, № 2 (25). – P. 887–892.
6. Kurebayashi N., Ogawa Y. // J. Muscle res. cell. motil. – 1986. – Vol. 1, № 7 (2). – P. 142–150.
7. Watras J., Glezen S., Seifert C. et al. // Life Sci. – 1983. – Vol. 17, № 32 (3). – P. 213–219.
8. Kurebayashi N., Ogawa Y. // J. Muscle res. cell. motil. – 1985. – Vol. 1, № 6 (2). – P. 189–195.
9. Zyma V.L., Miroshnichenko N.S., En Gin E. // Gen. physiol. biophys. – 1988. – № 7. – P. 165–175.

Надійшла до редколегії 10.09.04.

УДК: 577.3

Д.М. Ноздренко, канд. біол. наук, К.І. Богуцька, канд. біол. наук

ТЕМПЕРАТУРНО-ЗАЛЕЖНІ ЗМІНИ НЕЛІНІЙНОЇ ДИНАМІКИ М'ЯЗОВОГО СКОРОЧЕННЯ СКЕЛЕТНОГО ВОЛОКНА ЖАБИ

Досліджено процес приросту сили скорочення поодиноких волокон скелетного м'яза жаби в ізометричному режимі під впливом двокомпонентної модульованої стимуляції. Показано наявність нелінійного характеру проходження скоротливих процесів. Продемонстровано асиметрію часового плину в установленні рівноважного стаціонарного стану залежно від температури омиваючого розчину. Результати даної роботи дають можливість феноменологічно описати деякі властивості м'язової динаміки й можуть бути корисними надалі при створенні моделей м'язового скорочення.

We investigated the process of a force contractility gain of frog ordinary skeletal muscle fibers in isometric regime under effect of two-component modulating stimulation. Nonlinearity of the contractile processes was shown. We demonstrated the asymmetry of passing in time of equilibrium state establishing in dependence on circumambient solution temperature. Obtained data let us to describe some properties of muscle dynamics phenomenologically and can be used in formation of muscle contraction model in future.

Вступ. Різноманіття проявів і форм нелінійних ефектів м'язового скорочення ускладнюють їхнє всебічне дослідження [1–6]. Систематизація й облік гістерезисних ефектів, дозволяє висловити серйозні сумніви в універсальності теорії ковзання і стимулює пошук альтернативних рішень, що дозволяють сформулювати всебічне пояснення існуючих на сьогоднішній день експериментальних даних. Метою цієї роботи є дослідження нелінійних динамічних параметрів скорочення скелетного м'язового волокна при зміні температури омиваючого розчину.

Матеріали та методи. Досліди проводили на поодиноких волокнах *m. tibialis Rana temporaria*. З використанням сервосистеми, яка здійснювала дискретний контроль сили та довжини м'яза в будь-який момент скорочення препарату. Поодинокі волокна скелетного м'яза виділяли механічним шляхом. Нативні волокна розмі-

щували в дослідницькій камері з проточним фізіологічним розчином, температура якого контролювалась охолоджуючим пристроєм. Фіксація препарату здійснювалась з допомогою алюмінієвих затискачів та хірургічного клею. При проведенні експериментів застосовували модульований стимуляційний сигнал тривалістю імпульсу 2 мс, з частотою від 0 до 30 Гц, загальною тривалістю 4 с. Період релаксації м'язового волокна після кожної стимуляції становив 3 хв. Детальніше цю методику описано в роботі [4]. Кожна із зображених на рисунках кривих є результатом усереднення серії з 10 аналогічних експериментів.

Результати досліджень та їх обговорення. На рис. 1 показано, що незалежно від температури навколишнього розчину і напрямку скорочень, викликаних модульованою електростимуляцією, жорсткість м'язового

волокна зменшувалася порівняно з попереднім значенням у разі збігу напрямків поточного й наступного руху і збільшувалася при зміні напрямків поточного руху порівняно з попереднім. Важливим вважається той факт, що час досягнення силою свого максимального значення (ділянка Δt_3) не збігалася з часом досягнення стимулюючим сигналом максимальної частоти (ділянка Δt_1).

Часове запізнювання $\Delta t_3 - \Delta t_1$ лінійно зменшувалось з підвищенням температури омиваючого розчину. Зниження температури цього розчину викликало зміни в динаміці генерації сили тільки на дотетанічній ділянці скорочення, що виявлялось у збільшенні часу досягнення максимальної сили незалежно від характеру й частотних характеристик еферентного стимулюючого сигналу.

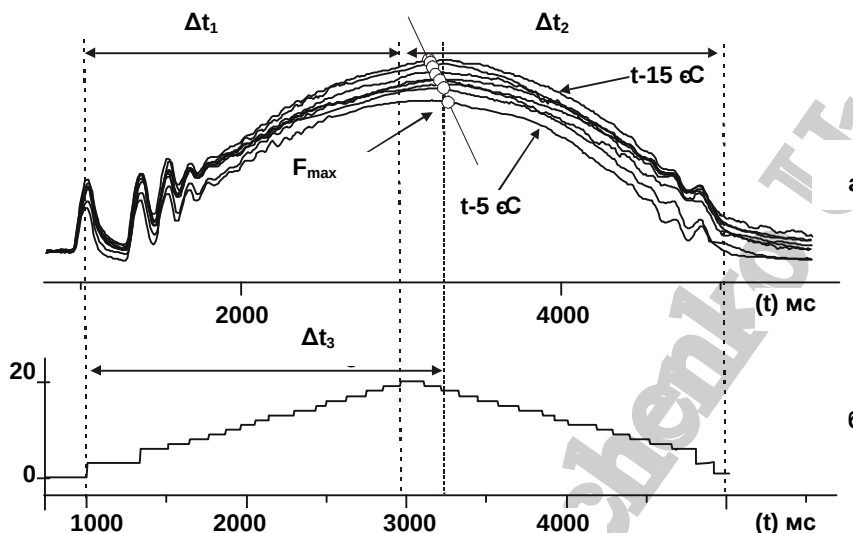


Рис. 1. Криві генерації сили при застосуванні модульованого стимулюючого сигналу максимальною частотою 20 Гц і змінюваній температурі омиваючого розчину від $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $15\text{ }^{\circ}\text{C}$: а) – криві зміни силової відповіді м'язового волокна. б) – часова й геометрична форма прикладеної електричної стимуляції. Δt_1 – час досягнення максимальної частоти стимулюючих імпульсів при наростаючому характері стимуляційного сигналу; Δt_2 – час зменшення частоти стимуляції від максимального значення до 0 Гц; Δt_3 – усереднений час досягнення силою максимального значення. Вертикальними лініями показано межі наростаючих і спадаючих фаз частоти стимуляційного сигналу. На кривій генерації сили крапками позначено моменти досягнення максимального значення силової відповіді для кожної із застосовуваних температур омиваючого розчину. Залежність часу досягнення максимальних значень сили від температури показано прямою, яка з'єднує крапки максимумів генерації сили кожної з кривих

У даному випадку фактично спостерігалась виражена асиметрія часового плину у встановленні рівноважного стаціонарного стану залежно від температури омиваючого розчину. Усе викладене може бути свідченням зв'язку динамічних властивостей м'яза з напрямком руху скорочення волокна та його температурою, а не тільки зі зміною частоти еферентної стимуляції. Ймовірно також, що при зміні температури в процесі скорочення волокна може виникати асиметрія інтенсивності виходу із саркоплазматичного ретикулума іонів кальцію, які, як відомо, відіграють важливу роль у регуляції процесів скорочення. Не виключено, що виявлена асиметрія плину дотетанічних ділянок скорочення – це результат резонансного структурного переходу в молекулах титину під впливом специфічної електростимуляції чи температурних змін. Наявність температурно-

залежних невизначеностей у функціонуванні елементів рухової системи робить актуальним пошук механізмів спрямованих на їх компенсацію.

1. Костюков А.И. // Нейрофизиология. – 1985. – Т. 17, № 3. – С. 334–443.
2. Серенко С.Г., Черкаський В.Л., Страфун С.С. // Нейрофизиология. – 1998. – Т. 30. – С. 212–235.
3. Тальнов А.Н., Костюков А.И. // Нейрофизиология. – 1994. – Т. 26. – С. 83–90.
4. Мірошніченко М.С., Залоїло І.А., Ноздренко Д.М., Прилуцький Ю.І. // Фізика живого. – 2001. – Т. 9, № 2. – С. 71–78.
5. Nozdrenko D.M., Miroshnichenko M.S. Hysteresis effects of isolated muscle fiber contraction with modulated stimulation at isometric condition: Proc. of the International symposium biological motility, Pushchino, Russia, 2004. – Pushchino, 2004. – С. 262–264.
6. Soroca V.M., Nozdrenko D.M. Dynamic of rat muscles motor unit contraction under the action of modulated stimulation: Proc. of the International symposium biological motility, Pushchino, Russia, 2004. – Pushchino, 2004. – P. 273–275.

Надійшла до редколегії 12.09.04

УДК 577.3

В.М. Сорока, асп., Д.М. Ноздренко, канд. біол. наук,
М.С. Мірошніченко, проф.

ДИНАМІКА СКОРОЧЕННЯ РУХОВОЇ ОДИНИЦІ М'ЯЗА ЩУРА ЗА ДІЇ ЧАСТОТНОЇ МОДУЛЬОВАНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ

Проведено пошук оптимального еферентного впливу для створення цільового руху – переміщення між двома рівноважними станами проти дії постійного зовнішнього навантаження. Показано, що спостерігається лінійна залежність характеру скорочення від частоти стимуляції до 60 Гц. При більших частотах стимуляції лінійність зникає. Результати досліджень, динаміки м'язового скорочення при зміні зовнішнього навантаження продемонстрували залежність динамічних і статичних характеристик м'яза від напрямку руху.

In work the search of the optimum efferential influencing is conducted, for creation of motion having a special purpose, namely, moving between two equilibrium states against action of quiescent external load. It is shown, that there is linear dependence of character of abbreviation on frequency of stimulation to 60 Hz. At greater frequencies of stimulation the linear disappears. Results of researches, dynamics of muscular abbreviation, at the change of the external loading showed dependence of dynamic and static descriptions to the muscle from direction of motion.

Вступ. Гістерезисні ефекти скорочення є характерною нелінійною особливістю м'яза. Ця нелінійність виявляється у вигляді гістерезисних петель, тобто м'язові волокна виробляють додаткову м'язову силу (ДМС) без надходження до м'яза еферентної активності. Дослідження зміни довжини м'яза при еферентному впливі важливі для розуміння його механізму роботи. [1–6]

Коркові нейрони не генерували стимуляцію протягом усього скорочення м'яза, уся інформація, про рух знаходилася в динамічній компоненті моторної команди. Отже, нервовий стимул, який надходить до м'яза і викликає скорочення, уже містить інформацію про нелінійні властивості скорочення волокна, у тому числі ДМС.

В електроміограмній (ЕМГ) – активності рухових одиниць виявлено феномен рівноважної фіксації сили (РФС), який складається з короткочасної генерації сили руховим волокном за відсутності еферентної активності. Дослідження нелінійності в м'язових скороченнях показали, що мотонейрони спинного мозку, які є продовженням еферентного ланцюга, не змінюють моторну команду, а тільки передають її на рухову одиницю [3, 7–9]. Адекватного пояснення цих феноменів поки що не має. На наш погляд вони зумовлені молекулярними механізмами скорочення м'язових волокон і не є продуктом взаємодії комплексу рухових одиниць на макрорівні. Для підтвердження цієї гіпотези проведено серію дослідів на м'язовому волокні жаби, у результаті яких виявлено наявність короткочасної (до 2 мс) ДМС на дотетанічній ділянці скорочення при застосуванні модульованого стимулюючого сигналу з наростаючою частотою [7]. Характерно, що поява цієї ДМС виникала за певних параметрів стимулюючого імпульсу, а саме прямокутному стимулюючому сигналі з амплітудою від 5 до 7 В, тривалістю 2 мс з наростаючою частотою (15–75 Гц). Незначна зміна цих параметрів викликає зниження ДМС, а більш значні зміни – до повного зникнення ДМС. Зокрема, залишаючи незмінними всі параметри, крім частоти, ДМС повністю зникає при 75 Гц.

Оскільки наші попередні досліді проводилися на ізольованому м'язовому волокні при стимуляції електричним струмом, з механічним виділенням препарату, подібна експериментальна методика не позбавлена недоліків. Метою цих дослідів було вивчення скорочення рухової одиниці м'яза щура при мінімальному впливі на препарат.

Матеріали та методи. Досліді проводили на щурах лінії Вістер вагою 200–250 г. Тварин оперували під загальним барбітуратовим наркозом (загальна доза

40 мг/кг). Операцію проводили за допомогою стереотаксичного приладу СЕЖ-4, обладнаного маніпуляційними насадками. У ході операції сепарували відповідні м'язи від зовнішніх тканин, сухожилля перерізували. Після ламінектомії отримували вільний доступ до спинного мозку в поперековому відділі хребта. Із спинного мозку виділяли вентральні корінці, які перерізували в місці виходу з мозку. Дистальні частини корінців розділяли на 3–5 окремих пучків. З шкіри тварини утворювали ванночку, яку заповнювали вазеліновим маслом, що запобігало засиханню нервових корінців.

Стимуляцію здійснювали за допомогою АЦП, який формував стимулюючу команду та подавав її на сконструйований нами стимулятор, що дозволяв реалізовувати сигнал із заданою частотою, тривалістю й амплітудою. З відсепарованого м'яза кінцівки, виділяли окрему рухову одиницю й разом з фасцією поміщали в омиваючий розчин Кребса. Кріплення м'яза до датчика сили та двигуна здійснювалося через остаточне сухожилля.

Лінійний електродвигун, з кроком 8 мкм, що контролювався через посилювач АЦП, завдяки тросикам і шківам був сполучений з тензOMETРИЧНИМ датчиком сили, чутливість якого становила 1 г на 10 В. На одному з тросиків кріпилася шторка, яка разом з ФЕУ виконувала функцію датчика довжини, з кроком 1 мм на 10 В. За допомогою сервосистеми обидва датчика працювали у синхронному режимі. Сервосистема, пристрою дозволяла встановлювати потрібний рівень зворотного зв'язку і тривалості затримки. Устаткування сервосистеми дозволяло змінювати довжину волокна по заданій траєкторії в часовій точці досягнення сили, відповідного рівня, заданого в процесі експерименту. Усі наведені в даній роботі криві усереднені за 10–15 дослідями.

Результати та обговорення. На рис. 1 наведено зміну динамічних параметрів рухової одиниці м'яза щура при застосуванні модульованого стимулюючого сигналу. Метод модульованої стимуляції показує, що для досягнення об'єднаних скорочень рухових одиниць м'яза в досить низькому інтервалі стимуляції, прикладеної до окремого нервового волокна, на початку кожного досліді, стимуляція має відбуватись в ізометричних умовах (контроль довжини, як позначено на рис. 1). Після досягнення стаціонарного рівня розтягнення, двигун перемикали на контроль сили (вертикальні лінії на рисунку). Після завершення необхідних змін у модульованій стимуляції, двигун перемикали на контроль довжини й стимуляцію припиняли. Час релаксації між дослідями становив 2 хв.

Особливість скорочення м'яза за дії модульованої стимуляції полягала в асиметрії укорочення залежно від частоти стимуляції. Так, при частоті 50 Гц м'яз уко-

рочувався на 55,2 % і досягав максимального значення (100 %) при частоті 75 Гц.

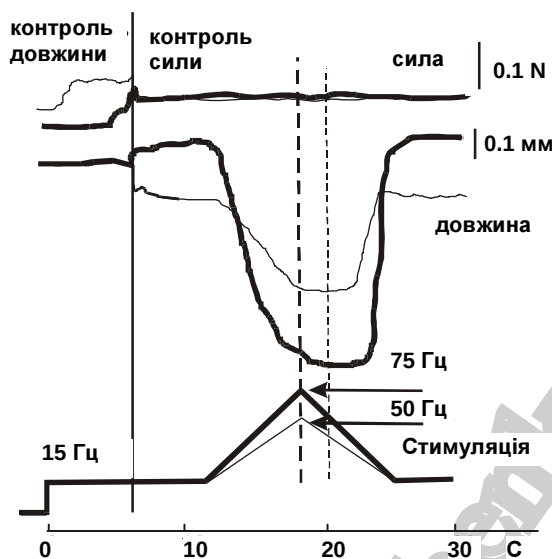


Рис. 1. Зміна довжини м'яза під дією модульованої частоти стимуляції

Слід зазначити особливість зміни параметрів скорочення м'яза за дії частотної модульованої стимуляції, яка пов'язана з асиметрією укорочування по співвідношенню: стимуляція – довжина. Протягом значної частини спадаючої фази стимуляції зміна довжини м'яза не спостерігалась, тривалість стимуляції яка супроводжувалась відсутністю ізотонічного руху була близько 50–60 % щодо повного діапазону тривалості спадаючого стимулюючого сигналу, і в деяких випадках досягала 75 %.

На початку повільного лінійного збільшення частоти стимуляції м'яз спочатку скорочувався досить швидко, (початок руху міг бути ідентифікований через 300–400 мс, для частоти 50 Гц, і 350–450 мс, для частоти 75 Гц). В основному лінійний рух скорочення спостерігався протягом збільшення стимуляції до 40–60 Гц, тоді як наступний приріст частоти міг викликати деяке уповільнення швидкості укорочування.

Гістерезисні ефекти скорочення м'яза враховує ЦНС, у даному випадку вона вносить динамічні зміни в еферентні команди, спрямовані до м'яза, який здійснює скорочення з довільною малою швидкістю. Отже, залежно від напрямку руху, центральні команди до м'язів мають бути змінені. Це може створювати проблеми у використанні спрощеної моделі переміщення. Збудження еферентів з повільним лінійним збільшенням частоти розряду викликало укорочування м'яза з поступовим зменшенням швидкості. Згадана нелінійність може бути переборена за допомогою лінійного збільшення розрядів еферентного компонента з інтервалом в 1 Гц. Таким чином, піддатливість еферентного розряду з двома діапазонами могла бути причиною для прогресивного приросту еферентного впливу у випадку великої амплітуди руху.

Подібні експериментальні результати були отримані й іншими авторами [3, 8, 9]. Особливістю цього методу полягає в мінімізації препарату (досліджували рухові одиниці, а не комплекс м'язів агоністів – антагоністів), відведення одночасно довжини й сили м'яза, застосування системи зворотного зв'язку у вигляді сервосистеми, що дозволяє компенсувати еластичну компоненту

у процесі скорочення і можливість незалежно змінювати довжину препарату за заданою амплітудно-часовою траєкторією, яка задається з комп'ютера, з кроком 8 мкм.

Ймовірно, що застосований методичний підхід, використання модульованої частотної стимуляції не дозволяє моделювати точно еферентні сигнали. Використання стимуляції з різною максимальною частотою стимуляції та перехід до зменшення частоти стимулюючого сигналу не зупиняв укорочування м'яза відразу. Незважаючи на ці розходження подальша поведінка м'яза була подібною в обох випадках. Асиметрія в зменшенні довжини при подразненні м'яза в зазначених межах змін стимуляції спостерігалась у всіх експериментах для дуже широкого діапазону навантаження м'яза та максимальних значень частот подразнення. Результати наших досліджень динаміки м'язового скорочення при сервоконтрольованих змінах зовнішнього навантаження продемонстрували залежність динамічних і статичних характеристик активного м'яза від напрямку руху.

1. Серенко С.Г., Черкаський В.Л., Страфун С.С. // Нейрофізіологія. – 1998. – Т. 30. – С. 212–235.
2. Тальнов А.Н., Костюков А.И. // Нейрофізіологія. – 1994. – Т. 26. – С. 83–90.
3. Тальнов А.Н., Ноздренко Д.Н. // Нейрофізіологія. – 1998. – Т. 28. – С. 321–345.
4. Фельдман А.Г. Центральные и рефлекторные механизмы управления движениями. – М., 1979.
5. Edman K.A., Tsuchia T. // J. Physiol. Lond. – 1996. – Vol. 490. – P. 191–205.
6. Feldman A.G., Levin M.F. // Behav. Brain Sci. – 1995. – Vol. 18. – P. 723–806.
7. Запоіло І.А., Ноздренко Д.М., Сорока В.М., Мірошніченко М.С. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2002. – № 36–37. – С. 106–108.
8. Костюков А.И. // Нейрофізіологія. – 1985. – Т. 17, № 3. – С. 334–443.
9. Kostyukov A.I. // Neuroscience – 1998. – Vol. 83, № 1. – P. 303–20.

Надійшла до редколегії 10.09.04.

УДК 577.539:311

О.О. Моргасенко, асп., В.О. Чайка, асп.

ВМІСТ ЦИКЛІЧНИХ НУКЛЕОТИДІВ У ПАРІЄТАЛЬНИХ КЛІТИНАХ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТА ГЛАДЕНЬКИХ МІОЦИТАХ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ СТРЕСОВОЇ МОДЕЛІ ВИРАЗКИ

Виявлено зміни у вмісті цАМФ і цГМФ у парієтальних клітинах і гладеньких міоцитах шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки. Порушення співвідношення цАМФ/цГМФ за умов розвитку виразки вказують на залучення цикло-нуклеотидних систем сигнальної трансдукції до механізмів виникнення досліджуваної патології.

In the case of stress ulcer development the changes of cAMP and cGMP amount occurred in rat gastric mucosal parietal cells and smooth myocytes. The changes of rate cAMP/cGMP lead to the role of signal transduction system in stress model of ulcerogenesis.

Вступ. Виразка шлунка – поширена патологія, якій приділяється велика увага в сучасній науці. Ще й досі залишаються нез'ясованими механізми розвитку цього захворювання. Регуляція роботи шлунка забезпечується нейрогуморальною системою, з якою і пов'язують розвиток стресової виразки. На клітинному рівні реакція на зовнішні фактори реалізується за участю вторинних посередників цАМФ і цГМФ, які є ключовими ланками аденілатциклазного й гуанілатциклазного каскадів відповідно.

Визначальним у розвитку виразкової хвороби шлунка є порушення рівноваги між факторами "агресії" і факторами "захисту" слизової оболонки [1]. Парієтальні клітини продукують соляну кислоту, яка в надлишку є основним агресивним фактором слизової оболонки. Важливим для правильного розуміння процесів шлункової секреції, а отже, і розвитку виразкової патології, є вивчення механізмів трансдукції сигналів у зазначених клітинах.

Скоротлива функція шлунка забезпечується шаром гладенької мускулатури, розташованим під слизовою оболонкою. Один з механізмів регуляції актин-міозинової взаємодії є фосфорилування регуляторного ланцюга міозину за участю кінази легкого ланцюга міозину, активність якої безпосередньо залежить від цАМФ [2]. У той же час і цАМФ, і цГМФ обумовлюють вихід іонів Ca^{2+} з міоцитів. Таким чином, ці вторинні посередники здійснюють вагомий вплив на функціонування і м'язового шару, і роботу шлунка в цілому.

Дослідження змін у процесах трансдукції сигналів є необхідним для з'ясування механізмів шлункової секреції, її впливу на патогенез виразкової хвороби, а також для вивчення зв'язку патогенезу зі змінами моторики шлунка. Тому метою нашої роботи було визначити зміну вмісту цАМФ і цГМФ у парієтальних клітинах слизової оболонки та гладеньких міоцитах шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих щурах лінії Вістар обох статей масою 180–220 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. Стресову виразку викликали за методикою С.Д. Гройсмана та Т.Г. Каревіної [3]. Для визначення вмісту циклічних нуклеотидів брали шлунки, які морфологічно характеризувались ураженням лише слизової оболонки, наявністю крововиливів і відсутністю виражених виразкових утворень. Парієтальні клітини отримували за модифікованою методикою [4]. Гомогенат гладеньких міоцитів отримували після інкубації у присутності протеїнази К. Визначали вміст циклічних нуклеотидів у цитозолі, використовуючи Cyclic GMP [3H] Assay System і Cyclic GMP [3H] Assay System, code TRK500 (Amersham Biosciences), що забезпечують точне і специфічне визначення цАМФ і цГМФ.

Результати та обговорення. Відомо, що зміна співвідношення цАМФ/цГМФ указує на порушення в основних шляхах трансдукції сигналів. Так, зокрема, такі зміни у процесі виразкоутворення були показані для клітин слизової оболонки шлунка [5]. Раніше було встановлено зростання співвідношення цАМФ/цГМФ в антральних і фундальних відділах слизової оболонки у щурів. Цей феномен інтерпретували як можливу ознаку реконструктивних, антиульцерогенних процесів [6].

Отримані дані (табл. 1) указують на більш ніж дворазове зростання співвідношення цАМФ/цГМФ у парієтальних клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки, що відбувається в основному завдяки підвищенню рівня цАМФ. Відомо, що активність H^+ , K^+ -АТФази опосередковується в основному аденілатциклазним каскадом. Таким чином, зростання вмісту цАМФ зумовлює посилення кислотної секреції і процесу виразкоутворення.

Таблиця 1. Вміст цАМФ і цГМФ у парієтальних клітинах слизової оболонки та в гладеньких міоцитах шлунка щурів при виразці

Нуклеотид	Парієтальні клітини		Гладенькі міоцити	
	Контроль	виразка	контроль	виразка
цАМФ	3,81 ± 0,11	9,04 ± 0,37	28,98 ± 0,71	3,6 ± 0,09
цГМФ	12,38 ± 0,52	13,54 ± 0,58	1,45 ± 0,05	20,08 ± 0,66
цАМФ/цГМФ	0,308	0,668	19,986	0,179

p ≤ 0,05

Існують дані про зростання цАМФ/цГМФ-відношення в клітинах слизової оболонки при утворенні експериментальної виразки шлунка у щурів. Причиною цього значного зростання – головним чином (однак не повністю) є значне падіння рівня цГМФ [6, 7]. Це можна пояснити тим, що зазначені літературні дані були отримані на загальній фракції всіх клітин слизової, серед яких вміст досліджуваних нами парієтальних клітин становить лише 10–15 %. Оскільки при патогенезі виразкової хвороби особливу роль відіграють кислотопродукуючі паріє-

тальні клітини, дослідження змін у шляхах трансдукції саме у цих клітинах є більш коректним для розуміння розвитку патології.

Відомо, що цАМФ-залежне фосфорилування інактивує кіназу легкого ланцюга міозину, що перешкоджає актин-міозиновій взаємодії. Хоча існують дані, що цАМФ стимулює, а цГМФ гальмує скорочення гладеньких м'язів деяких тканин і серцевого м'яза, тобто в певних випадках ці вторинні посередники можна розглядати як антагоністи [8]. У даному разі можна спостерігати різке зростання

цГМФ (майже в 14 разів) і значне (у 8 разів) зменшення цАМФ у міоцитах шлунка на ранньому етапі виразки порівняно з контролем. Відповідним чином цей факт має своє відображення і на зміні співвідношення цАМФ/цГМФ у досліджуваних міоцитах. Можна припустити, що зміна вмісту циклічних нуклеотидів та їхні співвідношення призведе до відповідних порушень активності скорочення гладеньких м'язів шлунка, при цьому вона зростає порівнянно з контролем.

Раніше було показано, що механізми цАМФ і цГМФ-залежної регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів здійснюються у тісному взаємозв'язку [9]. Співвідношення цАМФ/цГМФ також опосередковує потенціал-незалежний контроль NO механічного напруження гладеньких м'язів [8].

Отримані нами дані вказують на те, що на ранньому етапі розвитку виразки в мускулатурі шлунка включаються механізми, спрямовані на стимулювання роботи скоротливого апарату, що обов'язково позначиться на роботі шлунка.

Нами було встановлено зміни співвідношення цАМФ/цГМФ у парієтальних клітинах слизової оболонки

та гладеньких міоцитах шлунка щурів за умов розвитку стресової моделі виразки. У парієтальних клітинах відбувається зростання співвідношення цАМФ/цГМФ в основному завдяки підвищенню рівня цАМФ, а в гладеньких міоцитах спостерігається зменшення співвідношення цАМФ/цГМФ за рахунок як зростання цГМФ, так і зниження цАМФ. З'ясування механізмів встановлених змін є завданням подальшої роботи.

1. Ургин А.И., Сорокин А.В., Евдокимов В.Г. // Медицинский вестник. – 2002 – № 5. 2. Остапченко Л.І. Молекулярні механізми регуляції активності циклонуклеотид- та кальційзалежних протеїназ лімфоїдних клітин в умовах радіаційного впливу. – К., 1999. 3. Гройсман С.Д., Каревина Т.Г. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс. – Рукопись деп. в ВИНТИ, № 452/79, 131 с. 4. Тауров М.М., Берсимбаев Р.И., Аргутинская С.В., Салганик Р.И. // Биохимия. – 1983. – Т. 48. – вып. 6. – С1035–1041 5. Balint G.A. // Acta physiol Hung. – 1991. – Vol. 77. – № 2. – P. 153–158. 6. Balint G.A. // Acta Physiol Hung. – 1992. – Vol. 80. – № 1. – P. 81–88. 7. Tkachenko E.V., Belostotskii N.I., Varvanina G.G. // Eksp Klin Gastroenterol. – 2002. – Vol. 55. – № 8. – P. 113. 8. Ковалев И.В., Баскаков М.Б., Капилевич Л.В., Медведев М.А. // Бюл. сиб. мед. – 2004 – № 1. 9. Капилевич Л.В., Носарев А.В., Ковалев И.В. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2003. – Т. 135, № 6. – С. 714–717

Надійшла до редколегії 10.09.04.

УДК 577.34(35)

К.І. Богуцька, канд. біол. наук

АТФаза АКТИВНІСТЬ АКТОМІОЗИНУ Й МІОЗИНУ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЗБЕРІГАННЯ ЇХНІХ ПРЕПАРАТІВ

Проведено визначення середовища, яке сприяє оптимальному зберіганню препаратів скоротливих білків з відновленням ними функціональних властивостей після розморожування. Показано, що при зберіганні препаратів з додаванням гліцеролу залишається контрольний рівень АТФазної активності. Без додавання гліцеролу АТФаза активність міозину та актоміозину після розморожування є нижчою за контрольні значення.

Determination of the condition of medium for optimal storage of the contractile proteins with recovery their functional properties after unfreezing was carried out. It was shown that the ATPase activity does not change under the storage of the contractile proteins with glycerol. On the contrary the ATPase activity of the myosin and actomyosin after unfreezing without glycerol was lower its control level.

Вступ. Серед проблем, якими займається сучасна кріобіологія, одне з центральних місць належить кріостійкості й кріолабільності білкових структур, зокрема ферментів і ферментних систем. Установлено, що за присутності кріопротекторів, наприклад гліцеролу, значних змін в активності ферментів не відбувається. Гліцерол має здатність утворювати оборотні комплекси з водою, іонами й макромолекулами. Якщо проводити процес заморожування тканин у середовищі без гліцеролу, то під час поступового вимерзання води відбувається дегідратація. У разі значного зневоднення підвищена концентрація осмотично активних речовин, що виникає внаслідок кристалізації води, може призвести до денатурації білків. Гліцерол зв'язує значну кількість води й, утримуючи її, запобігає підвищенню концентрації солей до критичного рівня, попереджаючи тим самим денатурацію білкових комплексів; своєрідна осмотична дія гліцеролу проявляється й за відтаювання.

Об'єкт і методи досліджень. Досліджували актоміозин і міозин, які було отримано з лівого шлуночка серця бика за загальноприйнятною методикою [1]. Виділення актоміозину здійснювали екстракцією за умов високої іонної сили середовища, міозин очищали із застосуванням хроматографічної колонки, чистоту та якісний склад препаратів контролювали методом електрофорезу. Препарати зберігали у присутності гліцеролу під час заморожування в рідкому азоті, гліцерол видаляли методом діалізу. Метою роботи було визначення середовища, яке сприяє кращому зберіганню препаратів з відновлення ними функціональних властивостей після розмо-

рожування. Для цього визначали АТФазну активність актоміозину та міозину в препаратах у процесі виділення та після розморожування їх у разі тривалого зберігання. Препарати білків зберігали в 0,6 моль/л KCl та 0,6 моль/л KCl з додаванням гліцеролу або в середовищі BW (40 ммоль/л KCl; 20 ммоль/л імідазол; pH 6.6; 2 ммоль/л MgCl₂; 1 ммоль/л азид натрію; 1 ммоль/л меркаптоетанол) і BW з додаванням гліцеролу. Статистичну обробку даних проводили методами варіаційної статистики за допомогою програми "Origin 5.0", результати досліджень представляли у вигляді різниці середніх значень та помилок середнього ($M \pm m$), вірогідними вважали результати при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. На величину АТФазної активності можуть впливати тонкі зміни в структурі молекули білка, які залежать від чистоти реактивів, домішок двовалентних іонів, умов зберігання та ін. [2, 3]. Препарати міозину й актоміозину залежно від методики виділення можуть відрізнятися за значеннями АТФазної активності. При дослідженні їхніх властивостей і порівнянні результатів виникають певні складності, тому бажано проводити окремі експерименти або серію експериментів на одному препараті. Це можна виконати за умов тривалого зберігання препаратів при заморожуванні. Також вивчали вплив солей у високих концентраціях у середовищі заморожування як однієї з можливих причин пошкодження при заморожуванні/відтаюванні ферментів.

Для того щоб з'ясувати, яке середовище сприяє кращому зберіганню препаратів без втрати ними функціональних властивостей після розморожування, визначали АТФазну активність актоміозину та міозину

в процесі виділення й після розморожування за тривалого зберігання препаратів. Результати визначення

активності препаратів скоротливих білків після розморожування наведено в табл. 1.

Таблиця 1. АТФазна активність актоміозину та міозину серцевого м'яза бика (мкмоль Φ_n / год·на 1 мг білка) залежно від умов зберігання препаратів ($M \pm m$, $n=7$)

Умови		0,6 моль/л KCl	0,6 моль/л KCl, гліцерол	BW ¹	BW ¹ , гліцерол	Контрольні показники
актоміозин	5 ммоль/л MgCl ₂	1,98 ± 0,05*	3,42 ± 0,12*	4,24 ± 0,15*	5,56 ± 0,19	5,71 ± 0,17
	100 мкмоль/л CaCl ₂ 5 ммоль/л MgCl ₂	2,28 ± 0,06*	4,26 ± 0,14*	4,56 ± 0,14*	5,16 ± 0,19	5,28 ± 0,18
	5 ммоль/л MgCl ₂ 1 ммоль/л ЕГТА	1,14 ± 0,04*	1,59 ± 0,03*	1,86 ± 0,04*	1,93 ± 0,07*	2,46 ± 0,09
міозин	5 ммоль/л CaCl ₂ 50 ммоль/л KCl	8,28 ± 0,36*	31,86 ± 1,17*	41,82 ± 1,64*	49,61 ± 2,03	49,92 ± 1,89
	2,5 ммоль/л MgCl ₂ 50 ммоль/л KCl	0,84 ± 0,02*	1,14 ± 0,02*	1,08 ± 0,02*	2,28 ± 0,04	2,41 ± 0,09
	1 ммоль/л ЕДТА 50 ммоль/л KCl	2,15 ± 0,05*	1,24 ± 0,02*	3,08 ± 0,09	3,09 ± 0,07	3,05 ± 0,08
	5 ммоль/л CaCl ₂ 0,5 моль/л KCl	6,78 ± 0,23*	31,38 ± 1,21*	41,11 ± 1,52*	49,08 ± 1,49	49,52 ± 2,23
	2,5 ммоль/л MgCl ₂ 0,5 моль/л KCl	2,28 ± 0,08*	1,26 ± 0,03*	2,44 ± 0,09*	4,02 ± 0,14	4,14 ± 0,16
	1 ммоль/л ЕДТА 0,5 моль/л KCl	2,88 ± 0,09*	10,08 ± 0,40*	12,06 ± 0,51*	7,56 ± 0,34*	15,18 ± 0,53

Примітка. * – відмінність від контрольних показників достовірна при $p \leq 0,05$; ¹ – склад див. вище.

Показано, що при зберіганні впродовж 3–4 місяців препаратів скоротливих білків АТФазна активність міозину й актоміозину після розморожування була майже в 2 рази меншою при високій концентрації солі, від контрольних показників нижче в середньому на 15–20 % у присутності гліцеролу та 0,6 моль/л KCl, на 10–15 % менше при зберіганні в середовищі BW і майже не змінювалась при додаванні гліцеролу до цього середовища зберігання препаратів скоротливих білків. Препарати актоміозину не втрачають чутливості до Ca^{2+} , що має суттєве значення для дослідження особливостей їхньої регуляції. Подібна зміна АТФазної активності спостерігалась і для міозину: у присутності KCl після розморожування активність значно, на 70–80 %, зменшувалась, при додаванні гліцеролу – на 40 %.

Отже, додавання гліцеролу до середовища, в якому заморожувались препарати скоротливих білків, сприяло

збереженню контрольного рівня їхньої АТФазної активності. За таких умов можливо формується комплекс з активними центрами АТФаз, що викликає тимчасову оборотну блокаду їхньої активності, крім того, гліцерол стабілізує структуру ферментів, захищаючи їх від пошкоджувальної дії солей у високих концентраціях у середовищі заморожування.

Висновки. Можна вважати, що кріозахист препаратів скоротливих білків за допомогою гліцеролу є ефективним.

1. Margossian S.S. // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260, № 25. – P. 13747–13754. 2. Богущька К.І., Цимбалюк О.В., Данилова В.М. // Биополимеры и клетка. – 2002. – Т. 18, № 4. – С. 297–300. 3. Халина Я.Н., Подлубная З.А. // Биофизика. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 367–369.

Надійшла до редколегії 29.09.04

УДК 577.12+616.153.915:616-092.9

І.І. Паталах, канд. біол. наук, М.А. Зеленюк, студ.,
І.В. Лемешко, студ., М.С. Капішнікова, студ.

РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ЕРИТРОПОЕЗУ

Показано, що ініціювання продукції супероксидних радикалів у моделі експериментальної (фенілгідразинові) анемії викликало заміщення пошкоджених еритроцитів новою популяцією клітин. Застосування α -токоферолу пригнічувало накопичення молодих еритроцитів. Обговорюється можлива роль процесів пероксидації у регуляції еритропоезу.

Phenomenon of damaged erythrocytes substitution by new cell population under the phenylhydrazine-induced anemia was found out. α -tocopherol application had suppressed this effect. A possible role of erythropoiesis redox regulation has been discussed.

Вступ. Як відомо, розвиток певних киснедефіцитних станів, таких як гіпоксія та набуті анемії (зокрема, залізодефіцитні чи ятрогенні) призводить до накопичення у крові продуктів одноелектронного відновлення O_2 – активних форм кисню (АФК), що зумовлює часткову дестабілізацію еритроцитарних мембран з наступним прискореним лізісом клітин. Відомо також, що перебіг залізодефіцитних анемії не завжди супроводжується зниженням загальної кількості еритроцитів, оскільки ініціюються механізми еритропоезу й відбувається заміщення зруйнованих еритроцитів новими популяціями клітин. Головна роль у ініціюванні еритропоезу належить гормону еритропоетину (ЕРП), який контролює та

регулює еритроїдну диференціацію колоніє-утворювальних одиниць (КУО) та еритробластів [1]. Але до цього часу залишається відкритим питання щодо адаптивних механізмів, пов'язаних із синтезом еритропоетину. Доведено, що регуляторні послідовності ЕРП-гену перебувають під контролем певних факторів транскрипції [2]. За сучасними даними відомо також, що вторинними месенджерами регуляції активності факторів транскрипції можуть виступати такі АФК, як супероксидний аніон-радикал (O_2^-) і пероксид водню (H_2O_2) [3].

Вважають, що ЕРП-продукуючі клітини печінки й нирок мають O_2 -сенсори [4], які забезпечують чутливість клітин до дефіциту кисню. Проте існують певні дискусії

щодо природи сенсорів: на думку одних авторів – це відповідні мембранні NADPH-оксидази [4], тоді як інші наполягають на мітохондріальній локалізації киснечутливих комплексів (наприклад, сенсорами можуть бути певні ділянки дихального ланцюга) [5]. Концептуально ці дискусії спрямовані на визначення ролі АФК у регуляції еритропоезу. Якщо сенсорами є NADPH-оксидази, тоді функція супероксиду та H_2O_2 , які вони продукують, полягає у гальмуванні синтезу ЕРП [4]. Киснедефіцитні стани є причиною субстратного інгібування NADPH-оксидаз, унаслідок якого знімається гальмування еритропоезу. З іншого боку, доведено, що дефіцит кінцевого акцептора електронів у дихальному ланцюзі й пов'язане з цим продукування АФК стимулюють зв'язування фактора HIF-1 (hypoxia inducible factor) з ДНК та експресію mPHE еритропоетину [5].

Продукція АФК в умовах патогенезу гіпоксичних і анемічних станів також може розглядатись як фактор індукції ЕРП-залежного еритропоезу. Аргументом на користь такої думки може бути виявлення залежності між інтенсивністю утворення ТБК-активних продуктів і виникненням молодих популяцій еритроцитів. Для перевірки цього припущення нами була використана експериментальна модель фенілгідразинової анемії із застосуванням альфа-токоферолу як інгібітора вільнорадикальних процесів.

Об'єкти й методи досліджень. У дослідях використовували білих беспородних щурів масою 150–180 г, яким вводили солянокислий фенілгідразин (ФГ) на фізіологічному розчині в дозі 70 мг/кг маси або фенілгідразин + 30 % альфа-токоферол (ФГ+ТФ) у дозі 0,8 мг/кг маси. Препарати вводили внутрішньочеревними ін'єкціями кожної другої доби протягом двох тижнів.

Популяції еритроцитів виявляли, аналізуючи кислотні еритрограми [6]. Інтенсивність ПОЛ визначали за накопиченням продуктів переокиснення, що тестуються в реакції з тіобарбітуровою кислотою, так званих ТБК-активних продуктів [7]. Активність супероксиддисмутази (СОД) і каталази (КАТ) оцінювали за [8], глутатіонпероксидази (ГПО) і глутатіонредуктази (ГР) – за [9]. Визна-

чення ПОЛ і активності ферментів проводили в 1 мл відмитої суспензії еритроцитів.

Результати та їх обговорення. Особливістю фенілгідразинової анемії є гемоліз сформованих еритроцитів з одночасним окисненням гему в структурі гемоглобіну та перетворенням його на метгемоглобін. Саме під час окиснення $HbFe^{2+} \rightarrow HbFe^{3+}$ відбувається додаткова генерація супероксидних радикалів – ініціаторів вільнорадикальних процесів на плазматичних мембранах і в цитозолі еритроцитів (які, як відомо, у зрілому стані втрачають ядро й органели). Наслідком руйнації гемоглобіну є накопичення тілець Гейнца – головного симптому старіння еритроцита. Передчасному старінню сприяють також процеси ПОЛ на мембрані, окиснення тиольних груп білків, які відповідають за транспорт іонів, зміни загального заряду на зовнішній і внутрішній поверхнях плазмалемми та інші деструктивні процеси. Дезорганізація структури плазматичної мембрани внаслідок прямої взаємодії ФГ із карбонільними групами може бути додатковим фактором розвитку ПОЛ. Як наслідок, відбувається лізис еритроцитів у кров'яному руслі або в селезінці. Генералізоване старіння еритроцитів крові підслідних щурів в умовах штучної анемії можна спостерігати на рис. 1, що ілюструється значним зсувом профілю еритрограми вліво відносно профілю контрольної кривої та збільшенням амплітуди максимуму гемолізу.

Проте, водночас з прискореною елімінацією існуючих еритроцитів з'являється популяція молодих клітин, лізис яких починається лише з 10 хв (рис. 1). Частка цих еритроцитів становить близько 20 % від загальної кількості. Подібні дані в умовах ФГ анемії було отримано в роботі [10]. Застосування альфа-токоферолу дещо збільшує час існування еритроцитів в умовах токсичного впливу, але не повертає загальну картину до норми. Надзвичайно важливим, на наш погляд, є факт відсутності другого піку на еритрограмі, яка відображує вплив токоферолу. Це означає зупинку (чи затримку) еритропоезу, ініційованого фенілгідразиним при одночасному застосуванні альфа-токоферолу.

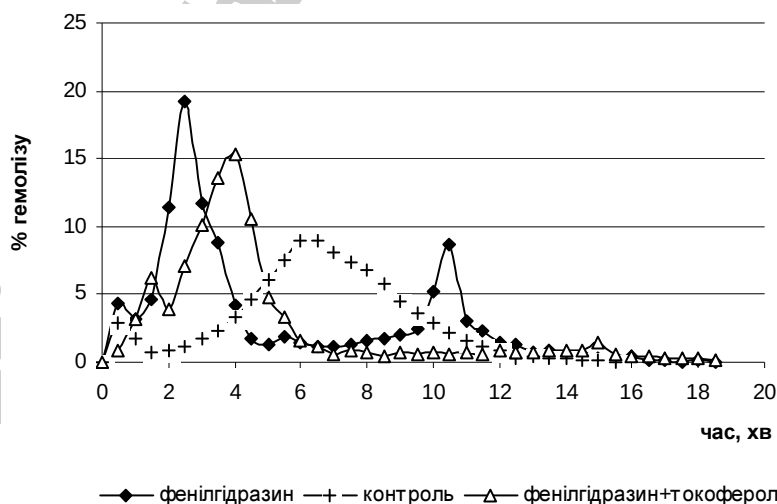


Рис. 1. Кислотний гемоліз еритроцитів крові щурів в умовах експериментальної (фенілгідразинової) анемії та її корекції токоферолом

Намагаючись з'ясувати причини виявлених особливостей дії двох препаратів, які складають пару прооксидант–антиоксидант, було проаналізовано рівень накопичення ТБК-активних продуктів і стан ферментативної системи антиоксидантного захисту в еритроцитах щурів, залучених до експерименту.

Оцінка складових пероксидації ліпідів (рис. 2) показала, що фенілгідразинова інтоксикація достовірно ($p < 0.95$) підвищує лише неферментативну складову ПОЛ. Це свідчить про переважну прооксидантну роль реакції переходу гемоглобіну в метгемоглобін і незначний внесок дезорганізуючого впливу ФГ, який мав би

вивільнити із структури мембрани додаткові центри самоокиснення ліпідів.

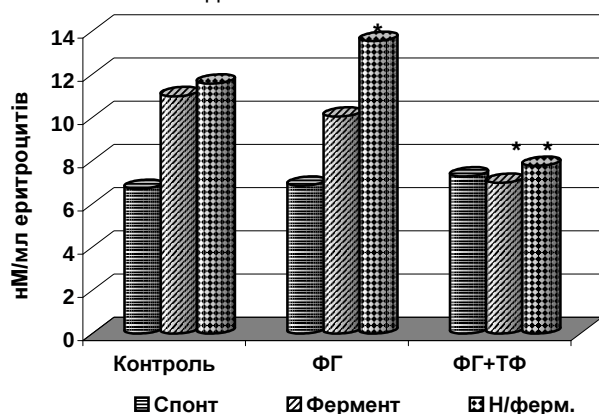


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів в еритроцитах щурів після двотижневої періодичної обробки фенілгідазином (ФГ) або фенілгідазином і альфа-токоферолом (ФГ+ТФ).

Застосування альфа-токоферолу призвело до значного інгібування як ферментативної (на 37 % відносно контролю та на 30 % – порівняно з фенілгідазином), так і неферментативної складових (на 33 і 43 % відповідно). Рівень самоіндукованого окиснення при цьому не змінився. Таким чином, можна стверджувати, що під дією токоферолу не лише нівелюється прооксидантний вплив ФГ, але й значно пригнічується загальний рівень ПОЛ еритроцитів у порівнянні з нормою.

Ураховуючи, що альфа-токоферол є поліфункціональним антиоксидантом (може бути прямим інгібітором АФК або ефективним перехоплювачем органічних радикалів, або може потенціювати роботу інших компонентів АО захисту), нами було досліджено реакцію ферментів АО захисту на присутність альфа-токоферолу в умовах фенілгідазинової анемії. Як свідчить діаграма (рис. 3), ФГ викликає значну активацію каталази, глутатіонпероксидази й глутатіонредуктази (на 33,5, 21 і 30 % відповідно). Це узгоджується з добре відомим фактом індукції синтезу ферментативних АО під дією чинників, генеруючих АФК [11]. Але всупереч загальним уявленням про стабільність роботи СОД – першої ланки АО захисту, отримані нами дані свідчать про статистично достовірне ($p < 0,95$) зниження активності СОД в умовах анемії. Дуже показовим є корелюючий вплив токоферолу, який можна охарактеризувати як повернення АО системи до норми шляхом суттєвого зниження активності КАТ, ГПО і ГР та часткового відновлення активності СОД. Аналізуючи зміни ферментативної системи АО захисту в умовах прооксидантно (фенілгідазин) – антиоксидантного (токоферол) втручання, можна впевнено вказати на єдине джерело цих змін – гіперпродукцію супероксидних радикалів. Існують наступні підстави для такого впевненого висновку: 1) надлишок субстрату СОД (O_2) прискорює накопичення продукту (H_2O_2), який у високих концентраціях є інгібітором власного ферменту; 2) про накопичення H_2O_2 свідчить також підвищена активність КАТ і ГПО, для яких він є субстратом. При цьому активність ГР, яка отримує внаслідок роботи ГПР окиснений глутатіон, також підвищується; 3) виявлена здатність токоферолу водночас нормалізувати роботу всієї системи АО захисту може забезпечу-

ватися саме за рахунок знешкодження надлишку супероксидних радикалів – ініціаторів розвитку вільнорадикальних процесів і наступних стресових змін у системі АО захисту.

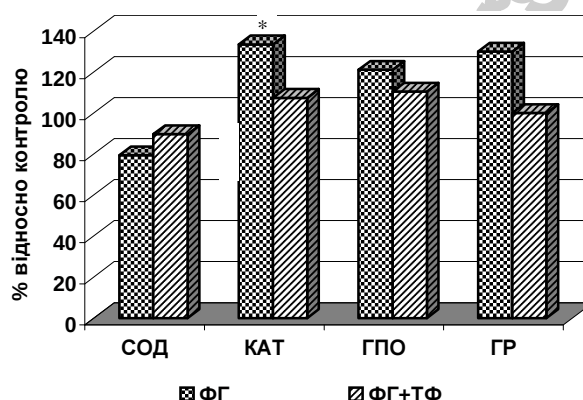


Рис. 3. Активність ферментів АО захисту в еритроцитах щурів в умовах обробки фенілгідазином (ФГ) або фенілгідазином і альфа-токоферолом (ФГ+ТФ).

Висновки. Отримавши додаткові аргументи на користь супероксид-продукуючої ролі фенілгідазину як головної причини його токсичної дії, можемо запропонувати наступний "сценарій" розвитку подій, пов'язаних з ініціюванням стресового еритропоезу. Виходячи в плазму через аніонні канали [12], O_2 у реакціях дисмутації з участю екстрацелюлярної СОД переходить у більш стабільний стан, утворюючи пероксид водню [13]. Саме H_2O_2 як вторинний месенджер стресового сигналу може переноситись плазмою крові до ЕРП-продукуючих клітин та індукувати появу популяції молодих еритроцитів, що було встановлено в нашому експерименті. Непрямим доказом на користь цієї гіпотези може бути зафіксована відміна еритропоезу в присутності альфа-токоферолу – безпосереднього інгібітора АФК. Таким чином, наші дані свідчать на користь активуючої ролі АФК у регуляції еритропоезу.

Автори висловлюють подяку зав. каф. біофізики та біохімії Дніпропетровського НУ д-ру біол. наук Н.І. Штененко за організацію експерименту, в якому відтворювалась модель гемолітичної анемії, та асп. Л.М. Олександровій за технічну допомогу.

1. Жибурт Е.Б., Серебрянная Н.Б. // Terra Medica. – 1997. – № 3. – С. 9.
2. Madan A., Lin C., Hatch S., Curtin P. // Blood. – 1995. – Vol. 85. – P. 2735–2741.
3. Kamata H., Hirata H. // Cell. Signal. – 1999. – Vol. 11, № 1. – P. 1–14.
4. Ермоленко В.М., Иващенко М.А. Уремия и эритропозитин. – М., 1999.
5. Chandel N. S., Maltepe E., Goldwasser E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95 (20). – P. 11715–11720.
6. Гутельзон И.М., Терсков И.А. // Биофизика. – 1957. – Т. 2, № 2. – С. 259–266.
7. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кликун А.А. // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
8. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. // Лаб. дело. – 1991. – Т. 10. – С. 9–13.
9. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Переспегина И.А. // Лаб. дело. – 1990. – Т. 8. – С. 19–21.
10. Magakian Iu.A., Karalova E.M., Abroian L.O., Karapetian S.A. // Tsitologia. – 1997. – Vol. 39 (8). – P. 705–710.
11. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Успехи совр. биол. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 442–455.
12. Дубинина Е.Е. // Укр. биохим. журн. – 1992. – Т. 64, № 2. – С. 3–15.
13. Гамалей И.А., Клубин И.В. // Цитология. – 1996. – Т. 38, № 12. – С. 1233–1247.

Надійшла до редколегії 27.09.04

УДК 577.1:547.962.9

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

ЕФЕКТ НАВАНТАЖЕННЯ РАЦІОНУ ФЕНІЛАЛАНИНОМ НА КОЛАГЕН І ТИПУ ШКІРИ ЩУРІВ, УРАЖЕНИХ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА

В експериментах на щурах-самцях лінії Вістар досліджено вплив навантаження раціону фенілаланіном на амінокислотний склад колагену І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена. Показано здатність навантаження раціону фенілаланіном на фоні безбілкової дієти нормалізувати якісні зміни у колагені І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена.

In experiments on Wistar male rats influence of phenylalanine load on skin type I collagen amino acid composition of animals with Guerin's carcinomas has been studied. As a result of investigation it has been shown that phenylalanine load of diet can normalize qualitative changes in skin type I collagen amino acid composition of animals with Guerin's carcinomas.

Вступ. Результати численних досліджень на протязі останнього десятиріччя механізмів регуляції обміну речовин в організмі знову підвищили інтерес науковців до амінокислот, що на даний момент розглядаються як універсальні природні біологічно активні сполуки, здатні виступати регуляторами спрямованої дії та використовуватись, у зв'язку з цим, як ефективні лікарські засоби [1]. При цьому необхідним є вивчення індивідуальної ролі кожної амінокислоти, адже зі змінами вмісту якоїсь із даних сполук змінюється як транспорт, так і внутрішньоклітинна концентрація інших. Наприклад, фенілаланін у надмірних кількостях може пригнічувати включення тирозину до білків печінки, але в той же час стимулювати включення триптофану, яке у свою чергу сповільнює утилізацію лейцину і гістидину [2].

Узагалі, фенілаланін заслуговує на особливу увагу. Зміни вмісту даної амінокислоти в пулі сироватки, тканин і органів супроводжують такі серйозні патології, як ревматизм, гіпертонія, атеросклероз, цукровий діабет та інші гормональні порушення, а також виразки різної локалізації [2]. Нещодавно встановлено, що зміни в обміні фенілаланіну можуть розглядатись і як індикатор реакції організму на рівень забрудненості навколишнього середовища [3]. До того ж, вивчення транспорту фенілаланіну та кінетики його обміну показало високий ступінь незалежності даних параметрів від інших складових раціону [4,5].

Усе зазначене зумовило наш інтерес до вивчення індивідуального впливу навантаження раціону фенілаланіном на структуру сполучнотканинних білків, що формувались у процесі ураження організму онкологічним захворюванням, і з'ясування можливої ролі даної амінокислоти як регулятора обміну білків за даної патології

Метою нашої роботи було вивчення впливу навантаження раціону фенілаланіном (на фоні безбілкової дієти) на амінокислотний склад колагену І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена. У зв'язку з цим необхідно було вирішити наступні завдання: провести порівняльне вивчення амінокислотного складу колагенів щурів у нормі та при карциномі Герена; дослідити можливості регуляції *in vivo* якісного складу колагенів у нормі та при неопластичному процесі за допомогою навантаження раціону фенілаланіном.

Об'єкти й методи досліджень. Експерименти проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар (120–150 г маси тіла). Тварини контрольної та І дослідної групи утримувались на стандартному раціоні віварію (20 % харчового білка). Щури ІІ дослідної одержували раціон, позбавлений білка, але збалансований за іншими поживними речовинами, вітамінами і мінералами. Тварини ІІІ дослідної групи на фоні безбілкового раціону з першого

дня годування одержували навантаження фенілаланіном із розрахунку 500мг/100 г маси тіла щура на добу.

Щурам дослідних груп було прищеплено карциному Герена. Для цього відбирали пухлину розміром приблизно 3 см³, відділяли слиз, некротичні ділянки, подрібнювали й готували 30 %-у суспензію пухлинних клітин у фізіологічному розчині. Усі процедури проводили при температурі 4 °С. Суспензію вводили тваринам підшкірно з розрахунку 0,4 мл на 100 г м. т. щура. Через 15 діб було відмічено формування щеплених пухлин. На 21-й день після появи пухлин тварин забивали декапітацією, відбирали шкіру й одержували колаген І типу за методом [6]. На першому етапі проводили екстракцію білка 0,1 моль/л Na-цитратним буфером (рН 4,0) з наступним діалізом проти 0,01 моль/л Na₂HPO₄ при температурі 4 °С. Кристали білка збирали центрифугуванням при 6000 g 20 хв. Одержаний білок (100 мг) розчиняли в 10 мл 0,1 моль/л оцтової кислоти (рН 2,5) і додавали пепсин з розрахунку 20 мг/г білка. Залишали на 3 доби при температурі 4 °С. Потім проводили нейтралізацію розчину сухим Tris до рН 7,4 для інактивації пепсину. Наступним етапом було фракціонування розчину висололюванням NaCl. Фракція, що випадала у осад при 2,2 моль/л NaCl містила колаген І типу. Препарати піддавали діалізу проти 15 % KCl у 0,02 моль/л Na₂HPO₄. Чистоту препаратів колагену І типу перевіряли електрофоретично [7].

Аналіз амінокислотного складу проводили за допомогою амінокислотного аналізатора AAA-881 (Чехія) за методом, описаним у робрті [8].

Результати досліджень та їх обговорення. Результати визначення впливу різного рівня забезпеченості раціону білком і навантаження фенілаланіном на фоні безбілкової дієти на амінокислотний склад колагену І типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена, наведено в табл. 1.

З одержаних даних видно, що за умови формування карциноми Герена у тварин, які утримувались на стандартному раціоні (дослідна група І), синтезувався колаген І типу шкіри, який вірогідно відрізнявся від даного білка в нормальних тварин за вмістом 7 амінокислот: зростала кількість гідроксипроліну при одночасному зниженні вмісту аспарагінової кислоти, серину, аланіну, валіну, метіоніну й фенілаланіну. Такі зміни в амінокислотному складі колагену можуть позначитись на структурі колагенової спіралі (зростання гідроксипроліну), на ступені її жорсткості (зміни за аланіном, валіном, метіоном і фенілаланіном), на значенні її поверхневого заряду (зміни за аспарагіновою кислотою та серином) [9]. Крім того, зниження вмісту аспарагінової кислоти може привести до зменшення числа доменів Arg-Глі-Асп, відповідальних за процеси адгезії клітин до колагенових

фібрил [10], а зниження вмісту серину – числа локусів взаємодії з ферментом, що відщеплює від колагенової молекули фрагменти, здатні стимулювати процеси фібрилогенезу *de novo* [11].

Утримання дослідних тварин з карциномою Герена на безбілковому раціоні (дослідна група II) вело до зменшення числа вірогідних відмінностей амінокислотного складу колагену I типу шкіри даної групи від норми.

Зміни були відмічені стосовно 5 амінокислот і вони виявлялися слабкіше, ніж у групі I: знижувався вміст аспарагінової кислоти, серину, аланіну та фенілаланіну і зростав – проліну. У цілому безбілковий раціон послаблював ступінь виявлення змін у амінокислотному складі колагену I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена, не змінюючи кардинально самого характеру цих змін.

Таблиця 1. Амінокислотний склад колагену I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена, при різній забезпеченості раціону білком і навантаженні фенілаланіном (залишки/1000 залишків, $M \pm m$, $n=6$).

Амінокислота	Контроль	Дослід I	Дослід II	Дослід III
Лізин	29,37 $\pm$ 0,67	31,07 $\pm$ 3,19	31,88 $\pm$ 2,44	31,26 $\pm$ 1,82
Гістидин	3,89 $\pm$ 0,36	3,39 $\pm$ 0,48	3,66 $\pm$ 1,27	3,65 $\pm$ 0,52
Аргінін	49,30 $\pm$ 3,96	51,33 $\pm$ 4,90	51,44 $\pm$ 4,45	50,63 $\pm$ 2,21
Гідроксипролін	79,12 $\pm$ 5,73	113,81 $\pm$ 2,87*	104,47 $\pm$ 10,91	101,80 $\pm$ 11,06
Аспарагінова к-та	47,97 $\pm$ 1,31	34,10 $\pm$ 1,93*	32,43 $\pm$ 0,93*	34,62 $\pm$ 2,24
Треонін	18,33 $\pm$ 1,51	18,49 $\pm$ 2,92	19,14 $\pm$ 0,98	19,08 $\pm$ 2,76
Серин	51,61 $\pm$ 1,72	38,22 $\pm$ 0,24*	27,86 $\pm$ 1,98*	39,66 $\pm$ 1,26**
Глутамінова к-та	74,92 $\pm$ 1,70	72,73 $\pm$ 0,22	76,58 $\pm$ 3,85	75,87 $\pm$ 1,81
Пролін	114,00 $\pm$ 3,57	125,26 $\pm$ 5,54	127,13 $\pm$ 3,02*	126,66 $\pm$ 1,41*
Гліцин	322,77 $\pm$ 6,95	328,82 $\pm$ 1,00	328,07 $\pm$ 3,54	327,23 $\pm$ 9,35
Аланін	128,00 $\pm$ 3,51	1 08,44 $\pm$ 5,35*	109,25 $\pm$ 2,34*	110,01 $\pm$ 2,44
Валін	27,93 $\pm$ 2,97	21,86 $\pm$ 0,55*	22,79 $\pm$ 1,82	25,54 $\pm$ 2,52
Метіонін	4,28 $\pm$ 0,56	0,44 $\pm$ 0,25*	0,88 $\pm$ 0,45	0,74 $\pm$ 0,25
Ізолейцин	8,21 $\pm$ 1,22	9,54 $\pm$ 0,44	9,25 $\pm$ 0,73	9,33 $\pm$ 0,27
Лейцин	24,26 $\pm$ 0,65	22,89 $\pm$ 0,30	24,03 $\pm$ 1,00	22,75 $\pm$ 1,43
Тирозин	2,49 $\pm$ 0,48	2,33 $\pm$ 0,42	2,34 $\pm$ 0,19	2,46 $\pm$ 0,13
Фенілаланін	13,27 $\pm$ 0,44	11,58 $\pm$ 0,44*	11,67 $\pm$ 0,21*	10,90 $\pm$ 0,67*
Гідроксилізін	5,86 $\pm$ 0,22	5,19 $\pm$ 0,34	6,12 $\pm$ 0,98	5,33 $\pm$ 0,40

*– $p < 0,05$ щодо контролю; **– $p < 0,05$ щодо дослідної групи II (у групі III)

Ураховуючи вірогідне зниження вмісту фенілаланіну в колагені I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена, незалежно від забезпеченості раціону білком, було цікавим з'ясування залежності цього параметра від екзогенного навантаження фенілаланіном.

Результати вивчення впливу навантаження фенілаланіном на фоні безбілкового раціону на амінокислотний склад колагену I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена (дослідна група III) свідчать, що введення підвищених кількостей даної амінокислоти приводить до суттєвої нормалізації якісного складу даного сполучнотканинного білка. Вірогідні відмінності відмічено лише за вмістом 3 амінокислот: знижувався вміст серину (на 23 %) і фенілаланіну (на 18 %), одночасно зростав вміст проліну (на 11 %). До того ж, введення фенілаланіну вело до вірогідного послаблення змін щодо серину порівняно з дослідною групою II.

Такий характер змін свідчить, що навантаження фенілаланіном на фоні безбілкового раціону здатне нормалізувати якісні зміни в амінокислотному складі колагену I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена. Той факт, що екзогенним введенням фенілаланіну не вдається компенсувати зміни вмісту даної амінокислоти у складі колагену, цілком узгоджується з даними інших авторів щодо великого ступеня незалежності кількості вільного внутрішньоклітинного фенілаланіну, який використовується для синтезу білка, від факторів харчування [5], на відміну від вмісту інших амінокислот.

Таким чином, екзогенний фенілаланін здатний виступати в якості регулятора якісних змін у структурі сполучнотканинних білків за умов розвитку неопластичного процесу.

Висновки. 1. Проведені дослідження показали здатність навантаження раціону фенілаланіном суттєво нормалізувати якісні зміни у колагені I типу шкіри щурів, уражених карциномою Герена. 2. Екзогенне навантаження раціону фенілаланіном у ході формування пухлин не дозволяло повністю компенсувати зниження вмісту даної амінокислоти в складі колагену за умов розвитку неопластичного процесу.

1. Нефедов Л.И., Угляница К.Н., Солдатов В.С. и др. // Весті АН Бєларусі. Сер. біял. наук. – 1998. – № 4. – С. 61–69.
2. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Заутка М.У., Безверхая И.С. Аминокислоты в медицине. – Киев, 1982.
3. Donlon J., Fallon B., Barrett P. et al. // Biochem. Soc. Trans. – 1998. – Vol. 26, № 1. – S. 64.
4. Thorpe J.M., Roberts S.A., Ball R.O., Penchatz P.B. // FASEB J. – 1997. – Vol. 11, № 3. – P. 149.
5. Zhang X.-J., Chinkes D.L., Doyle D., Wolfe R.R. // Amer. J. Physiol. – 1998. – Vol. 274, № 3, Pt. 1. – P. 484–492.
6. Trelstad R.L., Catanese V.M., Rubin D.T. // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 71, № 1. – P. 114–118.
7. Маурер Г. Диск-электрофорез. – М., 1971.
8. Бенсон Д.В., Патерсон Д.А. // Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. – М., 1974. – С. 9–84.
9. Ramachandran G.N. Biochemistry of collagen. – New York; London, 1976.
10. Loeser R.F., Walling R. // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol. 266, № 14. – P. 9459–9462.
11. Kofford M.W., Schwartz L.B., Schechter N.M. et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, № 11. – P. 7127–7131.

Надійшла до редколегії 29.09.04

УДК 577.391.152.173

І.К. Кисельова, інж, А.В. Майданюк, канд. біол. наук,
С.П. Імедадзе, пров. інжен.**ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КСАНТИНООКСИДАЗНОЇ РЕАКЦІЇ ТИМУСА ЩУРІВ***Експериментально визначено ксантинооксидазну активність тимуса щурів. Визначено кінетичні константи (K_m та V_{max}) даної ферментативної реакції.**Xanthine oxidase activity of rat thymus is studied. The kinetic parameters (K_m and V_{max}) of enzyme reaction are determined.*

Вступ. В останні роки ретельно вивчалась дія ксантинооксидазно-дегідрогеназної системи в клітині. Відомо, що ксантинооксидаза (КФ: 1.1.3.2) каталізує перетворення гіпоксантину в ксантин і далі до сечової кислоти [1]. З 80-х років минулого століття вивчення ксантинооксидази стає все актуальнішим у зв'язку з відкриттям супероксидутворювальної, канцерогенної та апоптогенної активностей ферменту [1]. Апоптичний вплив ксантинооксидази реалізується через генерацію супероксиду, а також NO. [2]. Супероксид або NO (але не пероксинитрит) взаємодіє з тиореоксидом, вивільнює зв'язану з ним треонін/тирозинову протеїнкіназу ASK-1 (Apoptotik signal regulating kinase 1), яка відповідає за активацію експресії гена, який кодує білок p53 – апоптогенний білок [3]. Цей білок перешкоджає можливості мітотичного поділу клітини, пригнічує активність мітогенного фактора MPF. MPF складається з цикліну A, який зв'язується з тирозиновою протеїнкіназою p33cdk2. Комплекс циклін-A-p33cdk2 зв'язується у свою чергу з фактором транскрипції U2F і фосфорилує білок p107Rb – частину мітогенного фактора MPF, а потім викликає синтез білка p21 – інгібітора циклінзалежних протеїнкіназ [3].

Ксантинооксидаза присутня практично в усіх тканинах тваринного організму. Найбільша питома активність спостерігається в печінці й цитозолі гепатоцитів. Усе наведене свідчить про актуальність визначення активності ксантинооксидази, тому мета даної роботи полягала у визначенні кінетичних констант (K_m і V_m) ксантинооксидазної реакції тимуса щурів.

Матеріали та методи. У роботі використовували білих безпородних щурів масою 130–150 г, яких утри-

мували на стандартному раціоні віварію. Тимус гомогенізували в гомогенізаторі Поттера в 0,1 моль/л калійфосфатному буфері, pH 7,8. Гомогенат центрифугували 30 хв при 5000 об./хв на центрифугі К – 23, супернатант (тобто цитозольну фракцію тимуса) використовували в досліді. Усі операції проводили при температурі 4 °С. Білок визначали за методом Лоурі.

Швидкість ксантинооксидазної реакції визначали спектрофотометрично за утворенням сечової кислоти з використанням як субстрату гіпоксантину [4]. Результати статистично обробляли за стандартними методами.

Результати та їх обговорення. Під час дослідження ксантинооксидазної реакції за різних концентрацій ферменту лінійність спостерігалась при 150 мкг ферменту на пробу та до 30 хв інкубації. Тому подальші дослідження проводились за цієї концентрації білка. Експериментальне дослідження залежності утворення продукту в часі за різних концентрацій субстрату (табл. 1) дала можливість установити лінійність цієї залежності при трьох досліджуваних концентраціях субстрату до 30 хв інкубації. Саме ця прямопропорційна залежність утворення продукту в часі дала можливість визначити початкову швидкість (V_0). Значення цієї величини наведені в табл. 1, графічне зображення їх указує на те, що залежність V_0 від S є гіперболічною, тобто кінетика ксантинооксидазної реакції тимусу підлягає кінетиці Міхаелеса – Ментен. За допомогою методів подвійних зворотних величин (Лайнуївера – Берка) і за методом Едді – Хофсті визначили кінетичні константи (K_m і V_{max}) даної ферментативної реакції.

Таблиця 1. Швидкість ксантинооксидазної реакції тимуса щурів

1. Залежність утворення Р*нмоль (сечової кислоти) в часі при різних концентраціях субстрату (150 мкг білка)				
Час інкубації, хв	10	15	20	30
0,04 ммоль/л	1,7 ± 0,3	2,5 ± 0,6	3,5 ± 0,7	5,7 ± 0,5
0,15 ммоль/л	4,7 ± 0,4	7,0 ± 0,5	9,4 ± 0,8	14 ± 0,7
2 ммоль/л	10 ± 0,4	15 ± 0,7	20 ± 0,9	28 ± 1,0
2. Залежність початкової швидкості (V_0) від концентрації субстрату (гіпоксантину)				
Концентрація гіпоксантину, ммоль/л	0,04	0,15	2	
V_0 нмоль/хв · мг	1,33 ± 0,5	3,33 ± 1,2	6,67 ± 1,5	
3. Значення кінетичних констант ксантинооксидазної реакції				
K_m		V_{max}		
0,133 ммоль/л		7,4 нмоль/хв · мг		

Примітки: Р* – продукт ксантинооксидазної реакції = (сечова кислота).

Висновки. З аналізу одержаних результатів можна зробити висновок про те, що насичуючою концентрацією субстрату є мілімольні концентрації (1–2 ммоль/л) і саме за таких концентрацій гіпоксантину необхідно визначати активність ферменту. З літературних даних відомо, що питома активність ксантинооксидази в печінці становить 1,8 мкмоль/хв·мг білка [5]. Визначена нами активність ферменту тимуса становить 7,4 нмоль/хв·мг, що збігається з даними про те, що активність ксантино-

оксидази в печінці є найбільшою порівняно з іншими органами.

1. Мазда Х., Акаїке Т. // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – С. 1007–1020.
2. Rollet-Labelle E., Grange M.J., Marquetty C. // Free radik. biol. med. – 1998. – Vol. 24, № 4. – Р. 563–572.
3. Матильшевская О.П. // Укр. биохим. журн. – 1998. – Т. 70, № 5. – С. 15–30.
4. Stirpe F., Lella Corte E // J. Biol. Chem. 1969. – Vol. 244, № 14. – Р. 3855–3863.
5. Krenitsky T.A., Spector T., Hall W.W. // Archives biochem. biophys. – 1986. – Vol. 247 (1). – Р. 108–109.

Надійшла до редколегії 29.09.04

УДК 574:575:631

Т.В. Мариненко, інж., І.А. Козерецька, канд. біол. наук,
І.М. Топчій, С.Г. Корсун, канд. сільск.-госп. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ ОПОСЕРЕДКОВАНОГО ВПЛИВУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ГЕНЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Досліджено вплив важких металів на частоту летальних мутацій і частоту рекомбінації в статевій хромосомі *Drosophila melanogaster* в умовах агросистеми. Установлено, що підвищення вмісту важких металів у ґрунті впливає на генетичну активність водних екстрактів і не впливає на генетичну активність зерна, вирощеного в умовах забруднення.

It was investigated the heavy metals influence on frequency of lethal mutations and recombination processes in X chromosome of *Drosophila melanogaster* in agricultural system framework. We have established the influence of the increasing salt concentration on water extracts genetic activity. No influence was observed on genetic activity of seeds, growing in environmental pollution.

Вступ. Забруднення навколишнього середовища – одна з важливих проблем сьогодення. Серед великої кількості речовин, які є факторами забруднення, особливе місце посідають важкі метали, це пов'язано з потенційною небезпечністю більшості з них. У навколишнє середовище важкі метали потрапляють у вигляді твердих часток, солей або аерозолів. Осідаючи, вони, головним чином, депонуються в поверхневих шарах ґрунту. Надлишок політантів у ґрунті призводить до підвищення їхньої концентрації в природних водах. Важливим компонентом будь-якої екосистеми є рослини, для яких ґрунтові води – основний шлях мінерального живлення. Рослини, у свою чергу, виконують роль проміжної ланки в трофічному ланцюгу ґрунт – рослина – тварина (людина).

Наведені в різних літературних джерелах гранично допустимі кількості (ГДК) важких металів у ґрунті та сільськогосподарській продукції досить суперечливі й недостатньо аргументовані. Отже, існує необхідність проведення детального вивчення стану окремих компонентів екосистеми, які зазнають впливу політантів, і визначення характеру міграції їх у трофічному ланцюгу, починаючи з ґрунту. Одним із факторів, який безпосередньо слід враховувати при вивченні дії того чи іншого чинника на біологічні об'єкти, є його генетична активність. В основі спадкових змін лежать механізми, що забезпечують усьому живому дві універсальні його властивості: спадковість і мінливість. При величезному різноманітті форм живої матерії на Землі, багатьом молекулярним процесам притаманний консерватизм. Класичним генетичним об'єктом і визнаною у світі тест-системою є *Drosophila melanogaster*. На цьому тест-об'єкті можна *in vivo* проаналізувати можливість індукції генних мутацій, делецій і майже всіх можливих типів хромосомних перебудов як у гонадах, так і в соматичних тканинах [1].

Роботи з вивчення дії важких металів на генетичні процеси ведуться вже досить давно. Відомо, що розчини солей свинцю та кадмію викликають порушення процесів реплікації, зменшують точність копіювання ДНК, а розчин хлориду цинку спричиняє зсув рамки читування [2]. Але в досліджах *in vivo* мутагенну активність свинцю та кадмію вдавалось зафіксувати лише за дії в комплексі з іншими шкідливими факторами, унаслідок підсилення дії інших мутагенів або утворення мутагенних комплексів. Тому на даний час домінуючою є думка про їхню опосередковану мутагенну дію. [3–7].

Метою роботи було дослідити опосередкований вплив важких металів на генетичні процеси в умовах агроценозу, використовуючи класичний тест-об'єкт *Drosophila melanogaster*.

Об'єкт і матеріали досліджень. У нашій роботі як фактор впливу на тест-систему були використані водні екстракти ґрунтів, що протягом двох років перебували під впливом забруднення певними дозами свинцю (до-

слід проводили в модельних лабораторних умовах), і зерно сої, ячменю та пшениці, вирощене на ділянках з різним рівнем забруднення свинцем, кадмієм і цинком. Польові дослідження було проведено на території дослідного господарства "Чабани" Інституту землеробства УААН. ґрунт дослідної ділянки та використаний у лабораторних умовах – сірий лісовий крупнопилувато-легкосуглинковий. Штучне забруднення ґрунтів здійснювалось за рахунок внесення важких металів у формі нітратів. Вміст політантів у досліджуваних зразках визначали методом атомної абсорбції [8].

Аналіз впливу на геном дрозофіли здійснювали за допомогою загальноприйнятих у генетиці підходів [9]. Мух утримували при температурі 25 °С у склянках об'ємом 50 мл [10]. Водні екстракти та гомогенізовані зерна вносились до поживного середовища. У контрольному варіанті були використані вода з водопровідної мережі Голосіївського району м. Києва та манна крупа, придбана в торгівельній мережі.

Були використані два тести: тест на частоту летальних мутацій і тест на частоту рекомбінації в статевій хромосомі *Drosophila melanogaster*. Перший мав продемонструвати мутагенність досліджуваного фактора, а другий – його вплив на адаптаційну здатність організму.

У тесті на зчеплені з X хромосомою летальні мутації були використані дві лінії *Drosophila melanogaster*: лінія дикого типу (Canton S) і лінія C(1)DX зі зчепленими X хромосомами, яка маркована мутацією *yellow* (y, 1–0,0) [1]. Дії досліджуваного фактора піддавали самців дикого типу, які розвивались на середовищі, до складу якого було введено або екстракт ґрунту, або зерно досліджуваних сільськогосподарських культур. Оброблених самців переносили до стандартного поживного середовища й схрещували з віргінними самками лінії C(1)DX. Аналіз потомства проводили в першому поколінні. Статистичну обробку даних тесту проводили за допомогою методу χ^2 [11].

У тесті на частоту рекомбінаційних подій у статевій хромосомі *Drosophila melanogaster* використовували лінію дикого типу Canton S і лінію *wct*, що маркована рецесивними мутаціями *white* (w, 1–1,5) і *cut* (ct, 1–20). Самців дикого типу схрещували з віргінними самками лінії *wct* і протягом одного покоління утримували на поживному середовищі, до складу якого було введено або екстракт ґрунту, або зерно досліджуваних сільськогосподарських культур. Нашадків першого покоління пересаджували на стандартне середовище. Підрахунок частоти кросинговеру проводили в другому поколінні. У кожному варіанті дослідження було проаналізовано понад 1500 особин. Похибку дослідження обчислювали за формулою

$$\pm \sqrt{\frac{k\% \cdot (100 - k\%)}{N}},$$

де $k\%$ – коефіцієнт кросинговеру, N – загальна кількість особин [10].

Результати та їх обговорення. Як правило, на тест-об'єкт впливають безпосередньо конкретним фактором, дію якого вивчають, але в природних умовах живі організми перебувають під впливом цілого комплексу факторів. Ураховуючи, що свинець і кадмій можуть підсилювати дію інших мутагенних факторів, дослідження впливу цих металів необхідно проводити з максимальним наближенням до умов навколишнього середовища. Особливо важливо це в агросистемах в умовах усе зростаючої інтенсифікації сільського господарства. На акумулятивну здатність рослин може впливати багато різних факторів, зокрема індивідуальні особливості видів [12]. Саме тому в роботі було використано декілька сільськогосподарських культур.

За результатами спектрофотометричного аналізу встановлено:

- ♦ для всіх варіантів проаналізованих культур вміст важких металів у зерні перевищував гранично допустимі кількості, навіть при вирощуванні на ґрунті з природним рівнем забруднення;

- ♦ для всіх проаналізованих культур спостерігалась лінійна залежність вмісту важких металів в зерні та в ґрунті;

- ♦ культури відрізнялись за акумулятивною здатністю, найвищі кількості свинцю були зафіксовані в зерні сої;

- ♦ визначення вмісту свинцю у водорозчинних екстрактах ґрунту обмежувалось роздільною здатністю приладу (дослід проводили з точністю до 0,01). Для порівняння було проведено аналіз кислоторозчинної фракції ґрунту на вміст свинцю. Згідно з цим дослідом підвищення свинцю в ґрунті супроводжувалось збільшенням його кислоторозчинних форм.

Тест на зчеплені зі статтю летальні мутації у *Drosophila melanogaster*. Тест на зчеплені з X хромосою летальні мутації вважається найбільш чутливим і надійним у дослідженнях на дрозофілі й дозволяє виявити хімічні сполуки, які здатні індукувати спадкові генетичні порушення різної природи: точкові мутації, делеції, різні перебудови. У лінії C(1)DX кількість самців перевищує кількість самок з відхиленням від звичайного розподілу 1:1 і відповідає співвідношенню 3:2.

Таблиця 1. Результати тестів на частоту летальних мутацій і частоту рекомбінації в статевій хромосомі *Drosophila melanogaster*

Варіант досліджу	Насичення ґрунту важкими металами поза фоном*, мг/кг ґрунту	Коефіцієнт рекомбінації, %	Частота летальних мутацій
контроль			
1	–	18,5 ± 1,9	
Водні екстракти ґрунтів			
2	Pb ₀	21,84 ± 2,2	На рівні контролю
3	Pb ₅	18,66 ± 1,9	Вища за контроль
4	Pb ₂₀	18,59 ± 1,9	– " –
5	Pb ₅₀	23,06 ± 2,3	–
6	Pb ₁₀₀	16,78 ± 1,7	–
7	Pb ₂₀₀	11,84 ± 1,2	Вища за контроль
8	Pb ₅₀₀	20,28 ± 2,8	– " –
Зерно пшениці, вирощене на природному та геоаномальних ґрунтових фонах			
9	Pb ₀ Zn ₀ Cd ₀	14,96 ± 1,8	На рівні контролю
10	Pb ₁₀₀ Zn ₅₀ Cd ₂	20,09 ± 2,06	– " –
11	Pb ₁₀₀₀ Zn ₅₀₀ Cd ₂₀	16,41 ± 1,77	– " –
Зерно ячменю, вирощене на природному та геоаномальних ґрунтових фонах			
12	Pb ₀ Zn ₀ Cd ₀	19,64 ± 3,8	На рівні контролю
13	Pb ₁₀₀ Zn ₅₀ Cd ₂	19,13 ± 1,49	– " –
14	Pb ₁₀₀₀ Zn ₅₀₀ Cd ₂₀	23,36 ± 4,01	– " –
Зерно сої, вирощене на природному та геоаномальних ґрунтових фонах			
15	Pb ₀ Zn ₀ Cd ₀	19,51 ± 1,96	На рівні контролю
16	Pb ₁₀₀ Zn ₅₀ Cd ₂	18,38 ± 0,93	– " –
17	Pb ₁₀₀₀ Zn ₅₀₀ Cd ₂₀	21,6 ± 2,83	– " –

*Фон – це природний вміст важких металів у конкретному досліджуваному ґрунті (для використаного в дослідженні ґрунту – Pb – 10, Zn – 5, Cd – 0,2 мг/кг ґрунту)

Згідно з даними, наведеними в табл.1, частота летальних мутацій у контролі та у варіанті досліджу з використанням водної витяжки ґрунту з природним фоном забруднення свинцем, статистично не відрізняється. Статистично достовірних відхилень щодо частоти летальних мутацій не спостерігалось і у варіантах дослідження, в яких як фактор впливу використовували зерно сільськогосподарських культур (варіанти з 9 по 17). Деякі інші результати були зафіксовані при аналізі водних екстрактів ґрунтів, до яких було додатково внесено певні кількості свинцю. З таблиці видно, що внесення в ґрунт додаткових доз свинцю призводило до підвищення частоти летальних мутацій, навіть у кількості 5 мг/кг ґрунту. Найвищу частоту летальних мутацій було зафіксовано в 7 варіанті досліджу.

Тест на частоту рекомбінаційних подій у статевих хромосомах *Drosophila melanogaster* на ділянці між генами *w* і *st*. Основою біологічного різно-

маніття є мінливість різних організмів. Одним з типів мінливості є так звана комбінаторна мінливість, яка, з одного боку, базується на перекомбінуванні хромосом в процесі мейозу, з іншого боку, – на механізмах гомологічної рекомбінації, яку також називають кросинговером. Фактори, що впливають на частоту кросинговеру можуть призводити як до зниження, так і до підвищення частоти рекомбінації. Тому вплив таких факторів не може бути байдужим для виду в цілому [13].

Відповідно до результатів, поданих у табл. 1, статистично достовірні відхилення від контролю були відмічені лише в 7 варіанті досліджу. Тобто лише внесення в ґрунт додаткових кількостей свинцю в розмірі 200 мг/кг призводило до зниження частоти рекомбінації, в усіх інших варіантах досліджу впливу аналізованого фактора не зафіксовано.

Згідно з результатами проведеного дослідження підвищення вмісту важких металів у ґрунті до 100 фонів

супроводжується зростанням їхніх концентрацій у зерні сої, ячменю та пшениці, але відповідно до обох тестів не впливає на генетичну активність зерна. При аналізі водних витяжок ґрунту лінійної залежності між вмістом свинцю в ґрунті та силою і характером впливу водних екстрактів на генетичні процеси у дрозофіли не встановлено, незважаючи на те, що навіть внесення в ґрунт свинцю в дозі 5 мг/кг сухої маси призводило до підвищення частоти мутацій. Безперечно цікавим є той факт, що найвищу частоту летальних мутацій та єдине статистично достовірне відхилення частоти рекомбінації було зафіксовано в 7 варіанті досліду (Pb₂₀₀), але слід ураховувати, що ґрунт – це складна екосистема і незначний вплив неврахованого фактора може позначитись на результатах дослідів.

Тест на частоту летальних мутацій в статевій хромосомі *D. melanogaster* при аналізі водних екстрактів ґрунту виявився більш показовим, ніж метод атомної абсорбції. Отже, необхідно поглиблювати дослідження з використанням *D. melanogaster* – як біотестом в агроландшафтах, оскільки це дає можливість виявити екологічний дисбаланс в системі на первинних етапах токсикологічного забруднення компонентів агросистеми й локалізувати його на першій ланці трофічного ланцюга – ґрунті.

Висновки. 1. Внесення в ґрунт свинцю в кількості 200 мг/кг ґрунту призводить до зниження частоти рекомбінації в статевій хромосомі *Drosophila melanogaster*. на ділянці між генами *w* і *ct*.

2. Внесення в ґрунт свинцю в кількості від 5 до 500 мг/кг сухого ґрунту призводить до підвищення частоти летальних мутацій у статевій хромосомі *Drosophila melanogaster*.

3. Не встановлено лінійної залежності між дозами свинцю в ґрунті й силою і характером впливу водних витяжок ґрунтів на генетичні процеси у дрозофіли.

4. Підвищення рівня важких металів у ґрунті до 100 фонів не впливає на генетичну активність зерна сої, ячменю та пшениці, вирощеного в умовах забруднення.

5. З'ясування причин виявлених закономірностей опосередкованого впливу важких металів на генетичні процеси у *D. melanogaster* потребує подальшого вивчення.

1. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. – М., 1989. – С. 97–108. 2. Рушковский С.П. Особенности проявления хромосомной нестабильности при культивировании лимфоцитов периферической крови человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 1994. – С. 10–12. 3. Бессонова В.П. Цитогенетические эффекты воздействия тяжелых металлов на рост и развитие растений. – Запорожье, 1999. 4. Baker D.E., Chesnin L. // *Advances in Agronomy*. – 1975. – Vol. 27. – P. 306–366. 5. Gerber G.B., Leonard A., Jaquet P. // *Advances in Agronomy*. – 1980. – Vol. 76. – № 2. – P. 115–141. 6. Cottenie A., Verloo M. // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 1984. – Vol. 317, № 3-4. – P. 389–393. 7. Vaglenov A., Carbonel E., Marcos R. Biomonitoring of workers exposed to lead. Genotoxic effects, its modulation by poliviramin treatment and evaluation of the induced radioresistance // *Mutation research* // 1998. – Vol. 418. – P. 79–92. 8. Бессонова В.П. Методи фітоіндикації в оцінці екологічного стану довкілля. – Запорожжя, 2001. – С. 170–186. 9. Roberts D.B. *Drosophila* a practical approach. – Oxford, 1986. 10. Медведев Н.Н. Практическая генетика. – М., 1965. – С. 158–176. 11. Ватти К.В., Тухомирова М.М. Руководство к практическим занятиям по генетике. – М., 1979. – С. 43–46. 12. Березина Ю.М. Возрастная ценопопуляций *Taraxacum officinale* s. l. и химические загрязнения // *Фундаментальные и прикладные проблемы популяционной биологии: Тез. докл. VI Всерос. популяц. семинара, Нижний Тагил, 2–6 дек. 2002 г.* – Нижний Тагил, 2002. – С. 53–55. 13. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. – М., 1985. – С. 228–258.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 582.232

Н.А. Воробей, провід. інж., С.Я. Коць, д-р біол. наук,
О.В. Пацко, студ., Т.В. Паршикова, д-р біол. наук

ВПЛИВ ІНОКУЛЯЦІЇ НАСІННЯ АЗОТФІКСУЮЧИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ НА РІСТ І РОЗВИТОК РОСЛИН ЛЮЦЕРНИ

Проведено мікроевгеційні дослідження щодо використання для стимуляції росту рослин люцерни моно- та бінарних інокулятів, створених на основі бульбочкових бактерій і водорості. Одержані результати свідчать про необхідність підбору найефективніших композицій азотфіксуючих мікроорганізмів, способу їх внесення та визначення співвідношення інокуляційних агентів.

The guide microvegetation experiment of using mono-and binaries inoculus for stimulation of plants growing (created on the base of Rhizobiums and algae). It was found necessity of selection the most effective complexes of nitrofixation microorganisms, the way of their bringing and determinated the correlation of inoculus agents.

Вступ. Забезпечення рослин достатньою кількістю азоту є важливою і достатньо гострою проблемою сучасного землеробства. Негативні зміни азотфіксуючої здатності мікрофлори ґрунтів унаслідок різноманітних причин (хімізації, нестачі вологи, органічних сполук тощо) ускладнюють проблеми створення продуктивних азотфіксуючих симбіозів мікроорганізмів у зоні кореневих систем навіть таких бобових рослин, як люцерна (*Medicago L.*). Це й зумовлює необхідність пошуку шляхів формування ефективних симбіотичних ценозів азотфіксаторів за рахунок різноманітних живих культур мікроорганізмів, що здатні зв'язувати атмосферний азот [1]. Ефективна взаємодія мікро- і макроорганізмів у симбіотичній системі діазотрофи – рослина забезпечує активацію процесу фіксації атмосферного азоту, продукування біологічно активних сполук, під впливом яких поліпшується живлення рослин, підвищується їхня продуктивність, поліпшується якість сільськогосподарської продукції.

Пошук організмів, здатних виступати як інокуляційні агенти і формувати симбіози на коренях рослин [2],

а також створення на їх основі біопрепаратів для ефективного використання біологічного азоту можна вважати стратегічним напрямом досліджень у сфері симбіотичної та асоціативної азотфіксації. Це відкриває широку перспективу підвищення продуктивності агробіоценозів, а також можливість усунення загрози нітратного забруднення одержаної рослинної продукції, що має особливе значення для приготування екологічно чистих кормів.

Метою наших досліджень було вивчення взаємодії ряду мікроорганізмів із числа бактерій і синьозелених водоростей, здатних до азотфіксації, з люцерною як фактора відповідного підвищення родючості ґрунтів, урожайності рослин і поліпшення якості сільськогосподарської продукції.

Об'єкт і матеріали досліджень. Об'єктом досліджень була люцерна посівна (*Medicago sativa*) сорту Ярославна. Для інокуляції насіння люцерни були залучені виробничий штам 425a *Sinorhizobium meliloti* (раніше *Rhizobium*) із колекції ІФРГ НАН України (Київ), три його Tn5-транспозонові мутанти (Т37, Т38, Т39), які були

отримані раніше при використанні неспецифічного транспозонового мутагенезу за допомогою процедури описаної в літературі [3], а також азотфіксуюча синьо-зелена водорість *Amorphanostoc punctiforme* (Kutz.) Elenk. (= *Nostoc punctiforme* (Kutz.) Hariot). Транспозанти бульбачкових бактерій були відібрані в попередніх дослідженнях за ознакою підвищеної симбіотичної активності.

Штам *S. meliloti* 425a культивували при температурі +28 °C на середовищі 79, транспозанти – на середовищі 79 з канамицином (200 мкг/мл). Культуру водорості вирощували до стаціонарної фази росту на поживному середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера й Горема (N 11) при температурі 20±2 °C та освітленні 6,6–7,4 Вт/м². Концентрацію хлорофілу визначали спектрофотометричним методом [4], а показник рівня життєздатності клітин або величину їхньої потенціальної фотосинтетичної активності – за різницею в інтенсивності флуоресценції до і після внесення симазину як інгібітора електронного транспорту фотосинтезуючих клітин [4].

Рослини люцерни досліджували в умовах мікрорегіональних дослідів. Для визначення ефективності інокуляції люцерни різними мікросимбіонтами були проведені напівстерильні дослідів *in vitro* за відомим у літературі експрес-методом [5], окремі моменти якого були нами модифіковані. Насіння люцерни стерилізували концентрованою сірчаною кислотою 5 хв, промивали дистильованою водою, пророщували на голодному агарі в чашках Петрі дві доби при температурі 28 °C до появи корінця довжиною 3–6 мм. Проросле насіння клали по 2 шт. у кожен пробірочку об'ємом 80 мл, заповнену 5 г стерильного перліту (стерилізація при 1,5 атм. 2 год, pH 6,9–7,0). Поживним середовищем для макроорганізмів

служувало рідке середовище Красильникова – Кореняко з мікроелементами без внесення азоту. Через добу проростки люцерни в пробірках інокулювали суспензією бульбачкових бактерій (1мл, концентрація ~10⁸ кл/мл), суспензією водорості (1 мл) або сумішшю ризобії+ *A. punctiforme* у співвідношенні 1:1. Інокульовані рослини вирощували при температурі 20–25 °C при 16-годинному фотоперіоді й додатковому освітленні робочої поверхні, яке в сумі становило 40000 лк. Дослід проводили у 5 кратній повторності. Після 30 діб вегетації рослин пробірки герметично закривали стоперами з резиновими мембранами, через яку шприцом вводили ацетилен у концентрації 10 % від робочого об'єму й залишали на 24 год при 25 °C. Кількість етилену, утвореного в результаті відновлення ацетилену в етилен ферментативною системою діазотрофів або їхніх асоціацій, визначали за методом Харді [6] на газовому хроматографі "Chromatograph-504" з полум'яно-іонізаційним детектором і виражали у мікромолях утвореного етилену за 24 год (нмоль C₂H₄/24 год).

Ефективність симбіотичних асоціацій оцінювали за приростом біомаси надземної частини рослин (мг), висотою пагонів (мм), довжиною коренів (мм), кількістю кореневих бульбочок і показником ацетиленвідновлювальної активності транспозантів *S. meliloti* та синьо-зеленої водорості.

Під час опрацювання одержаних даних використовували методи математичної статистики [7].

Результати та їх обговорення. Основні показники життєздатності водорості *Amorphanostoc punctiforme* наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Вміст хлорофілу та потенційна фотосинтетична активність (F) у мікрорегіональній водорості *A. punctiforme*

Варіант	C _{хл} , мкг/л	F
<i>Amorphanostoc punctiforme</i> (Kutz.) Elenk.	3241,2 ± 16,7	0,128

Результати досліджень показали, що в умовах стерильного мікрорегіонального дослідів водорість *A. punctiforme* мала найбільший рівень ацетиленвіднов-

лювальної активності порівняно з іншими залученими для інокуляції діазотрофами (табл. 2).

Таблиця 2. Ацетиленвідновлювальна активність *Amorphanostoc punctiforme* й кореневих бульбочок, утворених транспозантами *S. meliloti* 425a за дії моно- та бінарної інокуляції ними люцерни

Варіант	Ацетиленвідновлювальна активність, нмоль C ₂ H ₄ /(24 год-посудину)	Кількість бульбочок, шт.
Контроль 1. Без інокуляції	0	0
Контроль 2. Інокуляція <i>S. meliloti</i> 425a	276,14 ± 7,23	4,60 ± 0,40
Контроль 3 Інокуляція <i>A. punctiforme</i>	925,81 ± 55,88	0,00 ± 0,00
Інокуляція <i>S. meliloti</i> 425a + <i>A. punctiforme</i>	182,58 ± 9,28	1,50 ± 0,95
Інокуляція Т37	323,34 ± 21,00	4,60 ± 0,40
Інокуляція Т37+ <i>A. punctiforme</i>	417,54 ± 28,42	2,66 ± 0,33
Інокуляція Т38	442,39 ± 17,64	5,25 ± 0,47
Інокуляція Т38+ <i>A. punctiforme</i>	203,56 ± 11,76	0,00 ± 0,00
Інокуляція Т39	291,24 ± 18,72	5,40 ± 0,40

За цим показником вона перевищувала виробничий штам бульбачкових бактерій *S. meliloti* 425a і перспективний мікросимбіонт-транспозант Т38 у 3,35 і 1,6 рази відповідно. Але прямої кореляції між показником високої ацетиленвідновлювальної активності клітин *A. Punctiforme* і надземною масою інокульованих ними рослин люцерни не виявлено.

Стимулюючий вплив бінарної інокуляції на ріст надземної маси, висоту пагона й довжину кореня люцерни спостерігався лише у варіантах дослідів, де для інокуляції проростків рослин застосовували суміші діазотрофів *S. meliloti* 425a+*A. punctiforme* та Т37+*A. Punctiforme*. За цими показниками досліджувані варіанти переважали всі три контрольні варіанти. Рослини люцерни

в указаних варіантах дослідів мали насичено зелене забарвлення, що свідчить про достатнє азотне живлення рослин. Під впливом інокуляції сумішами *S. meliloti* 425a+*A. punctiforme* та Т37+*A. punctiforme* утворювались фізіологічно-активні бульбочки на коренях люцерни, але їх кількість була значно меншою ніж за моноінокуляції ризобіальними клітинами. У варіантах дослідів, де проростки рослин були інокульовані за участю лише клітин водорості, виявлено найбільшу довжину коренів.

У дослідних варіантах, де як інокулянти були застосовані бінарні суміші (бульбачкових бактерій і клітин водоростей) Т38 +*A. punctiforme* і Т39+*A. punctiforme* – ріст рослин був суттєво пригнічений (табл. 3)

Таблиця 3. Вплив моно- та бінарної інокуляції транспозантами *S. meliloti* 425a і *A. punctiforme* на ріст і розвиток рослин люцерни сорту Ярославна в умовах мікровегетаційного досліджу

Варіант	Надземна маса, мг	Висота пагону, мм	Довжина кореня, мм
Контроль 1. Без інокуляції	37,40 ± 3,00	31,60 ± 0,54	84,70 ± 3,23
Контроль 2. Інокуляція <i>S. meliloti</i> 425a	46,90 ± 1,64	37,20 ± 1,23	87,23 ± 4,52
Контроль 3 Інокуляція <i>A. punctiforme</i>	29,16 ± 3,70	32,62 ± 2,03	113,37 ± 6,24
Інокуляція <i>S. meliloti</i> 425a+ <i>A. punctiforme</i>	50,90 ± 2,49	42,60 ± 2,39	109,20 ± 6,68
Інокуляція T37	52,10 ± 2,18	39,70 ± 1,70	86,40 ± 2,65
Інокуляція T37+ <i>A. punctiforme</i>	55,00 ± 2,70	44,50 ± 1,32	109,50 ± 4,80
Інокуляція T38	54,10 ± 4,17	41,70 ± 3,28	91,60 ± 5,86
Інокуляція T38+ <i>A. punctiforme</i>	Пригнічення росту рослин	—	—
Інокуляція T39	50,8 ± 5,24	42,00 ± 2,79	92,30 ± 8,62
Інокуляція T39+ <i>A. punctiforme</i>	Пригнічення росту рослин	—	—

Виявилось, що при інтенсивному розмноженні водорості утворила доволі тверду плівку на поверхні субстрату, а саме на рівні кореневої шийки рослин, що обмежувало при цьому доступ кисню до кореневої системи. Рослини вказаних варіантів на початкових стадіях росту розвивались нормально, але починаючи з 25 дня вирощування почали змінювати зелене забарвлення листків і стебел на блідо-зелене. Фізіологічні порушення у фотосинтетичному апараті рослин фактично негативно вплинули на ріст рослин. Отже, вибране співвідношення діазототрофів у інокуляційних сумішах T38+*A. punctiforme* і T39+*A. punctiforme* виявилось у цих умовах малоефективним. Можливо, між інокуляційними партнерами створювалися антагоністичні взаємовідношення і, як наслідок, відбулись зміни у формуванні симбіотичного апарату на коренях рослин. У випадку застосування для інокуляції проростків суміші T39+*A. punctiforme* зафіксовано високий показник вмісту етилену в дослідному об'ємі. Установлено, що відновлення ацетилену відбувалось тільки за участі нітрогеназного комплексу водорості, оскільки бульбочки на коренях рослин у варіанті досліджу T39+водорості були відсутні.

Особливо слід відмітити симбіотичну ефективність транспозантів штаму 425a *S. meliloti*. У варіантах досліджу, за умови інокуляції проростків люцерни транспозантами T37 і T38 надземна маса рослин збільшувалась на 11,08–15,35 %, а висота пагонів вказаних варіантів перевищувала контроль на 6,72–12,09 %. Азотфіксувальна активність бульбочок, утворених транспозантами T37, T38 перевищувала азотфіксувальну активність вихідного штаму *S. meliloti* 425a на 17,09 і 60,2 % відповідно.

Висновки. 1. Підбір найбільш ефективних композицій азотфіксуючих мікроорганізмів, зокрема бульбочкових бактерій і синьо-зелених водоростей, для

створення продуктивних симбіотичних систем справа реальна й перспективна.

2. Одним із критеріїв їхньої ефективності може бути рівень активності нітрогеназного комплексу. Водорості з родини *Nostoc* у процесі життєдіяльності продукують велику кількість полісахаридів, які утилізують ся бульбочковими бактеріями як енергетичне джерело. Вони синтезують також біологічно активні (але не токсичні) сполуки, які широко використовуються навіть у харчуванні людей. Для оптимізації бінарних симбіотичних систем важливе значення має вибір найбільш продуктивної фази росту водорості й дозування співвідношення взятої біомаси останньої та бульбочкових бактерій.

3. Комплексна бактерізація бульбочковими бактеріями та водоростями може бути ефективною лише за умов ретельного добору інокуляційних партнерів. У даному експерименті найбільш сумісним партнером водорості *Amorphanostoc punctiforme* (Kutz.) виявився транспозант T37 штаму 425a *S. meliloti*, отриманий методом транспозонового мутагенезу.

4. Одним із найголовніших завдань майбутніх досліджень є оптимізація співвідношення концентрацій водоростей і бактерій, а також перевірка ефективності водоростево-бактеріальних композицій.

1. Надкерничная Е.В., Ковалевская Т.М. // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2001. – Т. 33, № 4. – С. 355–362. 2. Ситар О.В., Паршикова Т.В. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2003. – Вип. 39–41. – С. 83–84. 3. Simon R. // Mol. Genet. – 1984. – Vol. 169. – P. 413–420. 4. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. – К., 2001. – С. 99–101. 5. Федоров С.Н., Фокина И.Г., Ситаров Б.В. // С.-х. біологія. – 1986. – № 1. – С. 112–118. 6. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. // Plant Physiol. – 1968. – Vol. 43, № 8. – P. 1185–1207. 7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М., – 1985.

Надійшла до редколегії 08.10.04.

УДК 547.96: 582.4

Н.І. Карпенко, пров. інж.

ЗАПАСНІ БІЛКИ НАСІННЯ ВИДІВ РОДУ *CORONILLA* L.

Наведено дані з результатів електрофорезу запасних білків насіння представників роду *Coronilla* L. у поліакриламідному гелі. Досліджено зразки насіння 7 видів (*C. emeroides* Boiss. et Sprun., *C. coronata* L., *C. scorpioides* L., *C. varia* L., *C. elegans* Panc., *C. cretica* L., *C. rostrata* Boiss. et Sprun.). Виявлено стабільність спектрів запасних білків насіння в межах виду та їхня відмінність у межах роду. Зроблено припущення про доцільність розділення роду *Coronilla* L. на три роди.

The data from storage proteins electrophoresis of *Coronilla* L. species' samples in PAAG were presented. The samples' seeds of 7 species (*C. emeroides* Boiss. et Sprun., *C. coronata* L., *C. scorpioides* L., *C. varia* L., *C. elegans* Panc., *C. cretica* L., *C. rostrata* Boiss. et Sprun.) were investigated. The stabilizations of seeds protein fractions within this species and differences within genus were given in the article. It is made a supposition about expediency to divide the genus *Coronilla* L. into three genera.

Вступ. Біохімічні особливості, хімічний склад рослин, зв'язок їх із систематичним положенням живих організмів давно привертають увагу дослідників. Для з'ясування систематичного положення видів рослин часто використовуються методи електрофоретичного

фракціонування білків, адже кожний білок є унікальним продуктом свого гена і може бути надійним його маркером [1, 2]. У випадку запасних білків окремі їхні смуги можуть бути специфічно представлені у різноманітних генотипів рослин, що дає можливість розпізнавати ге-

нотип за присутністю / відсутністю характерних для них смуг у генетично різноманітному матеріалі.

Мета нашого дослідження – уточнення даних про систематичне положення видів роду *Coronilla* за результатами електрофоретичного вивчення їхніх запасних білків.

Об'єкт і матеріали досліджень. Нами були використані зразки насіння, отримані з ботанічних установ Європи й зібрані в 2003 р. у місцях природного зростання на території України, а саме: *Coronilla scorpioides* (L.) Koch. № 2 – Італія, ботанічний сад університету м. Генуї; № 2803 – Німеччина, ботанічний сад університету м. Халле; № 1169 – Данія, ботанічний сад університету м. Копенгагена; *Coronilla coronata* L. № 2 – Україна, Тернопільська обл., с. Гутисько; № 1262 – Швейцарія, ботанічний сад м. Женеви; № 1326 – Німеччина, ботанічний сад університету м. Геттінгена; *Coronilla varia* L. № 4 – Україна, Тернопільська обл., с. Гутисько; № 7 – Україна, Херсонська обл., с. Олександрівка; № 947 – Данія, ботанічний сад університету м. Копенгагена; *Coronilla elegans* Pans. № 2846 – Німеччина, ботанічний сад університету м. Єні; *Coronilla cretica* L. № 2 – Україна, Крим, Нікітський ботанічний сад; *Coronilla rostrata* Boiss. et Sprun. № 944 – Данія, ботанічний сад університету м. Копенгагена; *Coronilla emeroides* Boiss. et Sprun. № 11 – Україна, Крим, с. Малий Маяк; № 1 – Італія, ботанічний сад університету м. Генуї; № 292 – Франція, ботанічний сад університету м. Бордо.

Для отримання електрофоретичних спектрів запасних білків насіння досліджуваних видів було застосовано методику з роботи [3]. На кожній електрофореграмі як контроль використовували білковий спектр насіння *C. emeroides* № 11. Показник відносної елект-

рофоретичної рухливості (ВЕР) для кожної фракції визначали відносно значення абсолютної рухливості 19-ї фракції контрольного зразку.

Усього було отримано білкові спектри насіння 15 зразків 7 видів роду. Назви видів подано за визначником [4].

Результати та їх обговорення. Результати електрофорезу показали, що білкові спектри насіння одного виду, але різного географічного походження мали, в основному, однакову кількість фракцій і відрізнялися лише за інтенсивністю їхнього прояву, тоді як білкові спектри насіння різних видів відрізнялися за кількістю фракцій, інтенсивністю їхнього прояву та значенням рухливості. Так, кількість фракцій на електрофоретичних спектрах насіння різних видів була в межах від 12 до 29. Найменшу кількість їх 12 – мав вид *C. elegans*, а найбільшу – 29 – *C. emeroides*. Зразки насіння *C. cretica* і *C. varia* мали по 13 білкових фракцій, *C. rostrata* – 17, *C. scorpioides* – 21, *C. coronata* – 22 (табл. 1, 2).

Нами було встановлено, що насіння різних видів містили ряд ідентичних електрофоретичних компонентів, а саме: види *C. coronata* й *C. scorpioides* мали по 7 білкових фракцій, що за значеннями ВЕР перебували в однакових межах (0,558–0,580; 0,634–0,644; 0,818–0,832; 1,512–1,572; 1,678–1,724; 2,158–2,170; 2,252–2,282); *C. rostrata* й *C. cretica* – по 6 (0,460–0,466; 0,498–0,518; 0,656–0,662; 0,772–0,784; 0,818–0,832; 0,998–1,02); *C. varia* й *C. elegans* – теж по 6 (0,382–0,39; 0,478–0,488; 0,656–0,662; 0,73–0,74; 1,152–1,182; 1,258–1,284). *C. varia*, *C. elegans*, *C. rostrata* й *C. cretica* мали ідентичну фракцію з ВЕР, що лежала в межах 0,656–0,662. Насіння *C. emeroides* мало 10 білкових фракцій, які були відсутні в решті видів (табл. 1, 2).

Таблиця 1. ВЕР білкових фракцій представників роду *Coronilla*

№ фракції	<i>C. emeroides</i> № 292	<i>C. emeroides</i> № 1	<i>C. emeroides</i> № 11	<i>C. coronata</i> № 2	<i>C. coronata</i> № 1262	<i>C. coronata</i> № 1326	<i>C. scorpioides</i> № 2
1	0,340	0,340	0,340	0,486	0,484	0,480	0,508
2	0,370	0,372	0,368	0,532	0,528	0,524	0,540
3	0,384	0,386	0,386	0,568	0,576	0,580	0,558
4	0,416	0,418	0,416	0,638	0,638	0,638	0,644
5	0,438	0,442	0,440	0,670	0,670	0,668	0,784
6	0,460	0,466	0,460	0,700	0,694	0,692	0,818
7	0,484	0,488	0,486	0,750	0,748	0,748	0,910
8	0,528	0,528	0,526	0,824	0,820	0,820	0,976
9	0,552	0,542	0,540	0,850	0,854	0,856	1,090
10	0,568	0,566	0,566	0,946	0,934	0,944	1,234
11	0,590	0,590	0,590	1,040	1,040	1,038	1,284
12	0,612	0,610	0,612	1,120	1,122	1,116	1,330
13	0,634	0,640	0,638	1,182	1,176	1,168	1,368
14	0,670	0,674	0,674	1,372	1,372	1,372	1,492
15	0,720	0,734	0,724	1,418	1,426	1,422	1,566
16	0,800	0,798	0,796	1,466	1,478	1,466	1,684
17	0,832	0,830	0,828	1,532	1,532	1,532	2,120
18	0,892	0,892	0,892	1,702	1,706	1,724	2,158
19	0,998	1,004	1,000	2,164	2,164	2,164	2,276
20	1,052	1,050	1,050	2,216	2,216	2,216	2,428
21	1,128	1,128	1,124	2,254	2,252	2,258	2,714
22	1,162	1,160	1,162	2,308	2,302	2,302	
23	1,254	1,200	1,202				
24	1,308	1,306	1,306				
25	1,438	1,442	1,440				
26	1,512	1,512	1,514				
27	1,626	1,624	1,624				
28	1,696	1,694	1,692				
29	1,808	1,808	1,812				

Таблиця 2. ВЕР білкових фракцій представників роду *Coronilla*

№ фракції	<i>C. scorpioides</i> № 2803	<i>C. scorpioides</i> № 1169	<i>C. varia</i> № 4	<i>C. varia</i> № 7	<i>C. varia</i> № 947	<i>C. rostrata</i> № 944	<i>C. elegans</i> № 2846	<i>C. cretica</i> № 2
1	0,510	0,510	0,364	0,364	0,356	0,330	0,382	0,440
2	0,536	0,642	0,390	0,390	0,384	0,352	0,444	0,464
3	0,558	0,784	0,484	0,482	0,478	0,382	0,482	0,498
4	0,640	0,822	0,574	0,572	0,576	0,426	0,526	0,612
5	0,780	0,912	0,634	0,634	0,636	0,464	0,632	0,662
6	0,820	0,980	0,658	0,658	0,656	0,486	0,660	0,722
7	0,910	1,092	0,736	0,736	0,740	0,518	0,700	0,772
8	0,968	1,230	0,806	0,806	0,810	0,556	0,730	0,824
9	1,086	1,276	0,860	0,860	0,860	0,600	0,794	0,946
10	1,228	1,322	1,058	1,058	1,058	0,662	0,980	1,020
11	1,274	1,360	1,160	1,160	1,152	0,700	1,160	1,086
12	1,324	1,508	1,278	1,278	1,276	0,748	1,270	1,226
13	1,368	1,572	1,380	1,380	1,380	0,778		1,362
14	1,492	1,682				0,820		
15	1,568	2,120				1,000		
16	1,678	2,170				1,112		
17	2,118	2,284				1,258		
18	2,168	2,428						
19	2,282	2,728						
20	2,426							
21	2,728							

Використовуючи значення ВЕР і ступінь інтенсивності кожної з білкових фракцій (0 – відсутність фракції, 1 – низька її інтенсивність, 2 – висока) був проведений кластерний аналіз електрофоретичних спектрів запасних білків насіння представників досліджуваного роду. Розрахунки й побудова дендриту проводилися за допомогою програмного пакета STATISTICA. Для об'єднання об'єктів застосовували метод Варда, який дає мінімальні значення внутрішньогрупової суми квадратів відхилень; як міру подібності між об'єктами використали метрику "відсоток незбіжностей" [5].

На побудованій дендрограмі зразки насіння різного походження кожного з видів утворили окремі групи при низьких порогових значеннях розбіжностей (близько 0,2), що ілюструє ідентичність їхніх електрофореграм. Представники різних видів розбилися на три кластери. У першому об'єдналися *C. varia*, *C. elegans*, *C. rostrata* й *C. cretica* при пороговому значенні розбіжностей близько

0,75, причому *C. varia* й *C. elegans* виявилися дуже близькими видами через наявність у їхньому спектрі шести ідентичних білкових фракцій, подібно до *C. rostrata* й *C. cretica*. Другий кластер утворили *C. coronata* й *C. scorpioides* при пороговому значенні розбіжностей близько 1,4. Найвіддаленішими від решти видів були зразки *C. emeroides*, що утворили окремий, третій кластер.

Одержані спектри досліджуваних видів умовно розділили зверху донизу на три частини, де відкладались відповідно мало-, середньо- та високорухливі фракції запасних білків. Лічильником при цьому слугувало розміщення білкових фракцій спектра виду *C. emeroides* №11. Описаний поділ здійснювали за такою схемою: повільнорухливі – до 15 фракції, середнорухливі – від 15-ї до 22-ї, високорухливі – від 23-ї фракції контрольного зразка. Кількість повільно-, середньо- та високорухливих фракцій запасних білків насіння для кожного виду подано в табл. 3.

Таблиця 3. Кількість повільно-, середньо- та високорухливих фракцій запасних білків насіння досліджуваних видів роду *Coronilla* L.

№	Назва виду	Кількість фракцій			
		малорухливих	середнорухливих	високорухливих	загальна
1	<i>C. emeroides</i> № 11	14	8	7	29
2	<i>C. coronata</i> № 2	6	7	9	22
3	<i>C. scorpioides</i> № 2	4	5	12	21
4	<i>C. varia</i> № 4	6	5	2	13
5	<i>C. rostrata</i> № 944	11	5	1	17
6	<i>C. elegans</i> № 2846	7	4	1	12
7	<i>C. cretica</i> № 2	5	6	2	13

Білкові спектри *C. coronata* й *C. scorpioides* відрізняються від решти видів тим, що мають найбільшу кількість високорухливих фракцій, відповідно 9 і 12, тоді як *C. varia*, *C. cretica*, *C. rostrata* й *C. elegans* характеризуються мінімальною їхньою кількістю (2 і 1). Спектр *C. emeroides* відрізняється максимальною кількістю повільнорухливих фракцій (14) і майже однаковою кількістю середньо- й високорухливих. Отже, за кількістю фракцій у різних частинах білкового спектра види досліджуваного роду також поділилися на три групи.

Висновки. Результати електрофорезу показали, що спектри запасних білків насіння одного виду, вирощеного в різних географічних зонах, є практично ідентичними й відрізняються лише інтенсивністю прояву фракцій. Спект-

ри білків насіння різних видів відрізняються між собою кількістю фракцій і величиною їхніх ВЕР. Досліджені види поділилися за електрофоретичними ознаками білків на три групи, що може свідчити про доцільність розділення роду *Coronilla* L. на три роди, на що вказують автори [6, 7].

1. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. – М., 1983.
2. Пидюра О.І. Рід *Medicago* L. (Fabaceae) у флорі України. – К., 1998.
3. Пидюра О.І., Кічигіна О.О., Верхогляд І.М. // Вісн. Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2000. – № 1–2. – С. 133–135.
4. Добрячаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др. Определитель высших растений Украины. – К., 1987. – С. 198–1994.
5. Боровиков В.П. Популярное введение в программу STATISTICA. – М., 1998.
6. Lassen, P. // Willdenowia. – 1989. – № 19. – Р. 49–62.
7. Mosyakin S.L., Fedorovich M.M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. – К., 1999. – Р. 210, 211.

УДК [575+591.4] : 597.551.2 (477)

І.Л. Лисецький, асп., І.В. Давиденко, ст. лаб.

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА Й МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СРІБЛЯСТОГО КАРАСЯ *CARASSIUS AURATUS GIBELIO* (BLOCH, 1782) ВОДОЙМ УКРАЇНИ

Проведено дослідження вибірок сріблястого карася з водойм восьми областей України за допомогою біохімічного генного маркування, цитометричного методу й аналізу морфологічних ознак. Кожна з трьох виявлених одностатевих форм має клональну структуру, що підтверджується генетичною однорідністю особин у межах кожного клону та між-клональною гетерогенністю. Порівнюються морфологічні ознаки представників одностатевих гіногенетичних і диплоїдних бісексуальних популяцій.

Specimens of Silver Crucian Carp, collected from localities of eight regions of Ukraine, were investigated by the means of biochemical gene markers, cytometry and morphology methods. Intraclonal genetic homogeneity and interclonal heterogeneity were observed in three revealed unisexual clones of silver crucian carp. Morphology of gynogenetic unisexual populations and bisexual diploid populations is compared.

Вступ. Цікавість до "диплоїдно-поліплоїдних" комплексів, що відомі для представників родин Poeciliidae, Cobitidae, Aterinidae, Cyprinidae [1, 6–8, 11, 12], зумовлена невизначеністю таксономічного статусу поліплоїдних особин, здатних утворювати репродуктивно ізольовані одностатеві популяції. Репродуктивна ізоляція одностатевих популяцій є наслідком гіногенетичного або гібридного типу розмноження поліплоїдних особин. Незважаючи на те, що деякі гіногенетичні форми (*Poecilia formosa*) визнані як окремі види, в інших випадках питання стосовно таксономічного статусу таких форм залишається відкритим.

Прикладом останнього є питання визначення систематичного статусу групи підвидів комплексу *Carassius auratus*, яким і досі не полишають цікавитись провідні дослідники-популяціоністи з часу відкриття Н.Б. Черфас триплоїдної форми сріблястого карася [6]. Тоді ж було встановлено, що представники одностатевих популяцій мають триплоїдний набір хромосом (141–156) і розмножуються шляхом гіногенезу. Установлено також, що окремі двостатеві популяції сріблястого карася містять певний відсоток "триплоїдів".

Проведені з цього приводу дослідження стосуються східно-азіатської частини ареалу розповсюдження представників *Carassius auratus*, тоді як таксономічний статус гіногенетичної форми європейського сріблястого карася *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782) залишається не з'ясованим. Припущення стосовно автохтонності та видової самостійності європейської триплоїдної форми сріблястого карася [9] і зумовили необхідність проведення наших досліджень.

Результати попередніх робіт [3] свідчать про те, що у водоймах України зустрічаються як двостатеві популяції сріблястого карася, так і одностатеві, що складаються виключно із самиць. При цьому деякі двостатеві популяції об'єднують виключно диплоїдні особини, а інші – містять певну частину поліплоїдів [4]. Одностатеві популяції карася зустрічаються в північно-східній частині України, вони відмічені нами у водоймах Сумської та Черкаської областей. Вибірки, що містили незначну частину поліплоїдних особин, переважають у більшості досліджених нами водойм. Вибірки, в яких поліплоїдні особини не були знайдені, розташовані переважно в Київській і Тернопільській областях.

З метою встановлення таксономічного статусу гіногенетичної форми сріблястого карася нами був проведений аналіз генетичної структури популяцій *Carassius auratus* комплекс водойм України, а також аналіз морфологічних ознак представників одностатєвої та двостатєвої форм сріблястого карася.

Об'єкт і методи досліджень. Матеріал для даного дослідження збирався протягом чотирьох весняно-осінніх сезонів з 2001 по 2004 р. Виллови проводили мальковою волокушею (довжина – 15 м, висота – 1,6 м, діаметр вічка – 0,6 см), трьохстіною ставною сіткою (довжина – 15 м, висота – 0,7 м, діаметр вічка – 14 мм), "топтухою" (ширина – 1,5 м, висота – 1,2 м, діаметр вічка – 0,4 см), а також вудочками. Усього було досліджено 786 екземплярів риб.

Пластичні та меристичні ознаки риб вивчалися за допомогою стандартної методики морфометричного аналізу [5]. Генетична структура популяцій визначалась шляхом електрофоретичного поділу маркерних білків у поліакриламідному гелі. Електрофорез проводили в 7,5 %-му поліакриламідному гелі; використовували Трис- Na_2 ЕДТА – боратне буферне середовище (рН = 8,5) [10]. Під час проведення генетичного аналізу алелі кожного гена позначались відповідно до відносної рухливості їхніх білкових продуктів. Вона виражалась у відсотках від рухливості продукту найбільш розповсюдженого алеля відповідного локусу. Для встановлення плідності риби використовували цитометричний метод [6]. Статистична обробка матеріалу проводилась з використанням програм Statistica 6.0 for Windows і MS Excel 2000.

Матеріал було зібрано в таких водоймах. Київська область: ставок біля с. Качали Бородянського р-ну, ставок у с. Богданівці Яготинського р-ну, ставок у с. Іванкові Бориспільського р-ну, а також ставок, що знаходиться біля м. Яготина. У двох випадках вилов риби проводився безпосередньо біля м. Києва: в озері Міністерське та у ставку рибогоспу "Нивка". Черкаська область: лов риби проводився у ставках сіл: Шрамківка, Кононівка, Гречанівка Драбівського р-ну, Кіщенці Уманського р-ну, а також з річки Чумгак (приток р. Оржиці) та з Ірклівського рибгоспу (Чорнобаївський р-н). Полтавська область: рибу виловлювали у ставках таких сіл: Райозеро Оржицького р-ну, Ісківці та Миколаївка Лубенського р-ну, а також у Кременчуцькому водосховищі (с. Бугайівка Глобинського р-ну). Тернопільська область: у ставках у с.м.т. Хоросткові Гусятинського р-ну та в с. Урмані Бережанського р-ну. Сумська область: у ставках таких сіл: Ліфіно Лебединського р-ну (було зроблено дві вибірки у 2002 і 2003 рр.), Великі Вільми, Сумського р-ну, а також Очкіно, Кренидівка, Боровичі (територія Деснянсько-Старогутського національного природного парку, Середино-Будський р-н). Житомирська область: матеріал збирався у ставках с. Українка Малинського р-ну, а також зі ставка, що міститься на території Поліського заповідника, Овруцького р-ну. У Вінницькій області виллови проводились із ставка с. Дубові Маха-

ринці (Козятинський р-н). В Одеській області – з річки Дунаю, безпосередньо біля м. Вилкового.

Результати та обговорення. Як показують результати проведеного біохімічного генного маркування (рис. 1) одностатеві популяції сріблястого карася мають поліклональну структуру. Особливість електрофоретич-

них спектрів карасів з одностатевих популяцій полягає у константній гетерозиготності – фіксації гетерозиготних генотипів по всіх діагностичних локусах. У двостатевих популяціях діагностичні локуси виявили широкий спектр поліморфних варіантів.

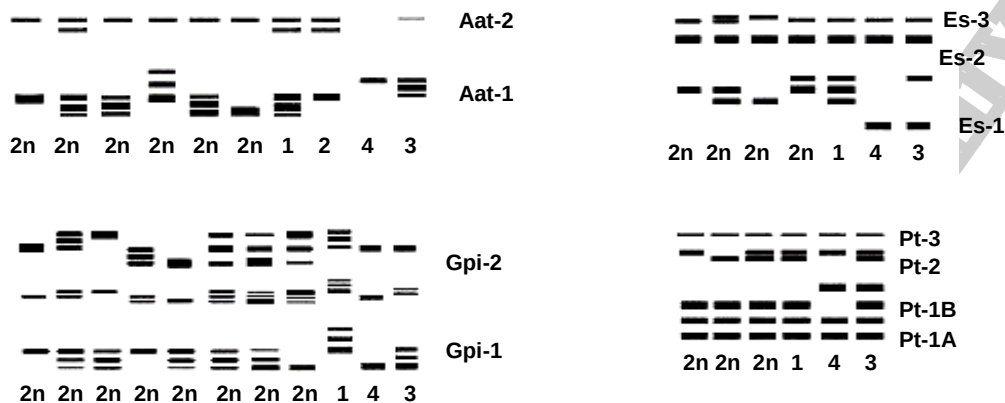


Рис 1. Електрофоретичні спектри діагностичних білкових локусів у сріблястого та золотого карасів: 1, 2 – триплоїдні особини з одностатевих популяцій; 2n – електрофоретичні спектри диплоїдних особин *Carassius auratus gibelio* з двостатевих популяцій; 3 – гібридні особини *C. auratus gibelio* × *C. carassius* з одностатевої популяції; 4 – спектри золотого карася *C. carassius*; Aat – аспартатамінотрансфераза; Gpi – глюкозофосфатізомераза; Es – естераза; Pt – загальний білок

Аналіз отриманих електрофореграм дає підставу виділити декілька клональних форм сріблястого карася, що утворює одностатеві гіногенетичні популяції: у карасів з одностатевих вибірок "Ліфіно", "Великі Вільми", "Кренидівка", "Боровичі" спостерігалась константна гетерозиготність щодо 7 локусів: Aat – $1^{100/100/100/110}$, Aat – $2^{100/200}$, Es – $1^{90/100/110}$, Es – $2^{100/105}$, Gpi – $2^{85/100}$, Gpi – $1^{60/100}$ і Pt – $2^{90/100}$. На відміну від розглянутих вибірок, самиці сріблястого карася з одностатевої вибірки "Кононівка" мали гомозиготний генотип локусу Aat – 1 (Aat – $1^{100/100/100/100}$). Щодо інших локусів спостерігався аналогічний набір спектрів.

Рибам з одностатевої вибірки "Очкіно" був притаманний дещо інший набір електроморф. Усі виловлені з цього водоймища особини характеризувались наявністю гетерозиготних генотипів Aat – $1^{80/100}$ і Pt-1A $^{90/100}$. Іншою особливістю карасів з вибірки "Очкіно" була відсутність у спектрах продуктів алелів Es-1 90 і Gpi-1 60 , які були свого роду генетичними маркерами для карасів з вибірок "Ліфіно", "Великі Вільми", "Кренидівка", "Кононівка" та "Боровичі". Присутність у генотипах сріблястих карасів з одностатевої вибірки "Очкіно" алельних варіантів, що були характерними для золотого карася *Carassius carassius* однозначно свідчить на користь їхньої гібридної природи *C. a. gibelio* × *C. carassius*.

Таким чином, у різних одностатевих популяціях сріблястого карася спостерігається фіксація різних генотипів по локусах Aat – 1, Gpi – 1, а також Es-1. Водночас, дослідження морфометричних ознак показало, що триплоїдні особини, які складають більшість одностатевих популяцій сріблястого карася, а також поліплоїдні гібриди *C. a. gibelio* × *C. carassius* (вибірка "Очкіно"), мають усі характерні для сріблястого карася ознаки зовнішньої морфології.

Проведений аналіз морфометричних ознак у просторі двох факторів (рис. 2) дозволяє стверджувати, що морфологічна мінливість поліплоїдів не виходить за межі мінливості диплоїдної форми. Відсутність різких відмін-

ностей розглянутих пластичних ознак серед проаналізованих особин з одностатевих (гіногенетичні форми) і двостатевих вибірок (диплоїдна бісексуальна форма сріблястого карася) зумовлює неможливість ідентифікувати триплоїдну форму на підставі ознак зовнішньої морфології. У межах диплоїдної форми спостерігається значна мінливість майже щодо всіх розглянутих пластичних ознак.

Як відомо, два види карасів (*C. auratus* і *C. carassius*) дивергували за кількістю зябрових тичинок на першій зябровій дузі. Ця ознака визнана основною [2] при діагностиці сріблястого карася не тільки на видовому рівні, але й на підвидовому (*C. a. cuvieri*, *C. a. grandoculis*, *C. a. langsdorfii*, *C. a. buergeri*).

Результати проведених нами досліджень (рис. 3) свідчать про те, що у двостатевих і одностатевих форм сріблястого карася діапазони мінливості цієї ознаки значною мірою перекриваються. Отримані дані показують, що кількість зябрових тичинок на першій зябровій дузі у сріблястого карася коливається в межах від 37 до 52 штук. Отже, кількість зябрових тичинок на першій зябровій дузі також не свідчить про таксономічну відокремленість триплоїдної форми сріблястого карася.

Зіставлення даних, отриманих під час морфологічного, цитометричного та електрофоретичного досліджень східноєвропейських популяцій сріблястого карася дає можливість зробити висновок стосовно генетичної неоднорідності гіногенетичної форми, а також про неможливість ідентифікувати триплоїдну форму сріблястого карася на підставі зовнішніх морфологічних ознак. Високий рівень мінливості морфологічних ознак, що спостерігався нами серед представників одностатевих і двостатевих вибірок, свідчить про пластичність сріблястого карася у пристосуванні до умов середовища, яке займає цей вид.

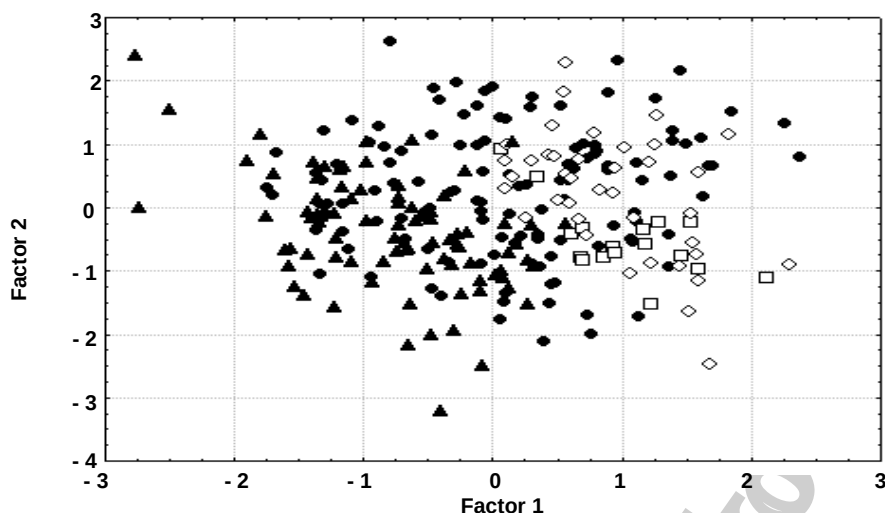


Рис. 2. Розподілення пластичних ознак карасів з різним рівнем плідності у просторі двох факторів:
● – диплоїдні самиці; ▲ – диплоїдні самці; ◇ – триплоїдні самиці; □ – гібриди *C. auratus gibelio* × *C. carassius*

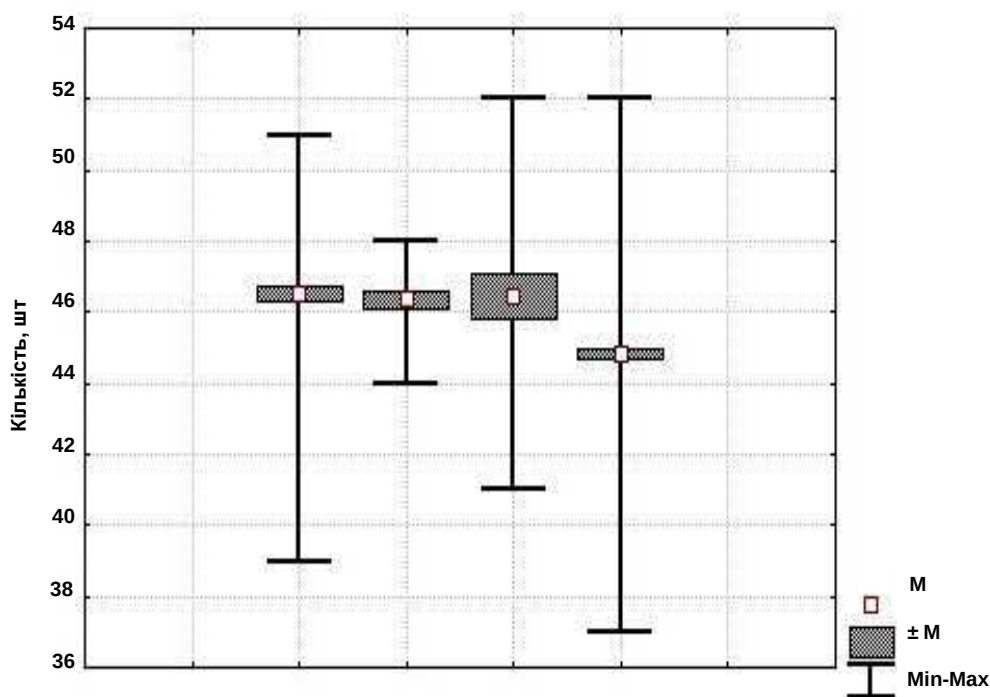


Рис. 3. Кількість зябрових тичинок у карасів з різним рівнем плідності:
1 – триплоїдні особи з одностатевих популяцій; 2 – гібридні особи *C. auratus gibelio* × *C. carassius*;
3 – триплоїдні особи з двостатевих популяцій; 4 – диплоїдні особи *Carassius auratus gibelio*

Висновки. 1. Проведені дослідження свідчать про відсутність підстав для зміни існуючого таксономічного статусу триплоїдної форми сріблястого карася. 2. Сріблястий карась *Carassius auratus gibelio* у водоймах України утворює диплоїдно-поліплоїдний комплекс, який складається з дво- та одностатевих триплоїдних популяцій. 3. У водоймах, в яких одночасно співіснують *C. a. gibelio* й *C. carassius* установлено наявність поліплоїдних гібридів *C. a. gibelio* × *C. carassius*. 4. Одностатєва форма сріблястого карася має поліклональну структуру, що свідчить на користь її багаторазового виникнення в межах європейського ареалу. 5. Кількість тичинок на першій зябровій дузі не є діагностичною ознакою, за якою можливо було б відокремити триплоїдну форму сріблястого карася. 6. На підставі всебічного дослідження пластичних і меристичних ознак автори

дійшли висновку, що жодна з розглянутих ознак або група ознак не дає змогу ідентифікувати триплоїдну форму сріблястого карася як окремого виду. Морфологічна мінливість поліплоїдів не виходить за межі мінливості диплоїдної форми.

1. Васильев В.П., Васильева Е.Д. // Докл. АН СССР. – 1982. – Т. 266, № 1. – С. 250–252. 2. Васильева Е.Д. // Зоол. журн. – 1990. – Т. 69. – Вып. 11. – С. 97–110. 3. Лисецкий И.П. // Рыбное хозяйство. – 2004. – Вып. 63. – С. 136–139. 4. Лисецкий И.П. // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія. – 2004. – Вип. 14. – С. 188–191. 5. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. – М., 1966. 6. Черфас Н.Б. // Генетика. – 1966. – Т. 1, № 5. – С. 16–24. 7. Collares-Pereira M.J. // Arq. Mus. Boc. Ser. A. – 1985. – Vol. 3, № 5. – P. 69–90. 8. Echelle, A.A., Mosier D.T. // Science. – 1981. – Vol. 212, № 4501. – P. 1411–1413. 9. Kottelat M. // Bratislava: Biologia, 1997. – Vol. 52. – Suppl. 5. – P. 1–271. 10. Peacock A.C., Bunting S.L., Queen K.G. // Science. – 1965. – Vol. 147. – P. 1451–1455. 11. Rasch E.M., Darnell R.M., Kallmen K.D., Abramoff P. // J. Exp. Zool. – 1965. – Vol. 160, № 2. – P. 155–169. 12. Schultz R.J. // Am. Nat. – 1969. – Vol. 108. – P. 605–619.

Надійшла до редколегії 27.09.04

УДК 612.821:612 821.83

М.Ю. Макаrchук, д-р. біол. наук, С.В. Федорчук, інженер II кат.,
В.А. Трушина, ст. наук. співроб., В.І. Тараненко, провід. фізіол.

ХАРАКТЕР РЕАКЦІЇ НА РУХОМИЙ ОБ'ЄКТ ЗАЛЕЖНО ВІД РІВНЯ УВАГИ ТА ШВИДКОСТІ ПЕРЕРОБКИ ІНФОРМАЦІЇ В ОПЕРАТОРІВ ЕЛЕКТРОСТАНЦІЙ

Досліджено реакцію на рухомий об'єкт у зв'язку з особливостями уваги й переробки інформації в операторів теплових електростанцій в умовах монотонії під впливом психоемоційного напруження та в суб'єктивно комфортних умовах. Виявлено, що швидкість переробки інформації та точність параметрування швидкісними характеристиками об'єкта спостереження – це пов'язані один з одним процеси, а стабільність реакції на рухомий об'єкт не пов'язана з особливостями концентрації уваги операторів. Взаємозв'язок швидкості перебігу нервових процесів і здатності параметрування часом і простором особливо виявився в умовах психоемоційного напруження.

Reaction to moving object was investigated in connection with features of attention and processing of the information at operators of thermal power stations in conditions monotonia, under influence psychoemotional strains and in subjectively comfortable conditions. It was revealed, that speed of processing of the information and accuracy of an assessment (evaluation) of high-speed characteristics of object of supervision are processes connected (linked) with each other, and stability of reaction to moving object is not connected (linked) to features of concentration of attention of operators. The interrelation of speed of course of nervous processes and abilities perception of parameters of time and space was especially showed in conditions psychoemotional strains.

Вступ. Швидкість переробки інформації та швидкісні параметри процесу прийняття рішень суттєво залежать від швидкості руху нервових процесів по нейронним комплексам кори [1]. Реакція на рухомий об'єкт – це параметрування швидкісними характеристиками об'єкта, що спостерігається оператором, складний умовний рефлекс, який утворюється на основі оцінки швидкості руху [2]. Певну роль у формуванні реакції на рухомий об'єкт повинна відігравати увага – певний стан або енергетичний рівень організму, який організує пізнавальні процеси і є необхідною умовою успішного навчання, високої якості та продуктивності трудової діяльності оператора [2, 3].

Метою дійсного дослідження було порівняння показників РРО з показниками швидкості та якості переробки інформації. З цією метою досліджувалися особливості переробки зорової інформації, пошукової діяльності із залученням вольової уваги в умовах психоемоційного напруження при виконанні математичних завдань, а також реакція на рухомий об'єкт у суб'єктивно комфортних умовах, умовах монотонії та за психоемоційного напруження.

Об'єкт і методи досліджень. У дослідженні як обстежувані брали участь 131 особа чоловічої статі віком 22–54 років – оператори теплових електростанцій, які навчалися у Спеціалізованому центрі підготовки кадрів Міненерго України.

У всіх обстежуваних оцінювали здатність швидко й безпомилково проводити арифметичний рахунок (переробка зорової інформації) і на основі отриманого результату здійснювати пошук необхідного елемента за певним алгоритмом з ряду подібних (перемикання уваги).

Усі тестування проводили з використанням комп'ютера: досліджуваній працював з клавіатурою, виконуючи завдання, які пред'являлися на екрані відеомонітора. Спеціальних навичок при роботі з клавіатурою від обстежуваних не вимагалось. Завдання включали низку (21 приклад) простих арифметичних дій – операції складання та віднімання однозначних чисел і визначення "парності-непарності" отриманого результату. Після цього на готовій цифровій шкалі двозначних чисел, зображених на екрані у випадковому порядку, необхідно було вибрати максимальне або мінімальне число. Довжина цієї цифрової шкали відповідно до граничного об'єму короткочасної пам'яті становила 12 чисел. За результатами тестування визначали такі показники:

♦ швидкість переробки інформації (ШПІ), яка визначалася як середній час вирішення певного за-

вдання та пошуку відповідного числа без урахування помилок у мс;

♦ загальна кількість помилок (ЗКП), яка визначалася як відсоток помилкових відповідей;

♦ відсоток помилкових відповідей при пошуку максимального за значенням числа (КП1);

♦ відсоток помилкових відповідей при пошуку мінімального за значенням числа (КП2);

♦ коефіцієнт варіації (КВ) середнього часу виконання завдання.

Для дослідження РРО обстежуваним пропонувалося за допомогою однієї кнопки клавіатури ПК відзначити швидким натисканням момент перетинання двох яскравих ліній, що рухаються на екрані дисплея з постійною швидкістю. Швидкість руху ліній визначалася за характером її суб'єктивного сприйняття обстежуваними: дуже швидка, або висока (160мм/с) – пов'язана з психоемоційним напруженням, середня (80мм/с) – суб'єктивно комфортна й дуже повільна, або низька (40мм/с) – швидкість, за якої скоріше виникає стан монотонії. Програма передбачала можливість оцінки точності реакції безпосередньо самим досліджуваним з метою її коректування. Для одноразового вивчення РРО вироблялося 25 вимірів (елементарних актів РРО).

Основним показником точності реакції на рухомий об'єкт вважалася середня арифметична величина часу відхилення реакції досліджуваного від моменту перетинання двох рухомих ліній, або точність РРО – ТР. За одиницю відхилення використовувалися т. зв. "умовні одиниці" РРО, що є величиною відхилення в мілісекундах. Стійкість (стабільність) отриманого результату оцінювалася за коефіцієнтом варіації точності РРО (ВР). Для детальнішої інтерпретації результатів тестування окремо визначалися середні арифметичні величини запізнілих і випереджальних реакцій – критерії запізнення (КЗ) і випередження (КВ), а також коефіцієнти варіації цих показників (відповідно ВЗР і ВВР). Для визначення урівноваженості основних нервових процесів застосовувався коефіцієнт балансу РРО (КБР), що визначався як відношення середнього арифметичного запізнілих реакцій до середнього арифметичного випереджальних реакцій.

Усі вказані показники РРО вимірювалися без урахування швидкості руху ліній (тобто рухомого об'єкта). Крім того, аналогічні показники РРО вимірювалися з урахуванням швидкості руху ліній: наприклад, ТР-В – точність РРО у разі високої швидкості руху ліній, КЗ-С – критерій запізнення у випадку середньої швидкості руху ліній і т. д.

Результати та їх обговорення. Показник швидкості переробки інформації та пошукової діяльності (ШПІ) характеризував виключно середній час виконання обчислювання й пошуку необхідного елемента з ряду подібних без урахування кількості помилок. За результатами попередніх досліджень цей показник у разі безпомилкової роботи можна вважати одним з критеріїв ефективності операторської діяльності.

Завдяки кореляційному аналізу отриманих результатів (за Спірменом) було виявлено (див. табл. 1) вірогідний зв'язок показника ШПІ з точністю РРО ($r=0,19$). Аналіз результатів з урахуванням швидкості руху ліній показав, що показник ШПІ був пов'язаний з точністю РРО за високої та низької швидкості руху ліній (відповідно $r=0,25$ та $r=0,19$), а також з критеріями запізнення та випередження у випадку високої швидкості (КЗ-В і КВ-В) руху ліній ($r=0,23$ і $r=0,21$). Виявилось, що швидкість переробки інформації та точність параметрування швидкісними характеристиками об'єкта спостереження – це пов'язані один з одним процеси. І саме в умовах психоемоційного напруження, зумовленого або дефіцитом часу при виконанні завдання, або умовами монотонії, особливо чітко виявляється взаємозв'язок швидкості

перебігу нервових процесів та здатності параметрування часом і простором.

Показник загальної кількості помилок (ЗКП) відображав якість переробки інформації. Автори вважають, що ЗКП може слугувати критерієм якості перемикання уваги операторів під час виконання тестового завдання. За даними попередніх досліджень середні значення показників кількості помилок під час пошуку максимального й мінімального чисел майже не відрізнялися.

Кореляційний аналіз (див. табл. 1) виявив вірогідний зв'язок загальної кількості помилок з точністю РРО ($r=0,19$) і з точністю ($r=0,21$) та варіативністю РРО ($r=-0,23$), якщо швидкості руху ліній була низькою (ТР-Н і ВР-Н). Кількість помилок під час пошуку максимального числа вірогідно корелювала з точністю РРО ($r=0,25$), з точністю РРО за високої ($r=0,25$) і за низької ($r=0,19$) швидкості руху ліній (ТР-В, ТР-Н) і з варіативністю РРО ($r=-0,19$) якщо швидкості руху ліній була низькою (ВР-Н), а кількість помилок при пошуку мінімального числа – з коефіцієнтом балансу РРО (КБР-С) у разі середньої швидкості руху ліній ($r=0,19$).

Таблиця. Кореляційні зв'язки показників уваги, швидкості та якості переробки інформації з показниками РРО в операторів теплових електростанцій ($n=131$)

Показники	ТР	ТР-В	ТР-Н	ВР-Н	КЗ-В	КВ-В	ВВР-С	КБР-С
Швидкість переробки інформації та пошукової діяльності (ШПІ), мс	0,19*	0,25**	0,19*		0,23**	0,21*		
Загальна кількість помилок (ЗКП), %	0,19*		0,21*	-0,23*				
Кількість помилок при пошуку максимального числа (КП1), %	0,25**	0,25*	0,19*	-0,19*				
Кількість помилок при пошуку мінімального числа (КП2), %								0,19*
Коефіцієнт варіації середнього часу виконання завдання (КВ)							0,20*	

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Кількість помилок при виконанні тестового завдання з елементами пошукової діяльності була тим більша, чим більше було відхилення від точної реакції на рухомий об'єкт (особливо ця закономірність виявилася при психоемоційному напруженні) і менша варіативність РРО в умовах монотонії. У суб'єктивно комфортних умовах безпомилковості роботи операторів пов'язувалася зі співвідношенням запізнілих і випереджальних реакцій (тобто з рівноваженістю основних нервових процесів за Н.С. Лейтесом [4]): помилок було тим більше, чим у більшому ступені реакції запізнення переважали над реакціями випередження. За отриманими результатами можна зробити припущення, що успішність виконання більш легких завдань (пошук мінімального числа) зумовлювалася рівноваженістю нервових процесів, тоді як ефективність вирішення складніших завдань (пошук максимального числа) залежала більшою мірою від особливостей інтегративної функції мозку, якостей уваги, емоційної стабільності та вольових характеристик особистості.

Показник КВ (коефіцієнт варіації середнього часу виконання завдання) у нашому дослідженні характеризував здатність операторів до концентрації уваги, яка за думкою деяких дослідників характеризується тривалістю та глибиною зосередження [3] та ототожнюється з працездатністю головного мозку [2]. За результатами наших досліджень виявлено вірогідний кореляційний зв'язок показника КВ тільки з варіативністю випереджальних реакцій ($r=0,20$) при середній швидкості руху ліній, тобто при тестуванні в суб'єктивно комфортних умовах.

Отже, найбільша кількість кореляційних зв'язків показників якості перемикання уваги та швидкості переробки інформації в обстежених операторів виявлено з показниками точності РРО. Цікаво відзначити, що варіативність РРО не корелювала з варіативністю середнього часу переробки зорової інформації та пошукових дій обстежуваних, тобто стійкість (стабільність) РРО не була пов'язана з особливостями концентрації уваги операторів.

Висновки. Швидкість переробки інформації та точність параметрування швидкісними характеристиками об'єкта спостереження – це пов'язані один з одним процеси. Взаємозв'язок швидкості перебігу нервових процесів і здатності параметрування часом і простором особливо виявилися в умовах психоемоційного напруження. Кількість помилок при виконанні тестового завдання з елементами пошукової діяльності була тим більша, чим більше було відхилення від точної реакції на рухомий об'єкт (особливо при психоемоційному напруженні) і менша варіативність РРО в умовах монотонії. У суб'єктивно комфортних умовах кількість помилок у операторів була пов'язана з урівноваженістю нервових процесів. Крім того, було виявлено, що стійкість (стабільність) РРО не пов'язана з особливостями концентрації уваги.

1. Чайченко Г.М. // Физиол. журнал. – 1990. – Т. 16, № 4. – С. 89–93.
2. Макаренко Н.В. Теоретические основы и методики профессионального психофизиологического отбора военных специалистов. – Киев, 1996.
3. Киколов А.И. Умственный труд и эмоции. – М., 1978. – С. 65.
4. Лейтес Н.С. Результаты определения уравновешенности основных нервных процессов тремя двигательными методиками // Типологические особенности ВНД человека / Отв. ред. Б.М. Теплов. – М., 1963. – Т. 3. – С. 155–163.

УДК 578.24:577.359:632.938:633.1

Л.Т. Міщенко, канд. біол. наук, В.В. Тороп, пров. інж., О.В. Молчанець, канд. біол. наук,
Л.В. Токарчук, канд. біол. наук, Г.С. Янішевська, пров. інж., Т.В. Куцинова, пров. інж.

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕАКЦІЇ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР НА РОЗВИТОК ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРОВІДНОСТІ

Досліджено розвиток вірусної інфекції при зараженні зернових культур вірусом смугастої мозаїки пшениці в контрольованих умовах візуальним, електрометричним та імунологічним методами. Обговорюється залежність між електрометричними показниками та стійкістю рослин до вірусної інфекції. Показано, що електрометричні вимірювання доцільно використовувати для раннього виявлення вірусу й попередньої оцінки толерантності генотипів зернових культур до вірусної інфекції.

The development of wheat streak mosaic virus in a number of small grain crops infected under controlled conditions has been investigated by visual, the electrical calculations and immunologic procedures methods was researched. The dependence is discussed between electrometric characteristics and plant resistance to viral infection. The electrical calculations have been shown very desirable for virus detection at the early stages of infection and preliminary estimation of the small grain-crops genotypes' tolerance to viral infection.

Вступ. Електрометричні методи набули широкомасштабного застосування для дослідження реакції рослин у відповідь на стреси, викликані різноманітними абіотичними чинниками. Існує цілий ряд способів оцінки фізіологічного та патологічного стану рослин за дії абіотичних чинників, основаних на реєстрації зміни електропровідності (ЕП) їхніх тканин [1, 2].

Досліджуючи зміну проникності та ЕП штучних і біологічних мембран рослинної клітини, Д.К. Кларксон [3] виявив, що йонна проникність біологічних мембран значно зростає під дією деяких антибіотиків, що виробляються бактеріями і грибами. Руїнування мембран, плазмоліз клітин, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки та витікання електролітів у міжклітинний простір спостерігали в роботі [4].

Розвиток адаптивних реакцій у толерантних до вірусної інфекції рослин – модифікації клітинних стінок, що включають синтез нових структурних білків і поліфенольних речовин, які разом формують трьохвимірну сітку навколо клітини, утворення полісахаридів (пектин, целюлоза) або поліфенолів (лігнін, суберин) [5, 6] – усі ці процеси також впливають на проникність і ЕП тканин.

Зерновому господарству України значної шкоди завдає вірус смугастої мозаїки пшениці (ВСМП) [7]. Гена стійкості до ВСМП не існує, проте виділяють генотипи, які відрізняються чутливістю до цієї інфекції [8].

Метою наших досліджень було виявити реакцію тканин листків на стрес, викликаний вірусом смугастої мозаїки пшениці й простежити за розвитком інфекційного процесу в різних за чутливістю сортів зернових культур методом вимірювання ЕП тканин інтактних листків рослин-хазяїв, одночасно використовуючи класичні вірусологічні методи діагностики.

Об'єкт і матеріали досліджень. Об'єктом вірусологічних досліджень був полтавський ізолят ВСМП.

Для інфікування використовували озиму пшеницю сортів Лада, МIRONІВСЬКА-65, МIRONІВСЬКА-67, Колективна-3, Одеська-167; овес сортів Таращанський, Скакун; ячмінь сортів Таращанський, Рось.

Штучну інокуляцію дослідних рослин проводили у фазі 2-х листків шляхом втирання соку рослин-накопичувачів, отриманого за допомогою фосфатного буферу рН 7,2. Контрольні рослини натирали самим лише фосфатним буфером.

За розвитком вірусної інфекції спостерігали візуально, констатуючи появу зовнішніх симптомів, вимірюючи ЕП листків та визначаючи наявність антигену (АГ) в ІФА зразків досліджуваних рослин протягом 28 діб.

Для електрометричних досліджень нами застосовано електромір Е7-13, оснащений голчастими молібденови-

ми електродами довжиною 9 мм з міжелектродною відстанню 1 см. Методику використання описано раніше [2].

Виявлення АГ здійснювали у твердофазному імуноферментному аналізі (ІФА) з використанням специфічних діагностичних сироваток до ВСМП [9], які одержували за стандартною методикою [10]. Оптичну густину зразків в ІФА вимірювали на рідері фірми Termo Labsystems Opsis^{MR} з програмним забезпеченням Dynex Revolution Quicklik (США) при довжинах хвиль 405/630 нм.

Відносну оптичну густину дослідних зразків визначали за формулою $E = E_i / E_k$ де E – відносна оптична густина; E_i – оптична густина інфікованого зразка; E_k – оптична густина контрольного зразка.

Повторюваність для електрометричних досліджень – 10-кратна, для імунологічних – 3-кратна.

Дисперсійний і кореляційний аналіз проведено з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel та AGROSTAT.

Результати та їх обговорення. Відомо, що озима пшениця є найчутливішою до ураження ВСМП восени й навесні, менш чутливий овес, а ячмінь – більш толерантний до ураження цією інфекцією. Остаточну оцінку чутливості сортів зернових культур можна дати лише за аналізом урожайності, біологічної та господарської продуктивності. Нами було зроблено спробу знайти залежність між проявом візуальних симптомів, ЕП і вмістом вірусу, визначеним за відотною оптичною густиною в ІФА досліджуваних зразків.

Появу перших візуальних симптомів захворювання ВСМП спостерігали на 12–14-у добу після інокуляції та оцінювали за 4-бальною шкалою (табл. 1).

Перші симптоми у вигляді слабкої світло-зеленої мозаїки з'явилися на рослинах сорту МIRONІВСЬКА-67 через 12 діб після інфікування. На 14-у добу симптоми спостерігали і в інших сортів, крім пшениці Одеська-167 та ячменю Рось. Через 18 діб після інфікування на листках пшениці сорту МIRONІВСЬКА-67 відмічено появу інтенсивної зелено-жовтої мозаїки та смужок. Ще через 2 доби всі досліджувані рослини мали такі симптоми, крім пшениці сортів Колективна-3 і Одеська-167. На 24-у добу після інокуляції симптоми у вигляді поховіння та засихання інтенсивністю 3 бали відмічено на рослинах пшениці сорту МIRONІВСЬКА-67, і лише симптоматику сорту Одеська-167, як і раніше, було оцінено в 1 бал. Такий стан зберігався впродовж 24-ї та 28-ї діб досліді.

Для оцінки фізіологічної реакції уражених вірусом рослин проводили вимірювання показників ЕП тканин інтактних листків. При дослідженні в динаміці в чутливого сорту Лада вже на 5-у добу спостерігалася достовірне підвищення їх порівняно з контролем на 20–25 % (рис. 1).

Таблиця 1. Динаміка проявлення симптомів ураження ВСМП на рослинах злаків при штучній інокуляції

Культура, сорт	Час появи симптомів (доба після інокуляції) у балах						
	12 доба	14 доба	16 доба	18 доба	20 доба	24 доба	26 доба
Пшениця Миронівська-67	1	1	1	2	2	3	3
Пшениця Миронівська-65	0	1	1	1	2	2	2
Пшениця Колективна-3	0	1	1	1	1	2	2
Пшениця Одеська-167	0	0	0	0	1	1	1
Овес Таращанський	0	1	1	1	2	2	2
Овес Скакун	0	1	1	1	2	2	2
Ячмінь Таращанський	0	1	1	1	2	2	2
Ячмінь Рось	0	0	1	1	2	2	2

0 – симптоми ураження відсутні; 1 – слабка світло-зелена мозаїка; 2 – інтенсивна зелено-жовта мозаїка, смугастість; 3 – поховтіння та засихання листків.

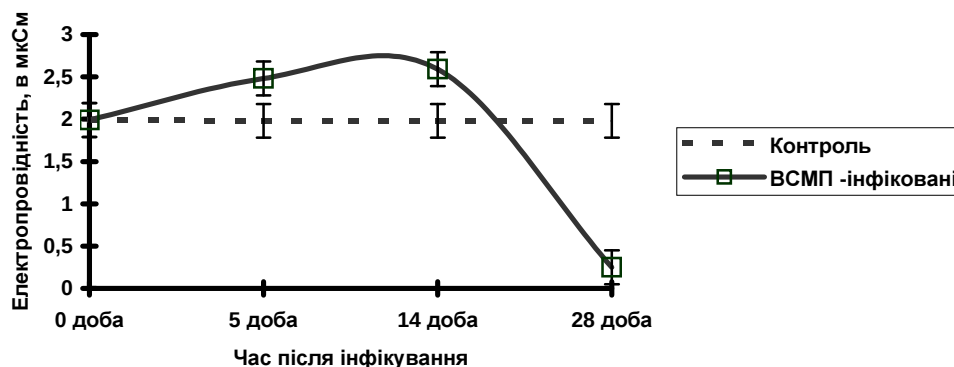


Рис. 1. Визначення ЕП тканин перших (інфікованих) листків пшениці чутливого сорту Лада в динаміці інфекційного процесу

ЕП тканин листків спочатку зростала, а починаючи з 12-ої доби почала знижуватися і на 28-у добу досягла фонових значень – 0,25 мікросименса (мкСм). Перші інфіковані листки засохли. Зростання ЕП відмічено і в молодих (3–5 листках) інфікованих рослин порівняно з контрольними.

Такий характер зміни показників ЕП спостерігався у чутливих сортів. У менш чутливих культур на 5-у добу після інфікування електропровідність зростала лише на 10–15 %, або не змінювалася, а в толерантних – дещо знижувалася.

Дослідження, проведені в різних ділянках листової пластинки показали, що наймолодша (базальна) частина листка є тим місцем, де відбуваються найістотніші зміни ЕП, що реєструються при інфікуванні.

У здорових листків ЕП базальної частини була істотно вищою порівняно з центральною і верхньою. У перші 2 тижні після інфікування це співвідношення ще зберіглося, але після появи симптомів ураження воно суттєво змінювалося. Різниця між показниками ЕП у різних частинах листка ставала незначною. Установлено, що як найбільш значиме, зниження ЕП у наймолодшій (базальній) частині листової пластинки інфікованих листків, яке корелює з локалізацією АГ, може бути тестовим показником для попереднього виявлення вірусної інфекції.

Одночасно з електрометричними дослідженнями проводили ідентифікацію вірусного АГ методом ІФА. В інфікованих рослинах вірус виявлявся лише на 12–14-у добу залежно від сорту, ярусу та ділянки листової пластинки.

Для визначення ступеня толерантності різних злакових до ураження вірусом нами застосовано кореляційний аналіз. При детальному аналізі розвитку інфекційного процесу виявлено пряму залежність (коефіцієнт кореляції $r = 0,81$) між зміною ЕП на 5-у добу після інфікування та показниками відносної оптичної густини в ІФА зразків інфікованих рослин на 16-у добу.

Вважаємо, що зміна ЕП тканин, яка корелює з кількістю патогену, можливо, зумовлена порушеннями цілісності клітинних стінок рослин-хазяїв під впливом вірусної інфекції в чутливих генотипів і захисними реакціями, що розвиваються у відповідь на біотичний стрес у толерантних сортів. Це узгоджується також з роботами [5, 6].

За інтенсивністю зміни ЕП і кількістю вірусного АГ, що виявлявся в ІФА, досліджувані зернові культури розмістилися в такому порядку: пшениці Миронівська-67 > Миронівська-65 > Колективна-3 > Одеська-167 > вівси Таращанський > Скакун > ячмені Таращанський > Рось. Можна вважати, що толерантність досліджуваних культур і сортів до вірусної інфекції в наведеному ряду зростає. Це підтверджується також спостереженнями за розвитком візуальних симптомів захворювання та попереднім досвідом.

Висновки. При використанні методу визначення ЕП тканин інфікованих рослин зміни, які асоціюються із стресовим станом, реєструються вже на 5-у добу після інфікування, тоді як вірусний АГ і візуальні симптоми інфекції виявляються лише на 12–14-у добу.

Існування прямої залежності між зміною ЕП тканин інфікованих рослин на ранніх етапах та їхньою ураженістю на більш пізніх етапах інфікування дає змогу попередньо оцінювати чутливість нових генотипів до вірусної інфекції в контрольованих умовах.

Чутливий, експресний і бездеградаційний метод визначення ЕП, що дозволяє отримувати статистично достовірні результати швидко та одночасно в різних точках тканин і органів живої рослини, буде ефективним також при дослідженні транспорту вірусної інфекції.

Знайдена залежність між зміною ЕП і накопиченням вірусу в тканинах наймолодшої (базальної) частини листової пластинки дозволяє рекомендувати цей метод у комплексі з ІФА для попередньої оцінки інфікованості тканин зернових культур під час моніторингових обстежень.

1. Fensom D.S. // Canadian J. Plant Science. – 1986. – Vol. 46, № 2. – P. 169–173. 2. Тороп В.В. Проблеми моніторингу в садівництві. – К., 2003. – С. 145–154. 3. Кларксон Д. Транспорт іонів і структура растительной клетки. – М., 1978. 4. Wright K.M. Duncan G.H. et al. // Plant Physiology. – 2000. – Vol. 123. P. 1375–1385. 5. Колесник Л.В. // Физиология растений. – 1991. – Т. 38, вып. 5. – С. 1005–10013. 6. Колесник Л.В., Щербатенко І.С. // Доп. НАН України. – 2003. – № 1. – С. 161–166. 7.

Мищенко Л.Т., Бойко А.Л. // Доп. НАН України. – 2004. – № 2. – С. 176–180. 8. Юхименко А.І., Гірко В.С. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2001. – Вип. 35. – С. 23 – 25. 9. Гнутова Р. В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М., 1993. 10. Антитела. Методы / Под ред. Д. Кэтти. – М., 1991. – Кн. 1.

Надійшла до редколегії 27.09.04

УДК 612.017:796.072.2

С.М. Футорний, канд. мед. наук, В.К. Позур, д-р біол. наук,
М.Ю. Макачук, д-р біол. наук

ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ НА ГУМОРАЛЬНУ ІМУННУ ВІДПОВІДЬ

Узагальнено дані наукової літератури про вплив стресових факторів (інтенсивні фізичні навантаження) на стан гуморального імунітету.

In clause are generalized given of the scientific literature on influence of the stressful factors (intensive physical loadings) on condition of humoral immunity.

Широке застосування засобів і методів фізичної культури, залучення у фізкультурний і спортивний рух населення різного віку, недостатність фізичної активності, яка пов'язана з малорухомим способом життя людей, особливостями їхньої професійної діяльності, рівнем комунальних і транспортних послуг, який постійно підвищується, неминує веде до зменшення витрат фізичної сили. Це, у свою чергу, вимагає невідкладного вирішення ряду основних питань. Зокрема слід з'ясувати, які механізми забезпечують сприятливий вплив фізичних вправ на організм; яким мусить бути оптимальний рівень фізичної активності, необхідний для поліпшення здоров'я і профілактики захворювань серцево-судинної та інших систем; як усебічно й об'єктивно оцінити ефективність занять фізичними вправами з метою своєчасної їхньої корекції. Кожне з цих питань само по собі є багатоглясним, і всі ці аспекти можуть бути висвітлені лише при всебічному вивченні кожного з названих питань представниками різних медико-біологічних спеціальностей. Проте основним інтегральним показником, який може служити критерієм до вирішення кожного з цих питань, є оцінка ступінь адаптації організму до фізичних навантажень [1].

Заняття фізичними вправами викликають в організмі цілий комплекс фізіологічних і біохімічних змін, серед яких провідну роль відіграють зрушення імунологічної реактивності організму. Дослідження останніх років у галузі імунології показали, що імунна система не тільки визначає стійкість до інфекційних агентів, але й забезпечує імунологічний нагляд задля підтримки внутрішнього гомеостазу. При систематичному впливі фізичних факторів саме імунна система бере участь насамперед у формуванні адаптаційних реакцій у відповідь на ці впливи. У разі порушення імунного гомеостазу сумація тренувальних навантажень може призвести до перетренованості, перенапруги, що, у свою чергу, зумовлює розвиток передпатологічних станів, зниження резистентності організму до впливу факторів зовнішнього і внутрішнього середовища [2, 3].

Щодо впливу спортивних навантажень на імунітет досі немає єдиної думки. Ще А. Eberhardt A. [4] указував, що заняття фізичною культурою і спортом позитивно діють на організм, сприяють зниженню захворюваності, збільшують тривалість життя, поліпшують показники природного імунітету.

Однак роботи останніх десятиліть поступово змінюють цей погляд [5–7, 3]. Фізичні навантаження в сучасному спорті за останні 20–30 років зросли приблизно в 4–5 разів і є межевими для організму здорової людини. Ріст навантажень у спортсменів, зумовлений збільшенням обсягу тренувань, кількості змагань, усе частіше став поєднуватися з порушеннями функцій центральної

нервової системи і системи імунітету. Саме зі спортом пов'язана крайня форма імунodefіциту, за якої виявлялося неможливим тестування окремих класів імунoglobulinів. Існує загальноприйнята думка, що загальна результативність спортсмена визначається його функціональним станом, рівнем мотивації та силою емоційного реагування, проте останніми роками все більш зрозумілим стає і те, що успіх будь-якого спортсмена визначає ще й стан його імунної системи.

Найвніше протиріччя даних наукової літератури щодо ролі імунної системи у спортивній діяльності пов'язане передусім з різними методичними підходами до вивчення даної проблеми, оскільки більшість досліджень проводилося на спортсменах різних за віком, спортивною кваліфікацією і спеціалізацією, стажем тренувань, інтенсивністю і тривалістю фізичних навантажень тощо [8, 9, 3].

Разом з тим динаміка показників гуморального і клітинного імунітету при фізичних навантаженнях різної інтенсивності та спрямованості в осіб, що займаються фізичною культурою і спортом, свідчить про виражений вплив таких навантажень на імунну систему. При цьому відзначається дозозалежний ефект: максимальні фізичні навантаження пригнічують імунну систему, адекватні, адаптогенні – нормалізують і стимулюють її [10, 11]. Існує також зворотна залежність: порушення діяльності імунної системи (імунологічна недостатність, в якій би формі вона не виявлялася) може виявитися одним з провідних чинників, які лімітують фізичну працездатність. Виходячи з цього, науковий і практичний інтерес для дослідників становлять визначення за допомогою імунологічних методів діапазону і режимів фізичних навантажень, які мають тренувальний, оздоровчий ефект, і рання діагностика симптомів перевантаження, стомлення, а також оцінка повноти відновлення.

Установлено, що зі зниженням імунологічної реактивності відповідно змінюються і гормональні показники, які відображають динаміку механізмів ендокринної регуляції адаптації організму спортсмена. Розглядаючи цей процес у плані загального адаптаційного синдрому, деякі автори [12] припускають, що організм спортсмена в період найвищої тренуваності перебуває в стадії резистентності, для якої характерним є підвищення опірності організму до стресору (у даному випадку – до тренувальних і змагальних навантажень) і зниження її стосовно інших факторів, наприклад, до інфекційних чи простудних захворювань.

Дослідженнями [13, 14] факторів неспецифічного захисту в підлітків, що піддавалися періодично помірним фізичним навантаженням під час занять фізичною культурою і спортом у спортивних гуртках, не було виявлено скільки-небудь значимих змін гуморальних показників порівняно з контрольною групою. У той же час у підлітків

спортсменів спостерігалась деяка стимуляція факторів неспецифічного захисту, яка виявлялася в підвищенні здатності нейтрофілів до захоплення стафілокока, підвищенні продукції антитіл як нормальних, так і імунних, а також аутоантитіл до тканинних антигенів.

Дослідження Г.Н. Пропастина та співавт. [15] показали, що у спортсменів на етапі великих навантажень з акцентом роботи на витривалість спостерігається істотна зміна стану факторів як природного, так і набутого імунітету. Зокрема, при цьому знижується напруженість факторів природної резистентності, порушується диференціювання імунокомпетентних клітин, наростає кількість клітин-попередників. Така зміна імунних процесів може зумовити розвиток у спортсменів різних патологічних станів, особливо в період змагань, що робить необхідним проведення у спортсменів заходів імунокорекції.

Фізичні навантаження високої інтенсивності пригнічують переважно Т-ланку. Меншою мірою змінюються показники В-ланки імунітету.

У дослідженнях Б.Б. Першина та співавт. [16] проведені спостереження за динамікою змін інтерлейкінів у спортсменів різної кваліфікації на різних етапах підготовки. Було встановлено, що в майстрів спорту в секретах слинних залоз реєструється значиме підвищення вмісту інтерлейкіну МУЛ-2, а в групі спортсменів більш низького рівня – підвищення рівнів МУЛ-4 і γ -інтерферону (γ -ІФН). Концентрація сироваткового МУЛ-4 була вищою у групі спортсменів більш низької кваліфікації, а γ -ІФН – у групі майстрів спорту. Спостереження, проведені в інтервалі 24–48 год, виявили різкі стрибкоподібні зміни вмісту всіх досліджених цитокінів.

До подібних результатів прийшли раніше К.К. Альциванович і співавт. [17], які вивчали активність МУЛ-1 у плазмі крові собак у динаміці фізичного навантаження. Результати цих досліджень показали, що в стані спокою активності МУЛ-1 у плазмі крові тварин не виявляється, тоді як фізичне навантаження призводило до значної активності та збільшення вмісту МУЛ-1.

Отже, при аналізі стану імунної системи під впливом фізичних навантажень, необхідно враховувати багато чинників, серед яких першорядну роль відіграють інтенсивність і обсяг фізичних навантажень, кваліфікація спортсменів, їхній імунний статус і навіть пора року проведення змагань [18].

Доведено, що Т- і В-системи імунітету є найчутливішими ланками щодо впливу фізичних навантажень на організм [10]. Автори встановили факт вираженої супресорної дії надмірних фізичних навантажень на Т- і В-системи імунітету.

При імунодефіциті, який виникає за фізичного навантаження і перетренованості, поряд із загальним пригніченням Т-системи імунітету, порушуються кооперативні взаємини між різними субпопуляціями імунокомпетентних клітин. Про це, зокрема, свідчить розгальмовування В-клітинної ланки в початковій стадії розвитку імунодефіциту, що змінюється надалі його пригніченням [1].

До висновку, що фізичні навантаження мають стресорну дію на імунну систему і викликають вторинні імунодефіцити, прийшли також Н.І. Лисяний і співавт. [19], В.А. Таймазов і співавт. [3], що, на їхню думку, створює умови для виникнення інфекційних захворювань, загострення схованих вогнищ інфекцій. Іншим істотним моментом, який погіршує фізичний стан і рівень працездатності, є активація аутоімунних процесів під час фізичного тренування. Причиною цього можуть бути ослаблення супресорних механізмів ауторегуляції імунної системи, посилення аутоантигенного стимулу, активація відкритих вогнищ інфекції при великих фізичних навантаженнях, що може призводити до аутоімунного ушкодження різних тканин організму – і, в першу чергу, – серця.

Відбувається значне зрушення в співвідношенні числа Т- і В-клітин за рахунок зниження вмісту Т-лімфоцитів і спочатку відносного, а потім абсолютного збільшення кількості В-лімфоцитів, що супроводжується виникненням чітко виражених аутоімунних реакцій.

Відомо, що для характеристики В-системи імунітету оцінюють вміст у крові В-лімфоцитів, а також імуноглобулінів різних класів, нормальних антитіл тощо [13, 14].

Численними роботами Б.Б. Першина та співавт. [20] вивчено динаміку вмісту сироваткових імуноглобулінів (IgA, IgG, IgM, IgD, IgE) упродовж усіх етапів підготовки спортсменів до головних змагань сезону.

IgA бере участь у специфічному захисті внутрішнього середовища організму, однак цей клас імуноглобулінів розглядається як вирішальний фактор імунного захисту слизових оболонок. Автори зіставили значення рівнів сироваткового і секреторного IgA.

Довгострокове дослідження динаміки вмісту сироваткового IgA продемонструвало статистично істотні розходження його концентрацій на першому етапі підготовки. Більш високі значення IgA у групі "спортсменів" зберігалися на всіх етапах обстеження.

Вміст IgG у сироватці крові людини значно перевищує рівні усіх відомих класів імуноглобулінів і становить 80 %. Статистично значимі розходження в умовах довгострокових спостережень були виявлені тільки в період проведення змагань порівняно з показниками IgG на всіх попередніх зборах. Автори відзначили виражені тенденції до зміни вмісту IgG у короткострокових спостереженнях – як у період тренувального процесу, так і при проведенні змагань. Група "спортсменів" характеризувалася порівняно більш високими показниками IgG. Однак концентрації даного імуноглобуліну були нижче нормативних значень.

IgM становить 6 % від сумарної кількості всіх сироваткових імуноглобулінів і відіграє важливу роль у розвитку багатьох фізіологічних і патологічних процесів, зокрема аутоімунних захворювань. При довгостроковому вивченні вмісту IgM у більшості обстежених спортсменок на перших етапах підготовки було виявлено високі вихідні його рівні. У результаті імунодіагностики встановлено, що в процесі зростання навантажень цей показник знижувався до норми, найбільш виражено у спортсменок групи "висококваліфіковані майстри". Під час проведення змагань вміст IgM у всіх спортсменок падав нижче межі нормативних значень.

IgD становить близько 1 % від загальної кількості імуноглобулінів, у нормі присутніх у сироватці крові, поступаючись лише IgE. В умовах тренувань вміст IgD характеризувався вираженими коливаннями, що були найбільш демонстративними у групі "спортсменів". Короткострокові тестування під час окремих зборів свідчили про розкид середніх показників. У жодній з обстежених сироваток не було отримано нульових значень вмісту IgD, що, за даними літератури, відповідає нормативному показнику цього імуноглобуліну в осіб, які не займаються спортом.

Узагальнюючи отримані результати, автори зробили висновки, що в лижницької групи "спортсмени" показники досліджених класів імуноглобулінів протягом усього періоду підготовки були вищими, ніж у спортсменок групи "майстри". З усіх вивчених сироваткових імуноглобулінів тільки рівень IgA у процесі всього обстеження не виходив за межі нормативних значень, розроблених для осіб, що не займаються професійним спортом. Це підтверджує думку про необхідність проведення досліджень з метою обґрунтування нормативних параметрів імунологічних реакцій і визначення імунологічного статусу спортсменів з урахуванням статі, віку та виду спорту.

Б.Б. Першин і співавт. [20] висловили припущення про те, що майстри спорту за багато років успішних виступів за збірну команду країни пройшли імунологічну

адаптацію до високих фізичних навантажень тренувальних і змагальних періодів. Результати, наведені в цих роботах, дозволили зробити висновок, що в обстежуваних лижниць виявлено виражені дисфункції імунної системи, тому що тільки один клас сироваткових імуноглобулінів IgA впродовж усього періоду спостереження залишався в межах нормативних параметрів. Вміст IgM значно перевищував межі норми, IgG на всіх етапах обстеження тестувався за рамками нижньої межі норми. Гіперпродукція IgM може бути розглянута не тільки як компенсаторна реакція на знижені показники інших імуноглобулінів, але і як привід для обстеження лижниць, оскільки в клінічній імунології гіперпродукція IgM може бути розцінена як реакція на хронічні патологічні процеси у різних анатомічних структурах організму.

Деякими дослідниками був проведений аналіз вмісту сироваткових імуноглобулінів у сліні спортсменів під впливом фізичних навантажень [20, 21]. Так, при вивченні узагальнених тенденцій динаміки вмісту імуноглобулінів у продукті слинних залоз у групах лижниць було виявлено важливі подібності й розходження. Усі вихідні значення sIgA, IgA і IgG розташовувалися за нижньою межею норми, а показники IgD і IgE перевищували верхній рівень нормативу. В умовах змагань ці показники в усіх спортсменок статистично значимо знижувалися. Зростаючі тренувальні навантаження незначно редукували рівні IgD і IgE у майстрів, а в групі спортсменів – IgD і IgA. Зміни вмісту інших класів імуноглобулінів у динаміці мали різноспрямовані тенденції. Це продемонстровано щодо sIgA, IgA та IgD у групі майстрів і sIgA, IgE і IgG у групі спортсменів. Виявлені перепади значень імуноглобулінів в інтервалі 24–48 год, на думку авторів, можуть бути пов'язані передусім з навантаженнями, а також з використанням засобів фармакологічного забезпечення, з гормональним статусом спортсменок у різні періоди менструального циклу та з іншими факторами.

Питання про роль виду і спрямованості фізичних навантажень у формуванні імунологічної відповіді на сьогодні вивчено недостатньо, а наявні дані різних авторів [22, 1] досить суперечливі. Так, Ю.І. Бажора, В.С. Соколовський [22] вважають, що відразу після інтенсивного м'язового навантаження в імунограмі спортсмена можуть спостерігатися різні щодо своєї спрямованості й виразності зміни. Це залежить від виду спортивної діяльності, стажу, кваліфікації, спортивної форми та значимості майбутніх змагань.

Інші автори [1], провівши дослідження у представників циклічних видів спорту (академічне веслування), а також ігрових його видів (футбол і хокей), вважають, що часто повторювані цикли фізичних вправ великої потужності призводять до дуже виражених зрушень імунного гомеостазу, причому, на думку авторів, має значення лише обсяг і потужність фізичних вправ, але не їх вид і спрямованість. Таким чином, статичні навантаження достатнього рівня призводять до настільки ж закономірних змін імунологічної реактивності, як і динамічні.

Незважаючи на суперечливість даних різних авторів, усе-таки є деякі різноспрямовані закономірності в перебігу тих чи інших фізіологічних процесів в осіб, що займаються видами спорту різної спрямованості. Наприклад, [23] у відділенні обласного лікарсько-фізкультурного диспансеру були проведені спостереження за станом здоров'я 1500 юних спортсменів. Найбільша захворюваність відзначається у спортсменів-лижників, плавців, веслярів. Автори вважають, що це зумовлено тим, що заняття такими видами спорту пов'язані з охолодженням і переважанням при цьому інтенсивних фізичних навантажень, спрямованих на розвиток витривалості. Немає сумнівів, що в осіб, які займаються цими видами спорту імунна система також по-іншому має реагувати

на фізичні навантаження порівняно з представниками інших видів спорту.

До такого ж висновку прийшов Б.Б. Першин і співавт. [16, 20, 21], які при порівняльному аналізі результатів імунологічних реакцій у плавців і лижниць виявили істотні розходження у представників різних видів спорту. Так, рівні IgG і sIgA у сліні жінок-плавців у розвантажувальному періоді підготовки постійно визначалися в межах нормативних значень. У лижниць ці самі показники у вихідних пробах були значно нижче за норму, а в період збільшення навантажень ще більше знижувалися. На підставі цього зроблено висновок, що у плавців існує свій еталон імунологічної адаптації, а отже, свої нормативи, відмінні від параметрів лижного спорту. Таким чином, аналіз наукової літератури показує, що оцінку стану імунної системи під дією фізичних навантажень варто проводити з урахуванням багатьох факторів, серед яких особливу роль відіграє вид і спрямованість фізичних навантажень.

Спорт вищих досягнень впливає на процеси імуногенезу. Зміни імунітету найбільшою мірою виявляються і довгостроково зберігаються при одночасному впливі на організм емоційних і фізичних навантажень, які є характерними для більшості спортивних змагань. Поглиблене вивчення механізмів впливу фізичних навантажень на імунологічну реактивність, організація імунологічного контролю під час занять фізичною культурою і спортом, а також при корекції порушень імунологічної реактивності, що розвиваються внаслідок відхилення від оптимуму фізичної активності – сьогоденне завдання сучасної спортивної медицини.

1. Аронов Г.Е., Иванова Н.И. Имунологическая реактивность при различных режимах физических нагрузок. – К., 1987. 2. MacKinnon L.T. // Immunol. Cell. Biol. – 2000. – № 5. – Р. 500–509. 3. Таймазов В.А., Цыган В.Н., Мокеева Е.Г. Спорт и иммунитет. – СПб, 2003. 4. Eberhardt A. // Acta physiol. Pol. – 1970. – Vol. 21. – № 5. – Р. 681–690. 5. Орлова З.С., Орлова Г.С. Морфологические особенности лимфоцитов крови при нарушении иммунитета у спортсменов // Медицинский контроль в годичном тренировочном цикле подготовки высококвалифицированных спортсменов и вопросы профилактики заболеваний и травм. Сб. науч. тр. / Под ред. С.Б. Тихвинского. – М., 1984. – С. 87–96. 6. Futterman L.G., Myerburg R. // Sports Med. – 1998. – № 5. – Р. 335–350. 7. Lannergard A., Fohlman J., Wesslen L. et al. // Scand. J. Med. Sci. Sports. – 2001. – № 5. – Р. 259–266. 8. Першин Б.Б., Кузьмин С.Н., Левандо В.А. и др. // Иммунология. – 1981. – № 3. – С. 13–17. 9. Суздальский Р.С. Проявления иммунодепрессивных состояний при занятиях спортом и их коррекция // Избранные лекции по спортивной медицине / Науч. ред. проф. Б.А. Поляев. – М., 2003. – Т. 1. – С. 119–133. 10. Иванова Н.И., Талько В.В. Особенности функционального состояния различных звеньев системы иммунитета в условиях применения физических нагрузок // Медицинские проблемы физической культуры / Под ред. Э.В. Земцова. – К., 1982. – С. 32–38. 11. Суркина И.Д. // Изменения иммунологической реактивности под влиянием больших тренировочных и соревновательных нагрузок (в периоды повышенного риска) // Медицинский контроль в годичном тренировочном цикле подготовки высококвалифицированных спортсменов и вопросы профилактики заболеваний и травм: Сб. науч. тр. / Под ред. В.Б. Гилязова. – С. 72–80. 12. Гигинеишвили Г.Р., Николаева В.В., Белоусов А.Ю. // Теория и практика физ. культуры. – 1987. – № 7. – С. 25–27. 13. Шубик В.М., Левин М.Я. Имунологическая реактивность юных спортсменов. – М., 1982. 14. Шубик В.М., Левин М.Я. Иммунитет и здоровье спортсменов. – М., 1985. 15. Пропастин Г.Н., Белов А.С., Шкребло А.Н. Исследование иммунологической реактивности у спортсменов // Изучение гуморального и клеточного иммунитета у здоровых лиц и у больных / Под ред. Р.В. Петрова. – Ярославль, 1980. – С. 8–10. 16. Першин Б.Б., Гелиев А.Б., Чуракова Г.Г. и др. // Иммунология. – 2003. – № 3. – С. 167–172. 17. Альцегович К.К., Мурзёнок П.П., Гурин В.Н. Активность интерлейкина-1 плазме крови собак при физической нагрузке // Стресс и иммунитет (психонейроиммунология): Тез. докл. Всесоюз. конф. Ленинград, 1989 г. – Л., 1989. – С. 103–104. 18. Казимирко Н.К., Ляпин В.П. // Буквинский мед. вѣстн. – 2003. – № 4. – С. 72–74. 19. Лисянский Н.И., Иванова Н.И., Талько В.В. и др. Значение иммунологического контроля над занимающимися физическими упражнениями // Физическая культура, труд, здоровье и активное долголетие: Тез. Всесоюз. научн.-практ. конф., Москва, 1981 г. – М., 1981. – С. 95–96. 20. Першин Б.Б., Гелиев А.Б., Чуракова Г.Г. и др. // Иммунология. – 2003. – № 2. – С. 111–117. 21. Першин Б.Б., Гелиев А.Б., Чуракова Г.Г. и др. // Иммунология. – 2003. – № 5. – С. 298–304. 22. Бажора Ю.И., Соколовский В.С. // Теория и практика физ. культуры. – 1991. – № 5. – С. 8–10. 23. Терехина Г.И., Юрова З.В. Структура заболеваемости юных спортсменов в зависимости от вида спорта // Двигательная активность и физическое воспитание учащейся молодежи. Сб. науч. тр. – Рязань, 1984. – С. 30–32.

УДК 616.33 + 616.45-001.1/3

Т.Л. Проценко, канд. біол. наук, Т.Д. Хілько, канд. біол. наук, І.В. Якубцова, провід. інж., Л.В. Левківська, студ., І.М. Савицька, канд. біол. наук, Т.Л. Чурілова, мол. наук. співроб.

ВПЛИВ ЛІПІНУ НА ФАКТОРИ ЗАХИСТУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА ДІЇ УЛЬЦЕРОГЕННИХ ЧИННИКІВ

Досліджено динаміку морфологічних змін слизової оболонки шлунка щурів за умов дії гострого стресу та етанолу. Установлено збільшення кількості глікопротеїнів шлункового слизу у разі використання ліпину при етаноловій моделі.

The dynamics of morphological changes in gastric mucous were investigated under condition of acute stress and ethanol. It was established using lipin which increased gastric mucous glycoproteins concentration ethanol ulcer model in rats.

Вступ. Попередження та лікування гострих ерозивно-виразкових уражень слизової оболонки шлунка (СОШ) залишається складною та актуальною проблемою.

Ліпосомальний препарат „Ліпін” використовується в пульмонології, кардіології, ангіоневрології. Його також застосовують у гастроентерології при лікуванні гострого або хронічного активного гепатиту, хронічного холециститу й цирозу печінки. Проте на сьогодні вплив ліпину на виразкову хворобу ще недостатньо досліджений.

Уведення в кровотік ліпину сприяє відновленню функціональної активності пошкоджених клітинних мембран і поліпшує мікроциркуляцію крові [1]. Тому доцільно очікувати позитивний вплив препарату на клітини СОШ при ульцерогенезі.

Метою роботи було дослідити динаміку морфологічних змін СОШ за дії ульцерогенних чинників та оцінити вплив ліпину на склад глікопротеїнів шлункового слизу СОШ за умов етанолової виразки.

Детальне патоморфологічне дослідження й експериментальне моделювання перебігу виразкової хвороби допоможе уточнити механізм формування та визначити схему лікування хворих на виразку шлунка.

Об'єкт і матеріали досліджень. Дослідження впливу ліпину на динаміку загоєння виразково-ерозивних дефектів СОШ, викликаних ульцерогенними чинниками, виконували гістологічним методом. Морфологічні дослідження стінки шлунка нелінійних 110 щурів-самців масою 180–230 г були виконані на 1-у, 3-ю, 5-у, 10-у та 15-у добу експерименту, а також у інтактних тварин (контроль). Для проведення гістологічних досліджень брали ділянку стінки шлунка в ділянці макроскопічних змін слизової оболонки, викликаних ульцерогенними чинниками (стрес, етанол) [2, 3].

Відібрані зразки тканин були оброблені за загальноприйнятною схемою. Зрізи ділянок шлунка товщиною 5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, азур-2-еозином з метою оцінки стану м'язового, нервового апаратів та судинного русла стінки шлунка в ділянці ушкодження.

Визначення вмісту основних глікопротеїнів проводили на 112 нелінійних щурах-самцях масою 180–230 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. За добу проведення дослідів щурі мали доступ лише до води. Щурів розподіляли на групи: 1 – контрольна та групи, в яких моделювали етанолову виразку протягом одної доби (2 група) і восьми діб (3-я група). Для корекції етанолової виразки щурам (4-а група) вводили ліпін внутрішньоочеревинно в концентрації 30 мг на 1 тварину протягом 7 діб двічі на день.

Слиз виділяли за методом Б.В. Пітрона [4]. Відмивання слизу проводили 5 разів у фізіологічному розчині рН 4,0 і 4 рази у воді рН 7,0. Зразки одержаного слизу піддавали ступінчастому гідролізу для визначення вмісту моносахаридів. Хімічний склад структурних глікопротеїнів оцінювали за такими параметрами: гексозамінів [5], галактози [6], фукози [7] і сіалових кислот [8].

Результати експериментальних досліджень піддавали статистичній обробці з використанням *t*-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Вивчення динаміки морфологічних змін слизової оболонки шлунка за дії гострого стресу показало, що в першу добу сформувалась виразка з нерівними краями й ділянки з передвиразкою та виразкою, яка перебуває на стадії формування.

На 5-у добу спостерігається десквамація поверхневого епітелію слизової оболонки навколо зони виразки. На 7-у добу десквамація епітелію поширюється, захоплюючи шийки залоз. Спостерігається виражений набряк усіх оболонок шлунка, що свідчить про продовження атрофічного процесу. У м'язовій і серозній оболонках є скупчення тканинних базофілів, кількість цих клітин зростає в бік серозної оболонки, що вказує на напрямок розповсюдження запального процесу. Є ділянка з пошкодженою слизовою та м'язовою оболонками, тобто може утворитися проривна виразка.

На 10-у добу спостерігалась типова виразка з чітким валикоподібним краєм. На 15-у добу ще зберігався набряк стінки шлунка навколо сформованої виразки. У ділянці виразки відмічено формування грануляційної тканини, на краях якої помітні епітеліальні клітини, що свідчить про початок регенераційних процесів.

Вивчення динаміки морфологічних змін СОШ при введенні етанолу показало, що через 1 год після введення етанолу в слизовій оболонці виявлено виразку. У підслизовому шарі відмічався помірний набряк та інфільтрація його лімфоцитами й нейтрофілами. Сильний набряк спостерігався у м'язовому шарі. У серозній оболонці особливих змін не відбулося.

У 1-у добу виявлено типову виразку. У СОШ відмічені атрофічні зміни. Набряк і дистрофічні зміни в гладеньких клітинах м'язового шару шлунка. У серозній оболонці присутній набряк колагенових волокон з некротичними змінами. Судини всі пусті, кров містилася тільки у великих артеріях. Тонус судин упав, змінилося їхнє кровонаповнення, що свідчить про гіпоксію.

На 3-ю добу в ділянці виразки відмічено сильну геморагію. У СОШ відбулися зміни клітин фундальних залоз; є некротичні ділянки, в яких пошкоджена навіть м'язова пластинка, що свідчить про те, що процес виразкоутворення триває. Дистрофічні зміни спостерігалися в клітинах ауербахового нервового плетива.

На 5-у добу спостерігалася картина “типової” виразки. У СОШ відбулася повна десквамація поверхневого епітелію; дистрофічні зміни клітин фундальних залоз. Помірний набряк м'язової оболонки. Є дистрофічні зміни в клітинах ауербахового нервового сплетення. Виражений набряк у серозному шарі.

На 10-у добу в ділянці виразки слизова оболонка повністю зруйнована. Дистрофічні зміни присутні в усіх клітинах фундальних залоз. М'язова оболонка атонічна й набрякла. Місцями спостерігалось скупчення тучних клітин. Нервові клітини гангліїв мали сильні атрофічні зміни.

На 15-у добу дещо зменшився набряк шару поверхневого епітелію СОШ. У ділянці виразкового дефекту виявлено новодиференційовані клітини. Кровопостачання в зоні виразкового дефекту відновлюється. Виявлено помірну регенерацію шлункового епітелію СОШ.

Таким чином, в обох експериментальних моделях виразки простежується характерна етапність виразкоутворення та проявів регенераторних процесів, які мають чіткі морфологічні ознаки у віддалені терміни розвитку запального процесу. Проте слід відзначити, що при гострому стресі запальний процес бере початок від серозної оболонки, проникаючи до слизової, тоді як за етанолової моделі запалення поширюється від СОШ у напрямку серозної.

Уведення ліпіну після дії ульцерогенних чинників (етанол, стрес) уже на 8-у добу призвело до значного відновлення уражених ділянок СОШ, про що свідчить: зменшення набряку серозної та м'язової оболо-

нок; відновлення тонусу судин. Площа виразки зменшилася за рахунок тяжів епітеліальних клітин, які покривали ділянку дефекту.

Пристінковий шар слизу захищає шлунок і ДПК від ушкодження патогенними чинниками різного походження. Важлива роль при цьому відводиться глікопротеїнам слизу. У присутності вільних радикалів, що утворюються за дії ульцерогенних агентів реологічні властивості слизу швидко змінюються [9].

Результати досліджень показали, що за умов етанолової виразки відбувається порушення складу глікопротеїнів шлункового слизу щурів, за рахунок зниження кількості моносахаридів у СОШ щурів: гексозамінів – на 25 %, галактозамінів – на 45 %, фукози – на 50 %, сіалових кислот – на 60 %. Найбільшими були зміни фукози й сіалових кислот в етаноловій моделі порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив ліпіну на вміст моносахаридів глікопротеїнів (мкмоль/мг білка) шлункового слизу за умов розвитку етанолової виразки у щурів ($M \pm m$)

Показники	Фукоза	Галактоза	Сіалові кислоти	Гексозаміни
Контроль	58,1 $\pm$ 0,7	73,3 $\pm$ 14,3	21,9 $\pm$ 3,1	8,0 $\pm$ 0,9
Етанол (1-а доба)	47,2 $\pm$ 2,3*	27,9 $\pm$ 5,6*	13,9 $\pm$ 1,4*	4,2 $\pm$ 0,1*
Етанол (8-а доба)	50,1 $\pm$ 4,6	28,8 $\pm$ 6,6	15,1 $\pm$ 1,9	3,2 $\pm$ 1,7
Ліпін+етанол (8 доба)	64,8 $\pm$ 5,4	60,1 $\pm$ 4,8	17,7 $\pm$ 3,4	5,6 $\pm$ 0,3

Примітка: Різниця з інтактними тваринами достовірна, $p < 0,05$.

Глікопротеїни пристінкового слизу шлунку мають важливе значення для нейтралізації соляної кислоти та пепсину, попереджають механічне ушкодження слизової оболонки й завдяки адгезивним властивостям зв'язують чужорідні речовини. Тому значне зменшення глікопротеїнів у шлунку при введенні ульцерогенного чинника можна пояснити недостатньою компенсаторною адаптацією слизової оболонки гастродуоденальної ділянки.

Дослідження компонентів ГП слизу щурів з етаноловою виразкою шлунка після введення ліпіну виявило збільшення кількості всіх видів моносахаридів порівняно з тваринами 3-ї групи: гексозамінів – на 75 %, галактозамінів – на 108,7 %, фукози – на 29,3 %, сіалових кислот – на 17,2 %. Збільшення кількості моносахаридів під впливом ліпіну свідчать про підвищення резистентності слизової оболонки шлунка

Висновки. За дії етанолу та гострого стресу спостерігається характерна етапність виразкоутворення та проявів регенераторних процесів, які мають чіткі морфологічні ознаки у віддалені терміни розвитку запального процесу. Уведення ліпіну після дії ульцерогенних чинників значно прискорило відновлення уражених ділянок СОШ.

За дії етанолу відбулося суттєве зниження кількості моносахаридів шлункового слизу, що свідчить про недостатність компенсаторно-приспосувальних процесів у СОШ щурів. Відновлення складу глікопротеїнів шлункового слизу за рахунок збільшення кількісного вмісту моносахаридів під впливом ліпіну свідчить про підвищення резистентності слизової оболонки шлунка, результатом яких є трансформований хімічний склад та біологічні властивості шлункового слизу.

1. Мехтиханов М.С., Краснопольский Ю.М., Давыденко В.Б. // Теоретична і експериментальна медицина. – 2002. – № 2. – С. 14–17.
2. Гройсман С.Д., Каревина Т.Г. О влиянии атропина на стрессорные поражения слизистой оболочки желудка у крыс. – Рукопись деп. в ВИНТИ, № 452/79, 131 с. 3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / За ред. О.В. Стефанова. – К., 2001. – С. 528.
4. Питран Б.В., Атлавін А.Б., Ансіте М.Р. и др. // Мембранное пищеварение и всасывание. – Рига, 1986. – С. 107–109. 5. Boas N.F. // J. biol. Chem. – 1953. – Vol. 204. – P. 553. 6. Handel D., Kittlak W. // Z. Med. Labor Teohn. – 1963, № 4. – S. 163–169. 7. Dische Z., Shettles L. // J. Biol. Chemistry. – 1948. – Vol. 175, № 2. – P. 595–603. 8. Warren L. // J. Biol. Chemistr. – 1959. – Vol. 234, № 8. – P. 1971–1975.

Надійшла до редколегії 1.10.04

ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА АКТИВНІСТЬ ПРОТЕЇНКІНАЗ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ АСПІРИНОВОЇ ВИРАЗКИ

Досліджено активність протеїнкіназ у мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів у нормі й за дії ацетилсаліцилової кислоти. Показано, що у тварин з ерозивно-виразковими ушкодженнями слизової, які викликані аспірином, відбувається зниження активності протеїнкіназ. Попереднє внутрішньошлункове введення меланіну нормалізувало активність досліджуваних ферментів.

Proteinkinase's activity of membranes cells gastric mucous of control, ulcerogenic substances effected and complex melanin with ulcerogenic substances effected rats was studied. It was established, that proteinkinase's activity statistically reliably reduced. Preliminary intragastrically administration of melanin normalization activity of enzymes.

Вступ. Виразкова хвороба – це хронічне рецидивне захворювання, яке характеризується формуванням ерозивно-виразкових пошкоджень у шлунка з порушенням трофіки та протеолізом слизової оболонки як наслідок розладів загальних і місцевих механізмів нервової та гормональної регуляції гастродуоденальної зони.

Виникнення виразкової хвороби пов'язано з впливом ряду етіологічних факторів і включенням у певний послідовності складних багатокомпонентних систем, здатних контролювати утворення та розвиток даної патології [1]. До механізмів, які контролюють перебіг внутрішньоклітинних подій, пов'язаних з модифікацією білкових компонентів, належать процеси фосфорилування, які здійснюються системою протеїнкіназ [2].

Незважаючи на те, що за останнє десятиліття відбувся "прорив" у розумінні тонких молекулярних механізмів виразкової хвороби шлунка, істотного прогресу в лікуванні цієї хвороби досягти не вдалося. Останнім часом помітно активізувалися дослідження, спрямовані на розробку нових противиразкових препаратів природного походження з властивостями цитопротекторів і антиоксидантів [3]. У сучасній літературі є дані, що меланін різного походження виявляє гальмівну дію на шлункову секрецію у щурів, а також цитопротективні, антизапальні та імунomodуючі властивості.

Метою роботи було дослідити активність протеїнкіназ в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів в умовах дії аспірину й вивчити вплив меланіну, отриманого з чорних дріжджів *Nadsoniella nigra* var. *hesulica*, на їх активність.

Об'єкт і матеріали досліджень. Експерименти проводили на щурах-самцях з масою тіла 150–200 г. Тварин було поділено на 3 групи (по 10 тварин у кожній). 1 група – контрольна; 2 група – щури, в яких моделювали аспіринову виразку. Меланін вводили щурам *per os* у дозі 20 мг/кг за 30 хв до введення аспірину (3 група). Активність циклонуклеотид- і Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкіназ вивчали, як рекомендовано [4]. Визначення активності тирозинових протеїнкіназ проводили за рекомендаціями [5]. Про активність протеїнкіназ судили за включенням ^{32}P із ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -АТФ) у специфічні білкові субстрати.

Результати та їх обговорення. Сьогодні доведено фундаментальну роль процесів білкового фосфорилування в розвитку різних патологій і виявлено зв'язок між порушенням функціонування цих систем та виникненням хвороби. З великої групи протеїнкіназ виділяють протеїнкінazi, активність яких залежить від циклічних нуклеотидів. З літературних даних відомо, що взаємне фосфорилування цАМФ- і цГМФ-залежних протеїнкіназ є важливим елементом, що координує функції основних месенджерних систем – аденілатциклазної і поліфосфоінзитидної. Чітке узгодження процесів на цих двох рівнях регуляції клітинної активності визначає багато

закономірностей функціонування окремих клітин і організму в цілому як у нормі, так і за різних патологічних станів [6].

Установлені раніше суттєві порушення мембран клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов розвитку аспіринової виразки дозволили передбачати можливі порушення у функціонуванні ферментів, регуляція яких є тісно пов'язаною з мембранними процесами і станом структурних компонентів мембран.

Дослідження активності протеїнкіназ, що регулюються різними чинниками (цАМФ, цГМФ, фосфоліпідами та кальцієм) показало, що виразка слизової шлунка призводить до серйозних змін у процесах фосфорилування. Так, згідно з отриманими результатами при аспіриновій виразці шлунка знижувалась активність цАМФ-залежної протеїнкінazi (ПК-А) (рис. 1).

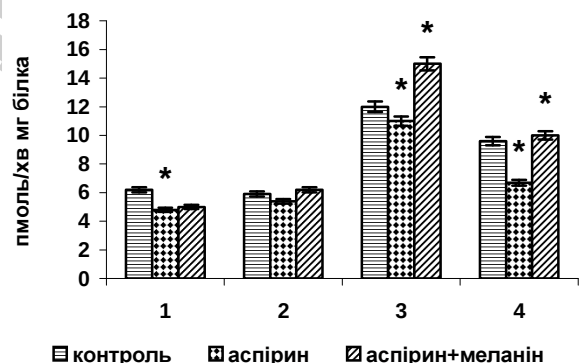


Рис. 1. Активність 1 – ПК-А; 2 – ПК-Г; 3 – ПК-С; 4 – Тир-ПК у мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів

Зниження активності ПК-А свідчить про залучення цАМФ до молекулярних подій за умов розвитку аспіринової моделі виразки, що узгоджується з даними літератури. Відомо, що аспірин є ефективним інгібітором фосфодіестерази. Важливість фізіологічної ролі цього ферменту обумовлена тим, що він гідролізує цАМФ у клітині. Зміна рівня цАМФ викликає порушення в послідовності подій, які відбуваються далі при проходженні сигналів від мембран до ядра певних клітин, а також визначає природу й функції білкових субстратів ферменту. Внутрішньоклітинний рівень цАМФ визначає активність ділянки аденілатциклазної системи, на якій здійснюється модифікація ефекторних білків шляхом фосфорилування їх цАМФ-залежними протеїнкіназами. Зміна рівня фосфорилування ефекторних білків перерозподіляє заряди і змінює конформацію біополімерів – ефекторів, що призводить до розвитку відповідної клітинної реакції.

Визначення активності Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкінazi показало, що ферментативна активність її також знижувалась в 1,2 раза в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів при досліджуванні

моделі. Можна припустити, що порушення у функціонуванні вищезгаданого ферменту можуть бути пов'язані зі змінами у фосфоліпідному складі мембран [7], як це було показано раніше нашими дослідженнями, зокрема у вмісті фосфатидилсерину (ФС), який є одним з трьох (ДАГ, Ca^{2+} , ФС) кооперативних регуляторів ПК-С. Попереднє внутрішньошлункове введення тваринам препарату меланіну підвищувало активність Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнази у 2 рази.

Цікаві дані було отримано під час визначення активності тирозинової при розвитку аспіринової виразки. Установлено суттєве зниження її активності. Можливою причиною зміни активності цієї кінзи може бути посилення синтезу інтерлейкінів, які, як відомо, інтенсифікуються при утворенні виразки шлунка. Відомо, що саме ці біологічноактивні сполуки відіграють суттєву роль у регуляції тирозинових кінз. Попереднє внутрішньошлункове введення тваринам препарату меланіну сприяло підвищенню активності тирозинової протеїнази до контрольних значень.

Висновки. Наведені експериментальні дані дають підстави передбачати залучення досліджуваних систем

фосфорилювання до біохімічних подій, які порушуються за умов розвитку виразки шлунка. Уведення меланіну призводить до нормалізації досліджуваних процесів, що, можливо, є пов'язаним з підвищенням резистентності слизової оболонки шлунка, яке відбувається за рахунок зменшення деградації гелевого шару, і приводить до гальмування структурно-функціональних пошкоджень мембран слизової оболонки шлунка щурів, викликаних аспірином.

1. Lincoln T.M., Dills W. L. // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 241. – P. 4408–4412.
2. Гривенников И.А., Булгарина Т.В., Северин Е.С. цАМФ-зависимые протеинкиназы. Свойства, регуляция и биологическая роль // Функционпная активность ферментов и пути ее регуляции / Под ред. С.Е. Северина и Г.А. Кочеткова. – М., 1981. – С. 30–58.
3. Tytgat G.N. // J. Treatment of Peptic Ulcer. // Digestion. – 1998. – Vol. 59. – P. 44652–44655.
4. Остапченко Л.И., Протас А.Ф., Кучеренко Н.Е. // Радиобиология – 1986. – Т. 26, № 6. – С. 761–765.
5. Boutin J.C. // J. of Chromatogr. – 1996. – Vol. 684. – P. 179–199.
6. Складов О.Я. Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Харків, 1993.
7. Mire A., Hoffman A. Biochim. // Et biophys. acta. – 1993. – Vol. 77. – P. 7208–7212.

Надійшла до редколегії 08.10.04

УДК 577.115.346

Л.І. Степанова, канд. біол. наук, А.В. Клепко, канд. біол. наук, І.І. Ромась, провід. інж., О.А. Лапоша, асп., Л.В. Левченко, асп.

ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЯ ТА АНТИОКИСНЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ АПІКАЛЬНОЇ МЕМБРАНИ ЕНТЕРОЦИТІВ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ТОНКОЇ КИШКИ ЗА ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ

Досліджено вміст продуктів ПОЛ в апікальній мембрані ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки через 24 год після дії іонізуючої радіації в дозах 0,1–6,0 Гр. Найбільше змінюється в мембранах вміст малонового діальдегіду та його кількість у присутності Fe^{2+} -аскорбат за дії іонізуючої радіації в дозах 1,0; 2,0; 3,0 і 6,0 Гр. Одночасно спостерігається пригнічення активності антиокисної системи.

Lipid peroxidation products content in small intestine mucous apical membrane in 24 hour after ionizing radiation action at dose 0,1–6,0 Gy was investigated. Total amount and Fe-ascorbat depend formation of malonic dialdehyde change in membrane after ionizing radiation action in doses 1,0; 2,0; 3,0 and 6,0 Gy the most. At the same time antioxidative system activity depression is observed, which state estimated on definition of rate and oxidizing inhibition constants.

Вступ. Відомо, що універсальною реакцією на дію іонізуючої радіації є активація процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) мембран [1]. Мембрани і компоненти, що містять ненасичені жирні кислоти та їхні залишки, здатні пошкоджуватися активними формами кисню й вільними радикалами. Відомо також, що регуляція реакції ПОЛ у мембранних структурах досягається за рахунок узгодженого функціонування ферментних і неферментних механізмів, порушення яких викликає зміни вільнорадикального окиснення ліпідів [2]. Установлені зміни ліпідного та жирнокислотного складу мембран ентероцитів тонкої кишки за дії іонізуючої радіації вказують на можливість активації процесів ПОЛ [3]. З метою перевірки цього припущення нами досліджено стан процесів ПОЛ після дії іонізуючої радіації на підставі оцінки вмісту дієнових кон'югатів (ДК), малонового діальдегіду (МДА), шифових основ (ШО) та антиокиснювальної активності (АОА).

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження були проведені на білих безпородних щурах-самцях, вагою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Опромінювання проводили на апараті РУМ-17 (потужність дози в повітрі 0,17 Гр/хв, фільтри 0,5 мм Си і 1 мм Al, сила струму 5 мА, напруга 200 кВ, шкірно-фокусна відстань – 50 см). Експериментальних тварин розділяли на сім груп. Перша – контрольні тварини. Щурів інших груп піддавали дії рентгенівського опромінювання в дозах 0,1; 0,4; 1,0; 2,0; 3,0 та 6,0 Гр відповідно. Через 24 год після дії радіації отримували

препарати апікальної мембрани (АМ) ентероцитів з контрольних і опромінених тварин за методикою, описаною в роботі [4] з незначними модифікаціями. Вміст білка визначали за методом Лоурі та співавт. Відносний вміст ДК оцінювали спектрофотометрично за відношенням оптичної щільності кон'югованих ($\lambda=233$ нм) та ізованих ($\lambda=218$ нм) подвійних зв'язків у мембранних екстрактах: E_{233}/E_{218} [5]. Кількість МДА визначали за методом [6], який заснований на реакції МДА з тіобарбітуровою кислотою до і після інкубації в системі Fe^{2+} -аскорбат. Вміст ШО оцінювали за інтенсивністю флюоресценції при довжині хвилі збудження $\lambda=365$ нм і флюоресценції $\lambda=435$ нм. Визначення АОА проводили за методом [7], заснованим на дослідженні кінетики окиснення відновленої форми 2,6-дихлорфеноліндофенолу натрію киснем повітря в присутності та відсутності досліджуваного препарату. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стюдента.

Результати та їх обговорення. Активація процесів ПОЛ є універсальною реакцією на дію іонізуючої радіації. Порушення в системі регуляції процесів ПОЛ викликає зміни вільнорадикального окиснення ліпідів [8]. Стан процесів ПОЛ після дії іонізуючої радіації в дозах 0,1; 0,4; 1,0; 2,0; 3,0 і 6,0 Гр в АМ ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки оцінювали за вмістом ДК, МДА, ШО та дослідженням антиокиснювальної активності.

Установлено, що вміст ДК суттєво не змінюється після дії іонізуючої радіації в досліджуваних дозах. Відомо,

що при вільнорадикальному окисненні відбувається міграція подвійних зв'язків у переважній більшості полієнових ацилів. Разом з тим, процес пероксидного окиснення з утворенням гідропероксидів може проходити й без зміни локалізації подвійних зв'язків. Таким чином, пероксидне окиснення може відбуватися і без збільшення вмісту ДК.

Розпад гідропероксидів, незалежно від механізму утворення, супроводжується утворенням вторинних продуктів ПОЛ типу МДА, які визначали в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою – ТБК-активні продукти. Саме за вмістом ТБК-активних продуктів в АМ ентеро-

цитів слизовій оболонці тонкої кишки й оцінювали кількість МДА. Аналіз проведених досліджень свідчить (табл. 1), що загальний вміст МДА збільшується після дії іонізуючої радіації в дозах 1,0; 2,0; 3,0 та 6,0 Гр у середньому на 31, 50, 56 і 69 % відповідно. За рахунок зменшення мікрів'язкості мембран може відбуватися Fe^{2+} -аскорбатзалежне підвищення рівня МДА [9]. Дійсно, у препаратах АМ, отриманих із тварин після опромінення в дозах 1,0; 2,0; 3,0 і 6,0 Гр, вміст МДА підвищується в середньому на 22, 32, 41 і 64 % відповідно.

Таблиця 1. Вміст продуктів ПОЛ в апікальній мембрані ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки щурів після дії іонізуючої радіації, ($M \pm m$, $n = 7$)

Умови досліджу		Дієнові кон'югати, (A_{233}/A_{218})	Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка		Шиффові основи, відн. од.
			-Fe-аскорбат	+Fe-аскорбат	
контроль		$0,92 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,01$	$2,23 \pm 0,21$	1,0
Доза, Гр	0,1	$0,90 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,02$	$2,31 \pm 0,20$	$1,05 \pm 0,04$
	0,4	$0,88 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,03$	$2,52 \pm 0,23$	$1,08 \pm 0,04$
	1,0	$0,85 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,02^*$	$2,74 \pm 0,24^*$	$1,10 \pm 0,03$
	2,0	$0,82 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,03^*$	$2,90 \pm 0,27^*$	$1,13 \pm 0,04$
	3,0	$0,80 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,02^*$	$3,12 \pm 0,30^*$	$1,15 \pm 0,04$
	6,0	$0,76 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,03^*$	$3,65 \pm 0,34^*$	$1,17 \pm 0,05$

* $P \leq 0,05$ відносно контролю

Кінцевим продуктом ПОЛ є утворення ШО внаслідок взаємодії вторинних продуктів ПОЛ з фосфоліпідами та білками, які містять вільні аміногрупи. Оцінку вмісту ШО в АМ ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки проводили за визначенням інтенсивності їхньої флуоресценції. Аналіз результатів дослідження свідчить про те, що за умов досліджень спостерігається незначне збільшення вмісту ШО. Лише після дії іонізуючої радіації в дозі 6,0 Гр вміст ШО підвищується в середньому на 17 %. Це може призводити до змін білок-ліпідних взаємодій і заміни їх на білок-білкові, що сприяє агрегації молекул білка.

Захист ліпідів мембран від надмірного накопичення продуктів ПОЛ виконує антиокиснювальна система. Інтегральною характеристикою функціонування цієї системи є її загальна антиокиснювальна активність, яку для АМ оцінювали за величиною константи інгібування окиснення 2,6-дихлорфеноліндофенолу натрію у присутності препаратів АМ. Установлено, що константа швидкості окиснення суттєво не змінюється після дії досліджуваних доз, спостерігається лише тенденція до її збільшення. У той же час константа інгібування окис-

нення вірогідно збільшується лише після іонізуючої радіації в дозі 3,0 і 6,0 Гр у середньому на 15 і 19 % відповідно.

Висновки. Отримані результати свідчать, що в мембранах ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки за дії іонізуючої радіації відбувається зрушення у функціональній активності окисдантно-антиоксидантної системи, причиною чого може бути модифікація окремих її ланок, що потребує подальшого дослідження.

1. Барабой В.А. Перекисное окисление липидов и радиация. – К.: Наукова думка, 1991.
2. Stange E.F., Preclik G., Schneider A. et al. // Biochim. et biophys. acta. – 1981. – Vol. 663, № 3. – P. 613 – 620.
3. Степанов Ю.В., Степанова Л.И., Войццицкий В.М., Кучеренко М.Е. // Украинский биохимический журнал. – 1999. – Т. 71, № 1. – С. 48–52.
4. Цвилюховський Н.И., Усатюк Г.В., Мельничук Д.А. // Укр. биохим. журнал. – 1988. – Т. 60, № 6. – С. 91–94.
5. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. – М., 1977.
6. Куклей М.П., Стволинский С.П., Шаврацкий В.Х., Шатрова Ю.В. // Нейрохимия. – 1995. – Т. 12, № 2. – С. 28–35.
7. Семенов В.А., Ярош А.М. // Укр. биохим. журнал. – 1985. – Т. 57, № 3. – С. 50–52.
8. Владимиров Ю.А. // Биофизика. – 1987. – Т. 32, вып.5. – С. 830–841.
9. Stange E.F., Preclik G., Schneider A. et al. // Biochim. et biophys. acta. – 1981. – Vol. 663, № 3. – P. 613– 620.

Надійшла до редколегії 10.09.04.

УДК.577.346:616.438

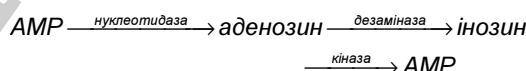
С.П. Імедадзе, провід. інж., А.В. Майданюк, канд. біол. наук,
І.К. Кисельова, інж.

ВИЗНАЧЕННЯ КІНЕТИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ 5'-НУКЛЕОТИДАЗНОЇ РЕАКЦІЇ ТИМУСА ЩУРІВ

Визначено кінетичні показники (K_m , V_{max}) 5'-нуклеотидази гомогенату тимусу щурів.

The kinetic parameters (K_m , V_{max}) of 5'-nucleotidase of rat thymus homogenate are estimated.

На мембранозв'язані ферменти впливає стан ліпідного матриксу, передусім в'язкість ліпідного компоненту мембрани й концентрація продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів. Одним з таких ферментів є 5'-нуклеотидаза (К.Ф. 3.1.3.5; 5'-рибонуклеотидфосфогідролаза). Це ліпідзалежний фермент плазматичної мембрани клітин, каталітична активність якого полягає в гідролізі АМР з утворенням аденозину.



Особливе значення 5'-нуклеотидази пов'язане з пригніченням пуринового метаболізму при імунodefіцїтних станах. Недостатність 5'-нуклеотидази тимусу 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 зумовлюють значний інтерес до вивчення цього ферменту.

© С.П. Імедадзе, А.В. Майданюк, І.К.Кисельова, 2005

На даний час накопичені численні факти про те, що фізіологічні процеси пов'язані із загибеллю одних і пошкодженням інших типів клітин. Характер загибелі клітин за стереотипним механізмом некрозу або апоптозу визначається рівнем внутрішньої організації та метаболізму ядерних клітин.

Запрограмована смерть включає в себе визначену послідовність змін у активності ферментів, яка контролюється на рівні збільшеного *de novo* синтезу білка.

Було з'ясовано, що на останній стадії розвитку кортикальних тимоцитів різке зниження рівня термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази за малої активності пуриннуклеозидфосфорилази й 5'-нуклеотидази та високої – аденозидеаминази призводить до виникнення в клітинах токсичної концентрації пуриндезоксинуклеотидів. Вважають, що саме таке співвідношення ферментів є летальним для клітин тимусу. Метаболічні шляхи, які протидіють накопиченню аденозинових нуклеозидів, каталізуються аденозидеаминазою, збільшенню концентрації гуанозинових нуклеозидів – пуриннуклеотидфосфорилазою. Якщо активність аденозидеаминази в кортикальних тимоцитах достатньо висока й лише на останніх стадіях розвитку знижується, то рівень пуриннуклеотидфосфорилази в кортикальних тимоцитах низький і збільшується лише у разі їхнього перетворення в медулярні Т-клітини. Клітини можуть уникнути загибелі від отруєння метаболітами дезоксигуанозину за умови підвищення активності пуриннуклеотидфосфорилази, що відбувається при переході їх на наступну стадію диференціювання [1].

Аналіз наведених даних свідчить про те, що дослідження 5'-нуклеотидазної активності є актуальним питанням при дослідженні біохімічних механізмів апоптозу. Проте аналіз літературних даних з дослідження активності 5'-нуклеотидази виявив, що різні дослідники при визначенні активності використовували різні концентрації субстрату, при цьому різниця коливається від мікромолярних до мілімолярних. Усе це змусило нас провести кінетичні дослідження 5'-нуклеотидазної активності у фракції "грубих" плазматичних мембран тимуса щурів.

Об'єкт і матеріали досліджень. У досліджах використовували білих нелінійних щурів масою 150 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Гомогенат тимусу центрифугували при 3000 об/хв центрифуга K23D (Німеччина). Супернатант (фракція "грубих" плазматичних мембран) використовували в подальших до-

слідах. 5'-нуклеотидазну активність отриманих препаратів гомогенату тимусу визначали за кількістю неорганічного фосфату, який утворювався в результаті ферментативної реакції в інкубаційному середовищі, до складу якого входили 2 ммоль/л AMP, 2 ммоль/л $MgCl_2$, 10 ммоль/л трис- HCl рН 8,8. Після інкубації на протязі 5–45 хв при 37 °C реакцію зупиняли додаванням 30 % ТХО. Осад відцентрифугували при 6000 g упродовж 10 хв. Неорганічний фосфат визначали в супернатанті модифікованим методом Чена. Для цього до 200 мкл супернатанту додавали 800 мкл $dist\ H_2O$, потім додавали 1 мл розчину хромогенної суміші. Для розвитку забарвлення проби інкубували протягом 45 хв при $t\ 37\ ^\circ C$, після чого проводили спектрофотометричний аналіз проб при довжині хвилі 750 нм. Результати статистично обробляли за стандартними методами.

Результати та їх обговорення. При аналізі наведених у літературі прикладів визначення активності 5'-нуклеотидази одних і тих самих тканин ми звернули увагу на значну розбіжність (у межах від мікромолярних до мілімолярних) концентрацій AMP, які використовували різні дослідники [2, 3]. Саме цей факт змусив нас провести експериментальні дослідження залежності утворення продукту 5'-нуклеотидазної в часі за різних концентрацій субстрату.

Результати цих досліджень (табл. 1) дозволяють зробити висновок про прямопропорційну залежність утворення продукту до 30 хв інкубації спостерігається при концентрації білка 50 мкг на пробу, і до 15 хв – при концентрації 100 мкг на пробу. За більш високих концентрацій білка ця залежність порушується. Тому для подальших досліджень залежності утворення продукту 5'-нуклеотидазної реакції в часі за різних концентрацій субстрату використовували концентрацію білка 50 мкг на пробу, що гарантувало лінійність утворення продукту в часі та можливість визначення початкової швидкості (V_{max}) за наведених концентрацій субстрату. Графічне зображення залежності початкової швидкості від концентрації субстрату дало можливість зробити висновок про гіперболічний характер цієї залежності, тобто кінетика 5'-нуклеотидазної реакції тимусу щурів підлягає кінетиці Міхаеліса – Ментен. Подання цієї залежності в подвійних обернених одиницях $1/V$ від $1/S$ (метод Лайнуівера – Берка) дало змогу обчислити значення максимальної швидкості (V_{max}) і константи Міхаеліса (K_m) для даної ферментативної реакції.

Таблиця 1. Параметри 5'-нуклеотидазної реакції

I. Залежність утворення Р* 5'-нуклеотидазної реакції за різних концентрацій білка, нмоль Р _n (конц. AMP 2ммоль/л)					
Час інкубації	5'	15'	30'	45'	
50 конц. б-ка (мкг)	22,5 ± 0,6	68,3 ± 1,3	132,5 ± 1,5	146,5 ± 0,9	
100	42,3 ± 0,7	126,3 ± 1,1	197,8 ± 1,2	245,3 ± 0,7	
200	83,7 ± 0,4	187,9 ± 1,4	232,3 ± 1,3	258,7 ± 0,9	
400	390,1 ± 0,5	351,4 ± 1,3	293,9 ± 1,5	274,4 ± 0,6	
II. Залежність утворення Р* 5'-нуклеотидази в часі за різних концентрацій субстрату нмоль Р _n (50 мкг білка)					
Час інкубації	5'	15'	30'	45'	
0,125 ммоль/л конц. AMP	11,8 ± 0,4	35,4 ± 1,4	29,0 ± 1,5	26,2 ± 0,9	
0,250 ммоль/л	21,5 ± 0,6	64,5 ± 1,3	61,2 ± 1,2	45,1 ± 0,8	
0,5 — " —	22,5 ± 0,5	67,5 ± 1,2	84,6 ± 1,4	119,3 ± 1,0	
1 — " —	24,7 ± 0,4	74,2 ± 1,4	125,8 ± 1,3	165,6 ± 0,8	
2 — " —	23,6 ± 0,6	70,9 м 1,3	135,4 ± 1,5	148,3 ± 0,9	
III. Залежність початкової швидкості (V ₀) від концентрації субстрату АРМ _{нмоль} хв х мф					
Конц. AMP ммоль/л	0,125	0,250	0,5	1	2
V ₀	46,6 ± 1,5	85,4 ± 1,3	89,4 ± 1,4	98,6 ± 1,5	93,4 ± 1,3
IV. Значення кінетичних констант 5'-нуклеотидазної реакції					
K _m			V _{max}		
0,2 ммоль/л			125 нмоль/хв · мф		

Примітка: Р* – продукт 5'-нуклеотидазної реакції = (Р_n)

Висновки. Результати проведених досліджень свідчать про те, що насичуючими концентраціями субстрату для 5'-нуклеотидазної реакції в гомогенаті тимусу щурів будуть мілімолярні концентрації, якими, як мінімум, є 2 ммоль/л АМФ. Одержані нами дані підтверджені результатами кінетичних досліджень 5'-нуклеотидази печінки ($K_m = 0,136$ моль/л; $V_{max} = 378$ нмоль/хв · мг) та активності даного ферменту тимуса мишей, яку визначали при 5 ммоль/л АМФ. Ураховуючи те, що найвищу активність 5'-нуклеотидази в організмі встановлено саме для печінки, логічним є майже трикрат-

не перевищення значення V_{max} для даного ферменту печінки порівняно з визначеними нами величинами V_{max} дослідження 5'-нуклеотидази для тимусу щурів [4].

1. Schuurman H.J., Laarmoven J.P., Van Broekhuizen R. et al. // Scand. J. Immunol. – 1983. – Vol. 18. – P. 539–549. 2. Якубовский С.М. // Радиобиология. – 1993. – Т. 33, вып. 3 – С. 398–400. 3. Литовченко И.Н. // Радиобиология. – Т. XXIII – Вып. 2. – С. 233–235. 4. Дмитренко Н.М. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. – Киев, 1991.

Надійшла до редколегії 10.09.04

УДК 577.113.3

К.О. Дворченко, канд. біол. наук, О.П. Матишевська, д-р біол. наук, А.В. Майданюк, канд. біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ АДЕНІННУКЛЕОТИДІВ, АДЕНОЗИНУ Й АДЕНІНУ В ОПРОМІНЕНИХ ТИМОЦИТАХ ЩУРІВ

Досліджено в динаміці вміст АТФ, АДФ, АМФ, аденозину й аденіну тимоцитів, опромінених у дозі 4,5 Гр. Установлено зниження рівня АТФ, АДФ і зростання рівня аденозину через 1 год після опромінення клітин. Через 3 год зростає вміст АМФ, а вміст АТФ, АДФ та аденозину поступово відновлюється.

Contents of ATP, ADP, AMP, adenosine and adenine of thymocytes, irradiated in a dose 4,5 Gy is investigated in dynamics. Decrease of level of ATP, ADP and increase in a level of adenosine in 1 hour after an irradiation of cells is established. In 3 hours contents of AMP increases, and contents of ATP, ADP and adenosine is gradually restored.

Вступ. Іонізуюча радіація є фактором, що викликає апоптичну загибель клітин шляхом прямої дії на ДНК і опосередковано через утворення активних форм кисню, які викликають розвиток окисного стресу [1, 2]. Важливу роль в ініціації цього процесу відіграє енергетичний стан клітини, зокрема баланс між компонентами аденілової системи. Аденіннуклеотиди виконують важливу роль у проміжному обміні в клітині, утворюючи ланки спряження між процесами, які використовують і генерують енергію. Енергетичний стан клітини визначається стаціонарними концентраціями АТФ, АДФ, АМФ і сумарною концентрацією аденіннуклеотидів [3].

У стаціонарних умовах енергетичного обміну рівновага між АТФ, АДФ і АМФ підтримується за участю низки ферментів синтезу аденілової кислоти з інозиною та її подальшого фосфорилування з утворенням АДФ і АТФ, з одного боку, і ферментами, що здійснюють фосфоролітичний і пірофосфоролітичний гідроліз АТФ і подальше розщеплення АМФ з утворенням аденозину й аденіну, з іншого боку.

Метою даної роботи було дослідити в динаміці енергетичний стан тимоцитів, які піддавались дії рентгенівського опромінення, зокрема вміст аденіннуклеотидів, аденозину та аденіну.

Об'єкт і методи досліджень. У дослідях використовували щурів лінії Вістар вагою 150 г, яких утримували на стандартному раціоні виварію. Тимоцити одержували шляхом перетирання тимусу через чотири шари нейлонової сітки в буфері для виділення клітин. Опромінення клітинної суспензії здійснювали на установці РУМ-17 за таких умов: експозиційна доза – $11,61 \cdot 10^{-2}$ Кл/кг (4,5 Гр), потужність дози – 0,24 Гр/хв, фільтри 0,5 мм (Cu + Al), напруга 200 кВ, сила струму 10 мА, фокусна відстань – 50 см. Інкубацію клітин ($2-4 \cdot 10^6$ кл/мл) здійснювали в термостаті при 37 °C у середовищі RPMI-1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки. Розділення та кількісне визначення аденіннуклеотидів на силуфолі проводили за методом, описаним у роботі [4, 5]. Пряму денситометрію пластин у відбитому світлі здійснювали на швидкісному сканері денситометра CS-920 "Shimadzu" при довжині хвилі 260 нм. Вміст досліджуваних сполук у хроматографічних плямах визначали за

допомогою калібрувальних кривих залежності площі плями від кількості нанесених хроматографічно чистих препаратів аденіну, аденозину, АМФ, АДФ і АТФ.

Результати та їх обговорення. Після хроматографічного розділення клітинних екстрактів на пластинах Silufol у контрольних тимоцитах вміст АТФ становив $1,30 \pm 0,21$ нмоль/ 10^6 клітин, АДФ – $0,61 \pm 0,05$ нмоль/ 10^6 клітин, АМФ – $0,28 \pm 0,03$ нмоль/ 10^6 клітин, аденозину – $0,11 \pm 0,02$ нмоль/ 10^6 клітин і аденіну – $0,19 \pm 0,03$ нмоль/ 10^6 клітин.

Як видно з рис. 1, уже через 1 год після початку інкубації тимоцитів, які піддавались рентгенівському опроміненню, відбуваються зміни вмісту компонентів аденілової системи порівняно з контрольними клітинами.

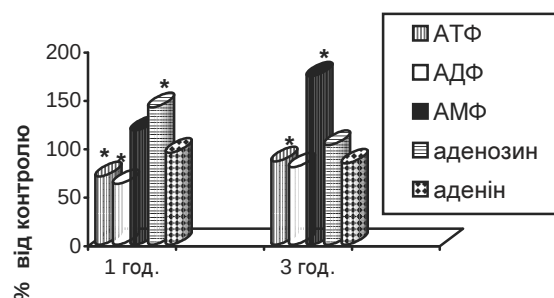


Рис. 1. Зміна вмісту аденілових нуклеотидів, аденозину й аденіну в тимоцитах через 1 і 3 год після рентгенівського опромінення ($p < 0,05$ щодо контролю)

Так, через 1 год після опромінення суспензії тимоцитів рівень АТФ і АДФ знижується відповідно на 30 і 38 % порівняно з контролем. Паралельно з цим вміст АМФ не змінюється порівняно з контролем, але через 3 год його рівень зростає на 74 %. Це вказує на те, що система синтезу АМФ та його попередника – інозилової кислоти після радіаційного впливу не вражається, а має місце порушення оптимального стаціонарного стану системи АТФ-АДФ-АМФ.

Зниження вмісту аденозину на 1-й год інкубації опромінених тимоцитів пов'язане зі зростанням катаболічних реакцій у клітинах у цей період. Відомо, що відновлення вмісту АТФ у інтактних клітинах у випадку

зниження його вмісту забезпечується насамперед посиленням поглинання кисню та підвищенням швидкості дихання для забезпечення окисного фосфорилування АДФ, сигналом для цього є підвищення вмісту АДФ. Як було раніше показано [6], інтенсивність поглинання кисню тимоцитами через 1 год після опромінення зростає, однак рівень АДФ у клітинах у цей термін був зниженим і недостатнім для відновлення вмісту АТФ. Це означає, що процес синтезу АТФ у дихальному ланцюгу порушений унаслідок роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування, і через переважання катаболічних процесів у клітинах знижується вміст АТФ і АДФ і накопичується продукт розщеплення АМФ – аденозин.

Однією з причин зниження вмісту АТФ в опроміненних тимоцитах може бути споживання нуклеотиду в поліАДФ-полімеразній реакції, необхідній для репарації ушкоджень ДНК. Проте одночасне зниження вмісту АДФ та виявлене в цей термін посилення поглинання кисню тимоцитами вказують на створення умов для м'якого роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування, яке сприяє пригніченню генерації супероксиду в мітохондріях [7].

Аналіз вмісту досліджуваних показників у тимоцитах через 3 год після опромінення вказує на часткове відновлення балансу нуклеотидів та поступове повернення вмісту АТФ і АДФ до контрольного рівня – вміст АТФ і АДФ порівняно з контролем знижений на 14 і 20 % від-

повідно. У цей термін спостерігається також нормалізація вмісту аденозину та зростання вмісту АМФ, а отже, може забезпечуватись зростання рівня АДФ унаслідок перебігу реакції: $\text{АМФ} + \text{АТФ} \rightarrow 2\text{АДФ}$. Така динаміка вмісту компонентів аденолової системи в тимоцитах після опромінення свідчить про те, що виявлені ранні порушення структурно-функціонального стану мітохондрій є тимчасовими або ж розвиваються лише в певній частині клітин у популяції.

Висновки. Виявлене через 1 год після опромінення суспензії тимоцитів зниження вмісту АТФ на фоні зниження АДФ (на 30 і 38 % відносно контролю відповідно) і посилення поглинання кисню клітинами вказує на вірогідність м'якого роз'єднання процесів окиснення та фосфорилування, спрямованого на пригнічення генерації супероксиду в мітохондріях після дії радіації.

1. Cohen-Jonathan E., Bernhard E. J., McKenna W.G. // Current opin. in chemical biol. – 1999. – № 3. – P. 77–83. 2. Blittke T.M., Sandstrom P.A. // Immunol. today. – 1994. – Vol. 15. – P. 7–10. 3. Дмитренко Н.П. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. – К., 1991. 4. Майданюк А.В. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2002. – Вип. 36–37. – С. 94–97. 5. Майданюк А.В., Імедадзе С.П. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2004. – Вип. 42–43. – С. 12–13. 6. Дворченко К.О., Миронюк В.І., Яніш Ю.В., Матишевська О.П. // Гигиена населенных мест. 36. науч. пр. – К., 2002. – № 39, Т. 2. – С. 228–233. 7. Скулачев В.П. // Рос. биомед. журн. – 2001. – № 5. – С. 116–126.

Надійшла до редколегії 22.11.03

УДК 577.353

В.В. Гавриленко, магістр, Д.С. Каніболоцький, канд. хім. наук, М.С. Мірошніченко, д-р біол. наук, В.Л. Зима, д-р біол. наук, Т.Л. Давидовська, д-р біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ КОНФОРМАЦІЙНОЇ РУХЛИВОСТІ НЕНАСИЧЕНОГО ІОНОМ КАЛЬЦІЮ ТРОПОНІНУ С СЕРЦЕВОГО М'ЯЗА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДИНАМІКИ

Досліджено конформаційні зміни, що відбуваються у тропоніні С серцевого м'яза курчати при вивільненні іону кальцію з білка в наносекундному інтервалі методом молекулярної динаміки. Порівняльний аналіз отриманих результатів і експериментальних даних рентгеноструктурного аналізу, ядерного магнітного резонансу, флуоресцентної спектроскопії та нейтронного розсіювання показав значну точність і адекватність розрахунків. Показано, що при вивільненні іона Ca^{2+} збільшуються повздовжні розміри тропоніну С, відбувається переорієнтація α -спіралей N-домену та спостерігається тенденція до закривання гідрофобної кишені.

Conformational changes of chicken cardiac troponin C caused by calcium release from protein have been investigated in nanosecond interval using molecular dynamics simulations. Comparative analysis of obtained results and experimental data of X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, fluorescence spectroscopy and neutron scattering has shown adequate accuracy of calculations. It is shown that release of calcium leads to increase of longitudinal size of troponin C, reorientation of α -helices of N-domain and closing of hydrophobic pocket.

Вступ. Скорочення серцевого і скелетного м'язів регулюється спеціальним білковим тропонін-тропоміозиновим комплексом, який розташований на актиновому філаменті. Було встановлено, що тропонін складається з трьох субодиниць, кожна з яких виконує свої специфічні функції. Тропонін С (ТНС) відповідає за Ca^{2+} -залежну регуляцію м'язового скорочення, тропонін І інгібує АТФазну активність актомиозину і тропонін Т забезпечує прикріплення тропоніну до тропоміозину [1]. Детальний механізм роботи тропоніну С поки що достовірно не відомий.

Відомо, що мутації в генах, які кодують білки тропонінового комплексу, можуть спричиняти гіпертрофічну або розширену кардіоміопатію. Протягом останнього десятиріччя було з'ясовано важливість генетичних дефектів, що успадковуються, у патогенезі кардіоміопатій [2]. Уточнення ролі цих генів у функціях серцевого м'яза та шляхів, якими мутації в цих генах ведуть до гіпертрофії або дисфункції скорочення в різних фізіологічних умовах, є дуже важливою проблемою медицини та фундаментальної науки. Для розуміння причин виникнення хвороби необхідно докладно з'ясувати механізм регуляції скорочення міокарда на молекулярному рівні

з використанням чутливих експериментальних і теоретичних методів, зокрема методу молекулярної динаміки білків. Тропонін С серцевого м'яза (сТНС) є потенційним об'єктом для лікування хворих з гострим інфарктом міокарду та наступною серцевою недостатністю, коли хворий міокард не відчуває підвищення концентрації цитозольного кальцію [3, 4].

Тропонін С – білок масою 18 кДа, який регулює скорочення міокарду шляхом зв'язування іонів Ca^{2+} . Тропонін С має від 159 до 162 амінокислотних залишків. Якщо відсутні зв'язані іони кальцію, одна молекула тропоніну С має заряд -29 [1]. Пари α -спіралей А і В, С і D, Е і F, G і H формують центри зв'язування іонів кальцію відповідно перший, другий, третій, четвертий (рис. 1, а).

Молекула сТНС складається з двох глобулярних доменів (N і C), з'єднаних між собою центральною α -спіраллю. N-кінцевий домен ТНС (амінокислотні залишки 1–85 [3]) містить два центри зв'язування іонів кальцію. Перший центр сТНС інактивований унаслідок мутації, тому він не зв'язує ці катіони на відміну від ТНС скелетного м'яза. С-кінцевий домен ТНС (амінокислотні залишки 95–161) має два активні Ca^{2+} -зв'язувальні центри.

Константа дисоціації цих центрів досить низька, тому вони не можуть брати участь у регуляції м'язового скорочення [5]. Центральна α -спіраль сТНС з'єднує глобулярні домени й може бути важливою у пристосуванні до стеричної взаємодії між сТНС і тропоніном I [5]. Гідрофобна кишеня, яка складається з амінокислотних залишків 20, 24, 36, 41, 45, 48, 57, 60, 61, 64, 72, 74, 77, 78, 80, 81, 85, є можливим місцем контакту ТНС з тропоніном I [3].

При зв'язуванні іонів кальцію N-кінцевим доменом ТпС відбуваються конформаційні зміни білка, які призводять до посилення взаємодії між тропоніном С і тропоніном I в тропоніновому комплексі. Припускають, що це, у свою чергу, ініціює м'язове скорочення [5]. Для ТНС скелетних м'язів встановлено, що при зв'язуванні іонів кальцію двома регуляторними сайтами в N-домени відбувається його перехід у "відкриту" конфор-

мацію, яка характеризується значно більшим ступенем експонованості гідрофобної кишені [5, 6, 7]. Однак детальний механізм конформаційної перебудови тропоніну, викликаний зв'язуванням кальцію, сьогодні вивчено не повністю.

На сучасному рівні розвитку молекулярної динаміки поки що не було досліджено конформаційну рухливість тропоніну С. Проводилися розрахунки динаміки кальмодуліну [8], який також належить до родини білків "EF-руки", але незважаючи на надзвичайну структурну подібність кальмодуліну до ТНС, функції цих білків дуже різні, а отже, можливо, і різні механізми їхньої рухливості. Тому метою даної роботи було дослідження конформаційної поведінки сТНС при звільненні іона кальцію з N-домену.

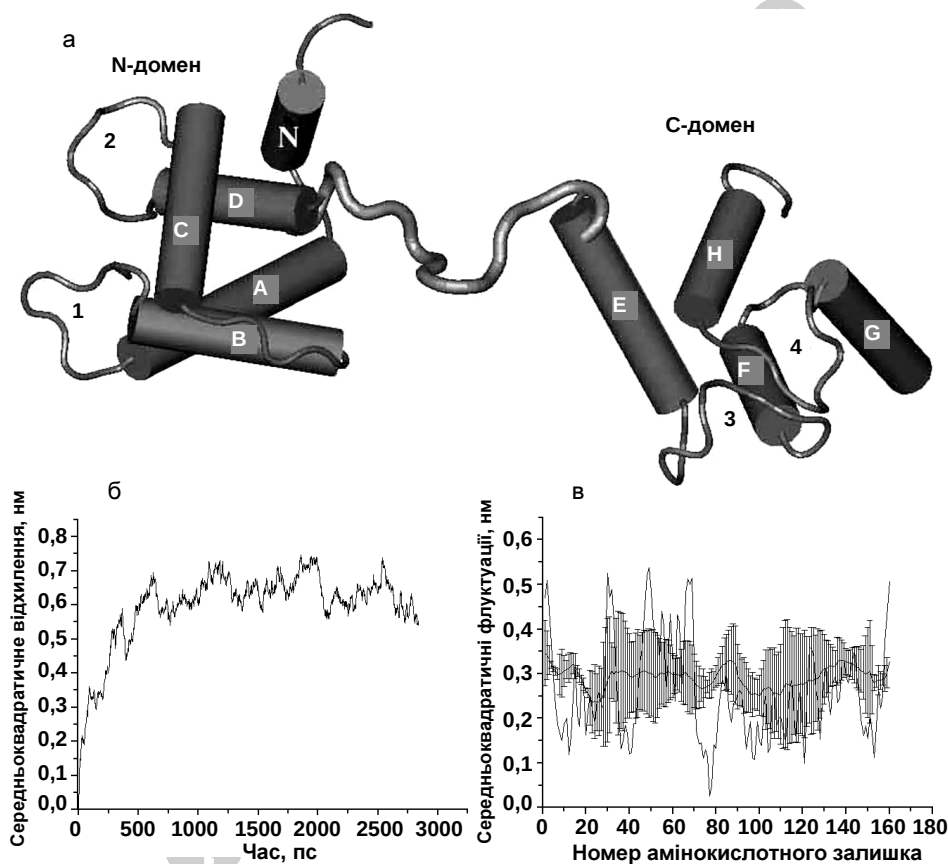


Рис. 1. Будова тропоніну С серцевого м'яза (структура ЯМР). Білими літерами позначено назви α -спіралей. Сайти зв'язування іонів кальцію пронумеровано (а). Залежність середньоквадратичного відхилення від часу, розрахована для важких атомів молекули ТНС (б). Середньоквадратичні флуктуації C_{α} -атомів молекули ТНС, розраховані для рівноважної ділянки траєкторії та побудовані на основі В-факторів з рентгеноструктурного аналізу (з довірчими інтервалами) (в).

Об'єкт і матеріали досліджень. Дослідження конформаційної рухливості ненасиченого іонами кальцію тропоніну С міокарда використовували метод молекулярної динаміки [9]. Для розрахунків було взято структуру Ca^{2+} -насиченого ТНС серцевого м'яза курчати, отриману за допомогою ЯМР-спектроскопії (код pdb – 1la0) [6]. Початковий файл з двома іонами Ca^{2+} був отриманий видаленням одного іона кальцію з другого центра зв'язування N-домену.

Для обчислень використовувався пакет програм GROMACS 3.1.4 [9] з такими параметрами: загальне силове поле – GROMOS 96; алгоритм фіксації довжин зв'язків – LINCS; мінімальна відстань від білка до стінок боксу – 1,5 нм; геометрія боксу – зрізаний окта-

едр; алгоритм розрахунку далеких електростатичних взаємодій – PME (Particle-Mesh Ewald Sum); подвійна відсічка 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.

Бокс навколо білка був заповнений молекулами води моделі SPC. До системи було додано 25 іонів Na^{+} . У результаті сумарний заряд системи дорівнював нулю. Кількість атомів у системі – 97795 (серед них 1597 – атоми білка), кількість молекул води й катіонів – 32064.

Мінімізація енергії початкової структури проводилася за допомогою чергування алгоритмів steepest descent

і conjugated gradient (2000 кроків). Час динаміки з обмеженими конформаційними рухами білка (position restrained dynamics) для врівноваження розташування молекул води був 50 пс. Тривалість розрахунку повної динаміки системи становила 2800 пс.

Аналіз проводився за такими параметрами.

Середньоквадратичне відхилення (RMSD – root mean square deviation) розраховувалося для важких атомів молекули білка через кожні 2 пс відносно початкової конформації ЯМР (програма g_rms):

$$\text{RMSD}(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}},$$

де $M = \sum_{i=1}^N m_i$, $r_i(t)$ – положення атома i в момент часу t .

Середньоквадратичні флуктуації для C_α -атомів поліпептидного ланцюга (програма g_rmsf).

Радіус гірації білкової молекули (програма g_gyrate):

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i}},$$

де m_i – маса атома, r_i – радіус-вектор атома відносно центра мас білка.

Відстань між центрами мас груп атомів (програма g_dist).

Кути між α -спіралями (програма g_sgangle).

Гідрофобна складова площі гідрофобної кишені білка (програма g_sas).

Візуалізація структур здійснювалася за допомогою програми VMD [10].

Результати та їх обговорення. Середньоквадратичне відхилення (рис. 1, б) характеризує ступінь відмінності структури в певний момент часу від початкової конформації. Як видно з графіка, протягом перших 500 пс динаміки система проходить етап врівноваження. Подальша динаміка характеризується стабільністю на рівні $0,64 \pm 0,04$ нм. Досить різкі флуктуації навколо стаціонарного рівня середньоквадратичного відхилення спричинені гнучкістю α -спіралі, яка з'єднує домени білка. Це ускладнює чітке накладання структури в певний момент часу на початкову структуру та обчислення адекватного значення відхилення. Усереднені дані, наведені нижче, були розраховані тільки для рівноважного періоду динаміки з 500 до 2800 пс.

Для верифікації даних розрахунку було обчислено середньоквадратичні флуктуації C_α -атомів білка з кристалографічних В-факторів. Для розрахунку було взято чотири структури людського тропоніну С серцевого м'яза в комплексі з тропоніном І, отриманих за допомогою рентгеноструктурного аналізу (PCA) – код у базі даних з білкових структур – 1J1D. Значення В-факторів (В) для C_α -атомів білка було перераховано на середньоквадратичні флуктуації (RMSF) за формулою:

$$\text{RMSF} = \frac{1}{20\pi} \sqrt{\frac{3B}{2}}$$

та використано для побудови довірчого інтервалу з вірогідністю 0,95.

Як видно з рис. 1, в, середньоквадратичні флуктуації C_α -атомів, обчислені з даних молекулярної динаміки, добре узгоджуються з експериментальними даними PCA. Вихід за межі довірчого інтервалу зв'язаний з тим, що поверхневі амінокислотні залишки ТНС взаємодіють

із сусідніми макромолекулами кристалі. В області контакту білкових молекул рухливість атомів знижена, тому й довірчий інтервал звужений.

Радіус гірації дорівнював $2,42 \pm 0,05$ нм і не виявляв чіткої тенденції до збільшення або зменшення. Стабільність радіуса гірації свідчить про відсутність артефактної компактизації білкової молекули під час обчислень, що підтверджує адекватність останніх. Така величина визначеного параметра добре узгоджується з експериментальними даними з розсіювання нейтронів і γ -променів для тропоніну С скелетного м'яза – $2,39$ нм [11].

Автори [12] для вимірювання відстані між доменами в сТНС використовували метод флуоресцентних міток: досліджувалося перенесення енергії збудження від донора Trp^{3+} у третьому сайті зв'язування кальцію в С-домени до акцептора Cys35 у N-домени. Акцептором енергії збудження був ідіоацетамідотетраметілпроламін, який зв'язувався з Cys35. У присутності Ca^{2+} у другому регуляторному центрі відстань між доменами зменшувалася на $0,6$ нм в ізолюваному сТНС. Зменшення цієї відстані було набагато меншим у комплексі сТНС з іншими білками тропонінового комплексу. Середня величина відстані між третім сайтом зв'язування кальцію та Cys35 у наших розрахунках дорівнювала $5,6 \pm 0,18$ нм. Причому спостерігалось деяке збільшення цього параметру з часом від $5,36 \pm 0,06$ нм до $5,94 \pm 0,09$ нм протягом усього періоду динаміки, що добре узгоджується з експериментальними даними.

У роботі [13] були виміряні відстані між амінокислотними залишками 12 Trp і 51 Cys, 20 Trp і 51 Cys методом флуоресцентної спектроскопії. Використовувалися мутантні білки з одним триптофаном і одним цистеїном. До цистеїну приєднувалася флуоресцентна мітка 1,5-(ідіоацетамідоетил)амінонафтален-1-сульфонової кислоти. З'ясувалося, що внаслідок звільнення іона Ca^{2+} відстані між указаними залишками зменшуються. Нами було проведено аналіз відповідних відстаней у моделюваній системі й виявилось, що протягом усього періоду динаміки спостерігається їх зменшення. У зв'язаному з іонами кальцію стані відстань між 12 Trp і 51 Cys становила $2,75$ нм у початковій структурі ЯМР і наприкінці модельованого проміжку часу зменшилася до $1,85 \pm 0,09$ нм. Дистанція між 20 Trp і 51 Cys відповідно мала значення $2,09$ нм і $1,42 \pm 0,07$ нм. Таке зменшення відстаней всередині N-домени при моделюванні вивільнення іона кальцію узгоджується з даними флуоресцентної спектроскопії.

У роботі [14] на основі досліджень ЯМР заперечуються дані, які отримані за допомогою методу кругового дихроїзму, щодо зростання кількості α -спіралей у ТНС скелетних м'язів при зв'язуванні іонів кальцію. Робиться припущення, що зміни в еліптичності, які реєструються методом кругового дихроїзму, пов'язані не зі зміною кількості α -спіралей, а зі зміною їхньої взаємної просторової орієнтації. Для з'ясування цього питання нами було досліджено динаміку зміни кутів між парами α -спіралей, які формують сайти зв'язування іонів кальцію сТНС. Спостерігалось помітне зменшення значення кутів між α -спіралями А і В, С і D, тоді як величини кутів між Е і F, G і H перебували приблизно на сталому рівні (табл. 1).

Таблиця 1. Порівняння значення кутів між α -спіралями ТНС

α -спіралі	Початкова структура ЯМР	Середні значення молекулярної динаміки за період від 500 до 2800 пс	Середні значення молекулярної динаміки за період від 1500 до 2800 пс
A i B	138,9	151,8 $\pm$ 8,2	155,0 $\pm$ 5,4
C i D	107,3	131,7 $\pm$ 5,5	132,6 $\pm$ 4,7
E i F	106,4	100,7 $\pm$ 8,3	99,4 $\pm$ 8,2
G i H	116,6	120,6 $\pm$ 5,9	118,5 $\pm$ 4,4

Дані таблиці говорять про конформаційні зміни в N-доміні, які пов'язані з його насиченістю іоном кальцію. При вивільненні цих катіонів відбувається переорієнтація α -спіралей у N-доміні, тоді як C-доміні змінюється незначно. Характерним є те, що видалення іонів кальцію з другого сайту зв'язування, який сформований α -спіралями C і D, впливає не лише на збільшення величини кута між цими двома спіралями, а ще й викликає значну зміну взаємної орієнтації α -спіралей A і B, що формують перший сайт зв'язування. Ці дані свідчать про те, що регуляторний N-доміні функціонує як структурна й енергетична єдність, незважаючи на те, що перший сайт не здатен зв'язувати іони кальцію. Такого ж висновку дійшли автори [15] при аналізі змін конформаційної ентропії ТНС міокарда та скелетних м'язів при зв'язуванні іонів кальцію.

Було досліджено поведінку гідрофобної кишені, яка є головним місцем контакту тропоніну C з тропоніном I. Було встановлено, що при вивільненні іона кальцію площа гідрофобної складової кишені зменшується. Для початкової структури ЯМР площа має значення 13,0 нм², а для усередненої конформації, одержаної за результатами молекулярної динаміки – 8,3 $\pm$ 0,38 нм². Таке зменшення гідрофобної поверхні може призводити до зменшення контакту тропоніну C з тропоніном I за відсутності кальцієвого сигналу й лежати в основі механізму функціональної активності тропоніну C серцевого м'яза.

Висновки. Нами вперше за допомогою методу молекулярної динаміки було проведено розрахунки Ca^{2+} -залежної конформаційної рухливості тропоніну C серцевого м'яза курчати в наносекундному часовому інтервалі. Результати мають високий рівень достовірності, що підтверджено багатомасштабними експериментальними даними.

Було зафіксовано істотну переорієнтацію α -спіралей у N-доміні внаслідок вивільнення іона кальцію,

тоді як у C-доміні таких конформаційних змін виявлено не було. Виявлено також збільшення повздовжніх розмірів тропоніну C при видаленні іона кальцію з другого сайту зв'язування N-доміні. Зареєстровано зменшення гідрофобної складової площі гідрофобної кишені досліджуваного білка в ненасиченому іонами кальцію стані, що може лежати в основі механізму функціональної взаємодії тропоніну C з тропоніном I.

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.

1. Филатов В.Л., Катруха А.Г., Буларина Т.В., Гусев Н.Б. // Биохимия. – 1999. – Т. 64, вып. 9. – С. 1155–1174.
2. Fatkin, Diane and Robert M. Graham // Physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82, № 4. – P. 945–980.
3. Sia S.K., Li M.X., Spiracopoulos L. et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, № 29. – P. 18216–18221.
4. Sorsa T., Heikkinen S., Abbott M.B. et al. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, № 12. – P. 9337–9343.
5. Slupsky C.M., Sykes B.D. // Biochemistry. – 1995. – Vol. 34, № 49. – P. 15953–15964.
6. Dvoretzky A., Abusamhadneh E.M., Howarth J.W., Rosevear P.R. // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, № 41. – P. 38565–38570.
7. Gagne S.M., Li M.X., Sykes B.D. // Biochemistry. – 1997. – Apr. 15, № 36 (15). – P. 4386–4392.
8. Yuto Komeiji, Yutaka Ueno, Masami Uebayasi // FFBS Letters. – 2002. – Vol. 521. – P. 133–139.
9. Van der Spoel D., van Buuren A.R., Apol E. et al. Gromacs User Manual. – Groningen, 2002.
10. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Molec. Graphics. – 1996. – Vol. 14. – P. 33–38.
11. Olah G.A., Rokop S.E., Wokop C.L. et al. // Biochemistry. – 1994. Vol. 33, № 27. – P. 8233–8239.
12. Dong W.-J., Robinson J.M., Xing J. et al. // Protein Sci. – 2000. – Vol. 9, № 2. – P. 280–289.
13. Dong W.-J., Xing J., Villain V. et al. // The J. Of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274, № 44. – P. 31382–31390.
14. Gagne S.M., Tsuda S., Li M.X. et al. // Protein Sci. – 1994. – Vol. 3, № 11. – P. 1961–1974.
15. Spiracopoulos L., Gagne S.M., Li M.X., Sykes B.D. // Biochemistry. – 1998. – Vol. 37, № 51. – P. 18032–18044.

Надійшла до редколегії 01.10.04

УДК 577.391:311

Д.С. Корольова, студ., А.Л. Фролов, студ., Н.О. Гаман, студ., Р.В. Сівко, студ., Л.І. Гавриш, канд. біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ H^+/K^+ -АТФази В ГОМОГЕНАТІ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ВИРАЗКИ ШЛУНКА

Установлено оптимальні умови для функціонування H^+/K^+ -АТФази в системі викликаного стресової виразки шлунка та кінетичні характеристики ферментативної реакції.

It was installed the optimal conditions H^+/K^+ -ATPase functioning in stress ulcer systems and fermentative reaction kinetic characteristic.

Вступ. Сьогодні одним з найпоширеніших захворювань органів травлення залишається виразкова хвороба. Одним із основних "пускових механізмів" розвитку даної патології є стресорний вплив.

При розвитку виразкової хвороби шлунка відбувається значне зростання різноманітних процесів у мембранах клітин слизової, які відповідають за виділення соляної кислоти, що приводить до пошкодження їхньої структури. У результаті відбуваються зміни у функціонуванні мембранних насосів, зокрема шлункової H^+/K^+ -АТФази, що є електронейтральною помпою, яка каталізує антипорт іонів H^+ та K^+ за затратою енергії АТФ [1]. Даний фермент міститься в апікальній мембрані паріє-

тальний клітин шлунка і задіяний у процесі виділення соляної кислоти даними клітинами [2]. Шлункова H^+/K^+ -АТФаза під час своєї роботи забезпечує поглинання позаклітинного K^+ і секрецію H^+ . Має два функціональні стани (E_1 і E_2). У цілому процес обміну внутрішньоклітинного H^+ на позаклітинний K^+ включає декілька реакцій: фосфорилювання, дефосфорилювання і E_1E_2 перехід [1]. Іони K^+ , що приєднується до E_2 -Ф комплексу, зумовлюють дефосфорилювання ферменту, звідси зміну його конформації до E_1 -форми, яка має низьку афінність до іонів K^+ на цитоплазматичній стороні мембрани. Залишок аспарагінової кислоти, що фосфорилює-

ся АТФ, міститься на великій внутрішньоклітинній петлі каталітичної субодиниці [3].

H^+/K^+ -АТФаза належить до катіон-транспортуючих аденозин 5'-трифосфатаз (АТФаз), яка утворює фосфат аспарагінової кислоти як проміжну сполуку під час гідролізу АТФ. H^+/K^+ -АТФаза найбільш споріднена з Na^+/K^+ -АТФазою структурно і функціонально. Ці ферменти мають у своєму складі α - і β -субодиниці, що відрізняє їх від мономерних Ca^{2+} -АТФаз (саркоплазматичного ретикула і плазматичної мембрани) і протонної АТФази [3].

Субодиниця α H^+/K^+ -АТФази є трансмембранним білком з молекулярною масою 112 кДа. Дана субодиниця виконує каталітичну функцію, містить АТФ-зв'язувальний сайт, сайт фосфорилування, зв'язувальний сайт для інгібіторів протонних pomp і сайти, відповідальні за впізнання іонів [4].

Субодиниця β є глікопротеїном з 33 кДа коровим пептидом [3], що має єдиний трансмембранний сегмент, маленький цитоплазматичний С-кінцевий і великий позаклітинний N-кінцевий домени із сімома потенціальними сайтами глікозилювання. Сучасні дослідження передбачають, що ступінь глікозилювання впливає на ферментативну активність. Також були висловлені припущення, що вуглеводи β -субодиниці відіграють роль захисту холоферменту від жорстких умов позаклітинного середовища. Крім цього, у позаклітинному домені β -субодиниці є шість цистеїнових залишків, що формують три дисульфідні зв'язки. Ці зв'язки є важливими для підтримання структурної й функціональної стабільності ферменту, вони є відносно стійкими щодо відновлення [3]. Руйнування позаклітинних дисульфідних зв'язків у межах позаклітинного домену β -субодиниці призводить до інактивації H^+/K^+ -АТФази і зумовлює структурні зміни в межах цитоплазматичного домену α -субодиниці. Хоча сьогодні остаточно не є визначеним функціональне значення β -субодиниці, можна передбачити, що взаємодія між обома субодиницями H^+/K^+ -АТФази є важливою ланкою, що забезпечує функціональну і структурну стабільність ферменту.

H^+/K^+ -АТФаза є прямою мішенню за різноманітних патологічних станів. Аутоантитіла, специфічні до α - і β -субодиниць H^+/K^+ -АТФази, знайдено в крові всіх пацієнтів з аутоімунним гастритом і в більше ніж 90 % хворих на B_{12} -фолієво-дефіцитну анемію. Також відомо, що даний фермент має велике значення при розвитку таких кис-

лотозалежних хвороб, як гастроєзофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ), гастрити й дуоденіти, пептичні виразки шлунка та дванадцятипалої кишки різної етіології, виразкоподібна функціональна диспепсія, синдром Золлінгера – Еллісона, ідіопатичні гіперсекреторні стани [4].

Метою роботи було визначення активності H^+/K^+ -АТФази клітин слизової оболонки шлунка при утворенні стресової моделі виразки, а також визначення оптимальних умов функціонування даного ферменту в зазначеній системі.

Об'єкт і матеріали досліджень. Дослідження проводили на лінійних щурах (самцях) масою 180–220 г. Стрессова виразка викликала за методикою С.Д. Гройсмана і Т.Г. Каревіної ("імобілізаційний стрес") [5]. Активність H^+/K^+ -АТФази визначали в гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка.

Активність H^+/K^+ -АТФази визначали таким чином: в інкубаційному середовищі об'ємом 1 мл (40 ммоль/л $tris-HCl$ (рН 7,4), 3 ммоль/л $MgCl_2$, 3 ммоль/л АТФ, 5 ммоль/л NaN_3 , 1 ммоль/л оубайн.). Визначали загальну активність, запускаючи реакцію 50 мкг білка з подальшою інкубацією 30 хв за температури 37 °С. Зупиняли реакцію 1 мл 10 %-ї трихлороцтової кислоти; білок осаджували центрифугуванням при 3000 об./хв протягом 10 хв. У супернатанті визначали кількість неорганічного фосфору, що виділився при гідролізі АТФ, за методом Фіске – Суббароу. Визначали K^+ -АТФазну активність описаним шляхом за умов наявності в інкубаційному середовищі 15 ммоль/л KCl . H^+/K^+ -АТФазна активність визначалась як різниця загальної АТФазної активності та K^+ -АТФазної активності.

Результати та їх обговорення. Активність H^+/K^+ -АТФази є відмінною в різних тканинах і клітинах. Для визначення активності H^+/K^+ -АТФази в клітинах слизової оболонки шлунка були досліджені оптимальні умови для дії даного ферменту.

За результатами дослідження впливу рН середовища й температури інкубування H^+/K^+ -АТФази клітин слизової оболонки шлунка в контролі й за умов розвитку стресової виразки було встановлено, що найвища активність ферменту спостерігається при значеннях рН 7,4 (табл. 1). Отриманий температурний оптимум становив 37 °С, що відповідає стандартній температурі інкубації ферментативного середовища (табл. 1).

Таблиця 1. Активність H^+/K^+ -АТФази за різних значень температури й рН інкубаційного середовища

Параметри інкубаційного середовища	Значення параметрів інкубаційного середовища	Активність H^+/K^+ -АТФази, %
Температура, °С	7	9,5
	22	28,5
	37	99,7
	45	71,2
рН	6,8	59,5
	7,4	98,5
	7,6	89,3
	8	83,3

Оптимальні умови функціонування H^+/K^+ -АТФази в клітинах слизової оболонки шлунка щурів у досліджуваній моделі були також охарактеризовані за визначенням кінетичних параметрів відповідної фосфатазної реакції (K_m і V_{max}). За результатами дослідження залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату (при вищезазначених оптимальних умовах) було встановлено, що K_m становить 1,45 ммоль, а V_{max} – 1,48 мкг / хв мг білка.

Висновки. Установлено, що оптимальними умовами для функціонування H^+/K^+ -АТФази в системі викликаній стресової виразки є 37 °С та рН 7,4. За таких умов кінети-

чні характеристики ферментативної реакції становили: $K_m = 1,45$ ммоль і $V_{max} = 1,48$ мкг/хв мг білка.

1. Herman G.P., Corne H.W., Feico M.A. // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270, № 14. – P. 7890–7895.
2. Curtis T. Okamoto G., John G. // J. of Physiology – 2001. – Vol. 532, № 2. – P. 287–296.
3. Reuben L.S. // Pros. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol. 87, №17. – P. 6767–6771.
4. S. Asan M.A., Tega K. // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, № 5. – P. 2740–2745.
5. Kurinets A., Lichtenberger L. // Dig. Dis. Sci. – 1998. – Vol. 43, №4. – P. 786–790.

Надійшла до редколегії 08.10.04

УДК 616.33

Н.В. Євтушенко, канд. біол. наук, І.П. Галич, канд. біол. наук

ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦІОНУВАННЯ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ

Зроблено огляд сучасних поглядів щодо функціонування глікопротеїдів, зокрема вуглеводної частини молекули. Наведено дані щодо порушення процесу глікозилювання за різних патологій.

Review of modern notions about functions of glycoproteids namely configuration of carbohydrate in molecule has performed. Data on derangement of glycosylation process have been cited at different pathologies.

Будова й функції глікопротеїнів. Інтерес до глікобіології, що намітився в останні роки, зумовлений тим, що серед вуглеводів нуклеїнових кислот і білків найвищу інформативну ємність мають вуглеводи у складі макромолекул [1-9], оскільки серед перерахованих структур у них найвищий потенціал структурного різномаття. Нові методичні підходи та технології дозволяють отримати й вивчити сполуки такого класу, як глікокон'югати (ГК).

Глікокон'югати – це глікозильовані макромолекули, які відрізняються своїм складом. У молекулі ГК відмічають аглікановий і глікановий (олігосахаридні ланцюги) компоненти. Остання класифікація глікозильованих макромолекул ГК, запропонована А. Варкі та Х. Фріз, бере за основу тип зв'язку, за допомогою якого глікан приєднується до агліканового компоненту [6]. Групу ГК, де олігосахариди приєднуються через N- або O-зв'язки, автори називають глікопротеїдами. Крім останніх, до ГК відносять муцини, гліколіпіди, протеоглікани, глікофінголіпіди й глікофосфоліпіди (табл. 1). Аглікан визначає ініціюючий крок до утворення ГК і в подальшому може спричинити побудову все нових і нових компонентів глікану.

Останні відкриття свідчать про те, що один і той самий глікан (наприклад, білок) може утримувати багато типів олігосахаридних ланцюгів, які прикріплені до нього за допомогою зв'язків різного виду. Так, деякі глікопротеїди мають функціонально-важливі молекули гліколіпідів. Багато протеогліканів мають як N-, так і O-зв'язані вуглеводні ланцюги.

Такі комбінації зустрічаються з багатьма фізіологічно-важливими молекулами і в деяких випадках глікани самі визначають функцію ГК [5].

Олігосахаридні ланцюги тваринного походження мають обмежений набір моноцукрів [5–7]. Найчастіше у вуглеводній частині зустрічаються такі цукри: глюкоза (Gln), маноза (Man), галактоза (Gal), фукоза, ксилоза, N-ацетилглюкозамін (N-GlcNAc), N-ацетилгалактозамін (N-GalNAc), сіалова кислота, глюкуронова кислота, ідурунова кислота. Усі моноцукри мають D-конфігурацію окрім ідурунової кислоти й фукози, які мають L-конфігурацію. В олігосахаридних ланцюгах моноцукри зв'язані між собою ковалентними зв'язками. Вони виникають при реакції взаємодії гідроксильної групи при C₁ одного моноцукру з будь-якою гідроксильною групою другого моноцукру крім тієї, що міститься при C₁ і супроводжується виділенням молекули води. У позиції C₂ утворюється зв'язок із сіаловою кислотою. Сіалова кислота фактично складається з 9 вуглеводних кислих цукрів і має ще одну назву – N-ацетилнейрамінова кислота (N-neuNAc). Конфігурація при C₁ може варіювати, що приводить до утворення α- або β- глікозидних зв'язків. Наприклад, запис Galβ1-4GlcNAc свідчить, що β-зв'язаний галактозний залишок приєднується через свою першу позицію до четвертої позиції залишку N-ацетилглюкозаміну, утворюючи зв'язок. Тому перша цифра для кожного моноцукру є незмінною. Вуглеводна частина може становити від 1 % до понад 80 % загальної ваги глікопротеїну (ГП). Розміри вуглеводного ланцюга коливаються від дицукриду до дуже складних структур, які містять 18 моноцукрів і більше [7].

Таблиця 1. Терміни, прийняті для глікокон'югатів з урахуванням типу зв'язку цукрових ланцюгів із макромолекулами

Історичні терміни	Загальноприйняті терміни	Визначений тип зв'язку цукрових ланцюгів із макромолекулами
Глікопротеїни	N- або O-зв'язані глікопротеїни	Окремі, розкидані N-GlcNAc і/або O-GalNAc-зв'язані ланцюги цукрів
Муцини	Муциноподібні глікопротеїни	Багатокластерні O-GalNAc-зв'язані ланцюги цукрів
Мукополісахариди	Протеоглікани	O-ксилозо-зв'язані глікозаміногліканові ланцюги на білковій основі. Можуть мати у наявності N-GlcNAc і/або O-GalNAc-зв'язані ланцюги цукрів
Муколіпіди, гліколіпіди	Глікофінголіпід	Глюкоза або галактоза, приєднані до кераміду
Не виявлені раніше	Глікофосфоліпід, прикріплений до білка	Етаноламінофосфат, приєднаний до білка амідним зв'язком, і глікан, сполучений з фосфотиділінозитолом

У білковій молекулі була виявлена послідовність, до якої переноситься попередник глікану, з утворенням N-GlcNAc зв'язку. Ця послідовність являє собою триплет Asn-X-Ser(Thr) (Asn-аспарагін; Ser-серін; Thr-треонін), де X- може бути будь-якою амінокислотою, крім Pro (Пролін) [5, 7]. Цей простий триплет з блокованими аміно та карбоксі-кінцевими групами може сам виступати як акцептор. Однак, не всі сайти природних білків використовуються. Очевидно структура білка, швидкість його синтезу впливають на потенційні сайти глікозилювання [8].

Група вчених [10] вивчала зв'язок конформації та функції N-глікану з пептидом білка CD₆₂ людини. Було підтверджено, що глікан прикріплюється в положенні Asp-65 у домені указанного білка й відповідає за прояв адгезивних властивостей останнього. Вважається, що всі молекули ГП мають однаковий поліпептидний кістяк, лише вуглеводна частина доволі варіабельна.

Тепер ідентифіковано декілька тисяч ГП [8, 11]. Вони поширені в усіх видах живих організмів, але особливо їх багато у тваринних клітинах. До них належать ферменти,

антитіла, транспортні білки, гормони, білки-рецептори тощо. Слід зауважити, що в плазмі крові виявлено цілий ряд ГП, функцію яких до цього часу не з'ясовано. В огляді літератури Й. Швік та співавтор. [12] розглядаються ГП плазми крові, які виділені, очищені, у деяких із них описано амінокислотну послідовність, визначено вуглеводний склад, вивчається їхня біологічна роль і механізми тих порушень, які виникають при патологічному стані. Йдеться про галактоглікопротеїн, α_1 -антихімтрипсин, 9,5, S α_1 -ГП (амілоїдний Р компонент сироватки), α_1 -мікроглобулін, α_1 -тіол-протеїназний інгібітор, Zn α_2 -ГП, α_2 -H S-ГП і багато інших ГП.

Характеристика N-гліканів. Для вивчення структури і функції ГП використовуються різні біохімічні та фізичні методи. Як правило, за допомогою протеолізу (трипсину або пронази) можна одержати глікопептиди, які потім піддаються дії глікозидаз (ендо- β -N-ацетилглюкозамінідази, нейрамінідази, пептид-N-глікозидази) з метою виділення окремих олігосахаридних ланцюгів [16]. Важливим напрямком у вивченні структури ГП є застосуванням лектинів [11, 13, 14]. Дослідження, проведені протягом багатьох років із використанням лектинів, свідчать, що всі клітини покриті цукрами, і це покриття зазнає видозмін, які відповідають фізіологічним і патологічним станам клітини [14]. Одночасно було виявлено [9], що в більшості клітин поверхня вкрита лектинами, які здатні розпізнавати молекули. Цей факт використовують для діагностики і в терапевтичних цілях.

Овальбумін – це головний глікопротеїд білка курячого яйця. Його вдається виділити в чистому кристалічному вигляді. Методом гель-фільтрації з гідролізату, одержаного після протеолізу овальбуміну проназою, було виділено шість глікопептидних фракцій [15]. усі ці фракції містять лише одну й ту саму амінокислоту – аспарагін. Дуже подібний і їхній моносакхаридний склад: завжди виявляється маноза та N-ацетилглюкозамін як основні фракції (фракції I і II) або єдиних компонентів (фракції III, IV, V, VI). Повну структуру кожного з основних глікопротеїнів овальбуміну було виявлено сполученням фізичних, хімічних та ферментативних методів [6].

Установлено, що всі глікопептиди мають загальну ділянку ("ядро", корова зона), зв'язану з аспарагіном. Глікопептиди IV, V, VI утворюють групу подібних збагачених манозою структур, які містять від 4 до 7 залишків манози і зв'язану з аспарагіном хітобіозу. У кожному випадку до гідроксильних груп при C₃ і C₅ залишках манози приєднаного β -глікозидним зв'язком до хітобіози у свою чергу приєднується 2 манозних залишки α -глікозидним зв'язком. Подальше подовження вуглеводного ланцюга відбувається шляхом приєднання інших залишків манози до цих α -манозних ланок [6].

Усі 5 класів імуноглобулінів людини, як і всі інші імуноглобуліни, містять вуглеводи [6]. Хоча кількість і склад вуглеводів може бути різним у різних класах, молекули всіх цих білків містять N-глікани, які розташовані в константній області важких ланцюгів.

У молекулі імуноглобуліну M мієломи людини, біла кожного залишку аспарагіну є вуглеводні ланцюги двох основних типів: 1) ланцюги, які містять тільки манозу та N-ацетилглюкозамін; 2) ланцюги, які, крім того, містять сіалову кислоту, галактозу і фукозу. Структуру ланцюгів типу 2 до кінця ще не вивчено. Послідовності олігоманозидних ланцюгів будуються шляхом додавання залишків α -манози до трисахариду корової зони man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc. Структури, подібні до глікопе-

птідів III, IV овальбуміну було знайдено серед вуглеводних ланцюгів імуноглобулінів. Крім того, в імуноглобуліні M знайшли структури з більш високим вмістом α -манозних ланок, ніж у глікопротеїнів овальбуміну [6].

Єдиний поліпептидний ланцюг орзомукоїду містить 5 глікозильованих залишків аспарагіну. Було з'ясовано, що в орзомукоїді відсутні олігоманозидні ланцюги, і вуглеводні компоненти відносяться до "складного" типу, який містить багато ланок neuNAc-Gal-GlcNAc, які приєднані до загальної центральної зони, що складається з 2 залишків α -манози, одного залишка β -манози і одного залишка хітобіози [5].

Іншою характерною особливістю N-гліканів орзомукоїду виявилась присутність фукози, що приєднана α 1-3-зв'язком до певного залишку N-ацетилглюкозаміну.

Як уже зазначалося, лектини – це високо специфічні білки, здатні швидко, вибірково та оборотно з'єднуватися з вуглеводами. Вони розрізняють моно-, дицукри, олігосахариди, глікопептиди, а також розгалужені глікани бі- та поліантенного типу. Є лектини направленої дії, для зв'язування фукозильованих поліантен глікопептидів гемаглютинінів вірусу грипу, α -фетопроїну, а також орзомукоїду крові при різних захворюваннях людини. Як підкреслює В.М. Лахтін [11], використання лектинів у поєднанні з іншими вуглеводзв'язувальними білками (антитілами) і ферментами (глікозидазами, глікозиламидазами, глікозил-трансферазами) підвищує ефективність застосування лектинів під час аналізу структури гліканів.

З наведеного можна зробити такі висновки про будову гліканів: 1) складання N-гліканів здійснюється в результаті узгодженої дії багатьох глікозилтрансфераз, кожна з яких має дуже вузьку субстратну специфічність; 2) активність цих ферментів відбувається залежно від того, яка ділянка поліпептидного ланцюга піддається глікозильованню.

Будова O-гліканів. До муцинів відносять слину, секрет бронхів і кишечника, сім'яної рідини, виділення шийки матки та ін. На початку 1960-х років було вивчено будову найпростішої речовини, знайденої в залозах барана. У цьому глікопротеїні дисахарид, який складається із залишків N-ацетилнейрамінової кислоти і N-ацетилгалактозаміну, приєднаний до багатьох залишків серину й треоніну поліпептидного ланцюга. Третя найпоширеніша амінокислота в глікопротеїнах секрету підчепленої залози – пролін [5]. Ці збагачені проліном структури за допомогою дисульфідних містків між білковими глобулами і створюють великі молекули глікопротеїну з особливими в'язкими властивостями [7]. Відомо, що властивості антигенів груп крові залежать від будови вуглеводів. Вуглевод, який секретується особами 01 генотипу (за системою ABO/H), називається H-антигеном. Як обов'язковий компонент він має залишок глюкози, приєднаний до C₂ залишку галактози. Останній зв'язаний з C₃ або C₄ сусіднього ацетилглюкозаміну [6]. Іноді залишку фукози може й не бути, що зумовлює, у свою чергу, відсутність антигенів A, B або H на поверхні еритроцитів або в глікопротеїнів, які секретуються. У результаті приєднання залишків N-ацетилгалактозаміну або галактози α 1-3-глікозидним зв'язком, H-детермінанта може бути перетворена або в A-, або в B-детермінанти відповідно.

Вважають, що більшість вуглеводних ланцюгів з антигенними властивостями взагалі відсутні в глікопротеїнах і є лише в гліколіпідах [17]. У них знайдено лише ланцюги типу Gal β 1-4GlcNAc.

Мембранні глікопротеїни. Глікопротеїни є важливими складовими частинами всіх клітинних мембран. Особливо зручними об'єктами дослідження виявились еритроцити людини, оскільки вони мають лише одну мембрану. У мембрані еритроцитів людини розрізняють 3 групи головних білків, які багаті на вуглеводи. Це глікофори A, B, C.

Глікофорин A – головний глікопротеїновий компонент мембрани еритроцитів. Він складається з одного поліпептидного ланцюга, в який входить 131 амінокислотний залишок і має молекулярну масу 29000. N-кінцева частина поліпептидного ланцюга глікофорину A, яка локалізована ззовні мембрани, насичена вуглеводними ланцюгами двох основних типів. Тут розміщено 15 O-гліканів, які являють собою ди-, три- або тетрасахариди, які зв'язані через залишок N-ацетилгалактозаміну із серином або треоніном. Більш складні вуглеводні ланцюги приєднані до єдиного залишку аспарагіну пептидного ланцюга глікофорину. Вони мають ряд загальних рис з N-гліканами розчинних глікопротеїнів [6]. Так, залишок β -манози корової зони приєднаний до хітобіози, а до залишку β -манози приєднані 2 залишки α -манози, до яких у свою чергу прикріплюються N-ацетилгалактозамінові послідовності. Кінцевими залишками останніх є сіалова кислота й фукоза. До центрального залишку β -манози β 1-3-зв'язком приєднаний також залишок N-ацетилглюкозаміну, як і у випадку гібридних ланцюгів глікопептидів овальбуміну.

Первинна структура глікофоринів B і C подібна до такої глікофорину A, хоч їхні ланцюги й коротші. Складні олігосахаридні ланцюги в них відсутні.

Функції вуглеводної частини глікопротеїнів.

Функції вуглеводної частини глікопротеїну різні, але всі вони зводяться до ролі позначки, яка забезпечує розпізнання даного глікопротеїну іншими молекулами чи клітинами, специфічно з нею взаємодіючими.

Вуглеводна частина глікопротеїнів плазматичної мембрани завжди міститься на зовнішній частині мембрани, контактуючи з міжклітинною речовиною. Вуглеводи плазматичної мембрани виконують роль специфічних лігандів для білків. Вони утворюють ділянки пізнання, до яких приєднуються певні білки, а приєднаний білок може змінити функціональний стан клітини.

На зовнішній мембрані еритроцитів деякі полісахариди містять N-ацетилнейрамінову кислоту на кінцях ланцюгів. Якщо еритроцити виділити з крові, обробити нейрамідазою, яка відщеплює N-ацетилнейрамінову кислоту від мембранних вуглеводів, і знову ввести в кров тій самій тварині, то виявляється, що час життя таких еритроцитів зменшується в кілька разів: вони затримуються в селезінці й руйнуються. Як виявилось, у клітинах селезінки є рецептор, який упізнає вуглевод, що втратив кінцеві залишки нейрамінової кислоти. Можливо, такий механізм забезпечує відбір селезінкою постарілих еритроцитів та руйнування їх [7].

Відомо, що в суспензії клітин, виділених з біологічної тканини, через деякий час утворюються агрегати клітин одного типу, наприклад, у суспензії клітин, одержаних з гастроподібної, яка утворює три види агрегатів: кожний з них містить клітини, які належать одному і тому ж зародковому листку – ектодермі, мезодермі або ендодермі. Розпізнавання між клітинами забезпечується зокрема взаємодією мембранних вуглеводів з білками рецепторами іншої клітини [18].

Ці механізми розпізнавання можуть брати участь у процесах, як гістогенез і морфогенез. Полісахариди клітинної мембрани поряд з білками виконують роль антигенів при розвитку клітинного імунітету, у тому числі при реакції відторгнення трансплантату [19]. Вони також служать місцями розпізнавання при ураженні патогенними вірусами й мікроорганізмами. Так, вірус грипу при проникненні в клітину спочатку приєднується до її мембрани, взаємодіючи з полісахаридом певної структури.

Вуглевод глікопротеїну може захищати білкову частину від дії протеолітичних ферментів. Наприклад, внутрішній фактор Касля, що забезпечує перенесення вітаміну B у клітини кишечника, являє собою глікопротеїн, достатньо стійкий до дії травних протеїназ. Якщо цей білок обробити глікозидазами, що руйнують вуглеводну частину, він стає легко доступним для протеїназ і швидко перетравлюється [20].

Білок плазми крові церулоплазмін – теж глікопротеїн. Його вуглеводна частина містить на кінцях ланцюгів сіалову кислоту: NeuNAc-Gal-GlcNAc. Швидкість відновлення цього білка в крові досить висока: час напівжиття вимірюється кількома годинами. Якщо ж видалити кінцеві залишки сіалової кислоти, час напівжиття білка зменшується до кількох хвилин: такий церулоплазмін уловлюється рецепторами гепатоцитів, комплементарними до дисахаридних залишків Gal-GlcNAc [18]. Приєднання церулоплазміну до рецепторів запускає механізм ендоцитозу, ендоцитозний міхурець потім залишається з лізосомами, а церулоплазмін руйнується лізосомними ферментами. Якщо в церулоплазміну видалити ще й залишок галактози, то взаємодія з рецептором стає неможливою, і час напівжиття білка знову збільшується [18].

Відомі десятки білків, що добуваються печінкою із крові за тим самим механізмом, що й церулоплазмін. Крім рецепторів, що впізнають вуглевод з галактозним кінцевим залишком, є рецептори, які ловлять глікопротеїни з кінцевою фукозою, фосфоманозою, манозою, N-ацетилглюкозаміном [18]. Аналогічні рецептори є не тільки в плазматичній мембрані гепатоцитів, але й у клітинах Купфера, у фібробластах, у деяких клітинах нирок та ін.

Отже, багато які внутрішньоклітинні глікопротеїни локалізовані й функціонують не в тому місці, де вони секретуються: кінцеве місце вони знаходять за допомогою своєї вуглеводної частини й відповідних рецепторів відсіку клітини.

У плазмі крові міститься багато різних глікопротеїнів. Молекули глікопротеїнів, що втратили N-ацетилнейрамінову кислоту (асі-алоглікопротеїни), в більшості ловляться печінкою і руйнуються в ній. При деяких хворобах печінки ця її функція порушується і концентрація асіалоглікопротеїнів в крові збільшується: в 1 мл плазми крові здорової людини міститься від 1 до 5 мкг асіалоглікопротеїнів, а при гепатиті, цирозі, пухлинах печінки – у 2–3 рази більше. За концентрацією асіалоглікопротеїнів у крові часто можна оцінити й ступінь ураження печінки. Так, при пухлинах останньої спостерігається пряма кореляція між розмірами пухлини й асіалотрансферином (сіалотрансферин) [19]. Зміна концентрації асіалоглікопротеїнів у крові використовується для діагностики захворювань печінки й для контролю ефективності лікування.

Процес глікозилування і його локалізація в клітині. Біосинтез глікопротеїнів – високо впорядкований внутрішньоклітинний процес. Процес біосинтезу, модифікації та сортування глікопротеїнів проходить у компартментах апарату Гольджі.

Апарат Гольджі складається з трьох компартментів. Кожен з них містить свій набір ферментів. На одному кінці містяться цистерни, спеціалізовані для приймання новоутворених глікопротеїнів. Цей її кінець називається цис-бік. Глікопротеїни, що надходять до цис-боку, синтезуються на рибосомах зовнішньої поверхні ендоплазматичного ретикулума. Новоутворені білки змикаються у везикули, що утворюються з ділянок мембрани ендоплазматичного ретикулума. Коли така везикула досягає цис-боку, її мембрана зливається з мембраною цистерни, а вміст вливається до її середини. Таким чином, на цис-боці з'являється вихідна точка переміщення глікопротеїнів до протилежного транс-кінця стопки.

Процесинг білків відбувається в ендоплазматичному ретикулумі, де до всіх новоутворених білків приєднуються однакові олігосахаридні ланцюги [21]. Кожен такий ланцюг складається з 14 молекул простих цукрів: 2 молекул N-ацетилглюкозаміна (GlcNAc), 9 молекул манози та 3 молекул глюкози [5, 21, 22]. Ще коли глікопротеїн міститься в ендоплазматичному ретикулумі від нього швидко відщеплюються всі 3 залишки глюкози та 1 залишок манози. Після цього глікопротеїни переносяться в складі везикул до апарату Гольджі.

У середині компартментів процесинг різних білків проходить цілком різним способом. Так, білки, призначені для лізосом, розпізнаються і до олігосахаридного ланцюга приєднується фосфатна група, у подальшому істотних модифікацій з ними не відбувається [21, 22]. Асекреторні білки й білки плазматичної мембрани підлягають значно глибшій модифікації, у ході якої вони втрачають майже всі залишки манози. Видалення манози проходить у 2 етапи. На першому етапі фермент манозидаза I видаляє 3 манозних залишки, і негайно за цим фермент GlcNAc-трансфераза I приєднує одну молекулу N-ацетилглюкозаміну до одної з молекул манози. На другому етапі манозидаза II відщеплює ще 2 залишки манози, після чого GlcNAc-трансфераза II приєднує другу молекулу N-ацетилглюкозаміну. Після видалення манози й приєднання N-ацетилглюкозаміну інші ферменти приєднують до олігосахаридного ланцюга галактозу й сіалову кислоту [5].

Участь глікопротеїнів в адгезії клітин. Адгезія клітин грає важливу роль у формуванні тканини та органів у процесі ембріогенезу. Диференціювання тотипотентних клітин, формування спеціалізованих органів залежить від специфічного міжклітинного розпізнавання і вибіркової адгезії клітин. Глікопротеїнам приписується важлива роль у багатьох взаємодіях клітин, які зумовлюють нормальний розвиток [9].

Адгезія клітин викликана реакцією між комплементарними молекулами. Така взаємодія може бути двох видів: 1) між вуглеводними ланцюгами; 2) між вуглеводним компонентом і вуглеводзв'язувальним білком, тобто лектином.

Надається перевага другій можливості, оскільки прямих взаємодій між гліканами не виявлено.

У процесах адгезії можуть брати участь фактори адгезії. Такі фактори були виділені з багатьох організмів, зокрема з губок. Було показано, що губки дисоціюють на окремі клітини, якщо їх помістити у прісну воду, і знову агрегують при перенесенні в морську.

Методом центрифугування було виділено фактори адгезії губок. Це глікопротеїни з високою молекулярною масою з незвичайним складом. Крім галактози, манози та N-ацетилгексозаміну вони містять сірчану й уронову кислоти.

З інкубаційних середовищ культивованих клітин вищих організмів, наприклад з первинних культур клітин сітчатки курячого ембріона, також було виділено фактори адгезії [23]. Цей фактор викликає адгезію клітин сітчатки, але не впливає на клітини інших тканин.

Вуглеводзв'язувальними молекулами при адгезії є лектини. Уперше їх було виділено у слизовиків. Лектини слизовиків – олігомерні білки з субдиніями, молекулярна маса яких приблизно 25000 [23].

З різних тканин ссавців і птахів виділено лектини другого класу. Молекулярна маса їх менше 13000 [23]. Лектини не є інтегральними компонентами клітинних мембран. Це такі фактори агрегації, які діють поза клітиною, викликаючи злипання клітин шляхом реакції з відповідними інтегральними глікопротеїнами мембран. Усі клітини, за винятком вільно циркулюючих (еритроцити, периферичні лімфоцити), занурені в шар речовини, який називають глікокаліксом, або позаклітинним матриксом, його головний компонент – колаген з варіюваною кількістю протеогліканів і різних глікопротеїнів. Глікопротеїновий компонент відіграє важливу роль як посередник при адгезії клітин і міжклітинного матриксу, зокрема колагену, і тим самим бере участь у регуляції клітинного метаболізму і росту [23].

Адгезія клітин до колагенового субстрату або поверхні пластику включає в себе три етапи: 1) зв'язування глікопротеїнового фактора з поверхнею пластика або колагену; 2) прикріплення клітин до фактора, приєднаного до поверхні; 3) множення взаємодій між поверхнею клітин і глікопротеїновими молекулами та реорганізація внутрішньоклітинного скелету, зокрема мікрофеламентів, з розпластанням клітинної цитоплазми по субстрату. Фібронектин виявлено першим [23]. Він володіє спорідненістю до фібриногену та фібрину. Фібронектин присутній у базальній пластині, у стромі лімфатичної тканини й навкруги гладеньких м'язових клітин і поперечносмугастих м'язових волокон. Молекула фібронектину являє собою димер, який складається з двох подібних за розміром і будовою субдиніць, зв'язаних дисульфідними містками. Це глікопротеїн, що містить 4 N-глікани. Вуглеводний компонент, можливо, лише побічно впливає на біологічну активність [7]. Зв'язок між фібронектином і колагеном досить слабкий і стабілізується великою кількістю взаємодій між кожною клітиною і субстратом.

Існує припущення, що компоненти плазматичної мембрани беруть участь у реакції приєднання до поверхні, покритої фібронектином, і ця інформація передається ззовні в цитоплазму клітини, викликаючи реорганізацію мікрофіламентів [20].

Ламінін – глікопротеїн, який прискорює прикріплення клітин, і є партнером фібронектину за дією на клітини епітеліального походження. Це мультимерний глікопротеїн з молекулярною масою 800000, побудований із субдиніць 200000 і 400000. Ламінін утворюється лише клітинами епітеліального походження [20].

Хондронектин. Високоспеціалізовані клітини – хондроцити – також потребують особливого глікопротеїнового фактора для адгезії до колагену [20]. Молекулярна маса хондронектину 180000. Він присутній у сироватці.

Хондронектин специфічно зв'язується з колагеном, який міститься у хрящах.

Зміни в глікозилюванні при різних захворюваннях. Г. Ота й співавт. продемонстрували обернено-змінні порушення в глікозилюванні муцинів шлунка людини [24]. Захисні властивості муцинів стінок шлунка залежать, головним чином, від олігосахаридного шару муцинів, тому автори, використовуючи інфікування *Helicobacter pylori*, впливали на ступінь глікозилювання муцинів у досліді й таким чином отримували оборотні зміни. Як свідчать результати спостережень за окремими ділянками шлунка, які брали за допомогою біопсії й вивчали їхню імунореактивність. Показано, що найбільшу імунореактивність мають здорові пацієнти і значно меншу спостерігали в пацієнтів, інфікованих *Helicobacter pylori*. Було зроблено висновки, що незмінне глікозилювання муцинів забезпечує захисні функції шлунка у людини [30].

Глибокі зміни у глікозилюванні відбуваються не тільки при онкозахворюваннях [4, 17], але й за інших патологій, таких як діабет [26–29], артрит [25], вуглевод-дефіцитний синдром [10] тощо.

Одержано дані [31], які підтвердили факт порушення глікозилювання. Автори [31] отримали нестандартний фукозилюваний гаптоглобулін. Його молекули не були знайдені в крові здорових індивідуумів і людей із запальними хворобами. Тому було зроблено припущення, що фукозо-гаптоглобулін постачає печінка. Можливо, при онкозахворюванні виділяється невідомий (?) розчинний фактор чи фермент, який сприяє приєднанню фукози до гаптоглобуліну печінки. Нові дані [32], підтвердили наявність таких факторів, а саме інтерлейкіну b, який впливає на глікозилювання білків печінки в гострій фазі захворювання.

Присутність на антені фукози надає помітних конформаційних змін в олігосахаридній структурі, оскільки це основний залишок, який попереджає згортання олігосахариду.

Таким чином, ці "тонкі" зміни в структурі олігосахариду можуть впливати на сіалірування і/або конформацію олігосахаридів і тим самим порушувати функції останніх. Відомо, що фукоза найчастіше займає кінцеві позиції на бокових олігосахаридних ланцюгах макромолекул [11]. Відсутність фукози в нативній структурі ГП крові змінює доступність білкової частини для пептидгідролаз, що разом із змінами стереохімічної структури вуглеводів приводить до порушення функціонування імунної, гормональної, та інших систем [33].

Останні літературні дані свідчать про те, що практично всім запальним процесам, які спонукають розвиток різних захворювань, передують зміни у вуглеводному складі й будові ГП, що приводить до порушення глікозилювання.

Висновки. Вивчення процесів глікозилювання та з'ясування причин їхніх змін є дуже цікавими для розкриття механізмів виникнення різних патологічних станів людини і тварини і відповідно, для їхньої діагностики та лікування. Про важливість вивчення складу і стереохімічної конфігурації вуглеводної частини життєво важливих глікокон'югатів свідчить поява нового терміна "глікобіологія", який включає в себе вивчення структури, біосинтезу, поширення, регуляції та функції повного спектру сахаридних ланцюгів глікокон'югатів.

На основі численних літературних даних можна стверджувати, що різним патологічним станам людини і тварин передують зміни вуглеводної частини глікокон'югатів, які приводять до порушення процесів глікозилювання і як результат – до модифікації міжклітинного розпізнавання, зміни імунної відповіді, асоціації та агрегації окремих клітин, виникненню новоутворень (до порушення морфогенетичних систем у цілому).

Надзвичайно важливу роль в процесах глікозилювання відіграють ферменти, головним чином, глікозилтрансферази. Зміни складу і вуглеводної частини ГП найчастіше визначаються зростанням експресії цих ферментів. Остання може бути викликана аномальною експресією геному. Одним із проявів експресії глікозилтрансферазних ферментів є зміна їхньої активності. Тому вони можуть служити специфічним діагностичним маркером цілого ряду важких захворювань, у тому числі злоякісних новоутворень.

1. Dennis J.W., Granovsky M., Warren C.E. // Biochim. biophys. acta. – 1999. – Vol. 1473, № 1. – P. 21–34. 2. Tsuboi S., Fukuda M. // Bioassays. – 2002. – Vol. 23, № 1. – P. 46–53. 3. Buchell J.M., Mungul A., Taylor-Papadimitriou J. // J. Mammary gland biol. neoplasia. – 2001. – Vol. 6, № 3. – P. 355–364. 4. Guo J.M., Zhang X.Y., Chen H.L. et al. // J. cancer res. clin. oncol. – 2001. – Vol. 127, № 8. – P. 512–519. 5. Varki A., Freeze H. // Subcellular biochemistry. Membrane Biogenesis / Ed. A.H. Maddy, J.R. Harris. – N.Y., 1994. – P. 71–100. 6. Анасашвили А.Ц. Гликопротеїни сыворотки крови и мочи. – М., 1968. 7. Свистунова О.И., Тутов В.Н. // Клинич. лаб. диагн. – 1992. – № 11–12. – С. 22–30. 8. Шарон Н. Гликопротеїни // Перспективы биохимических исследований. – М., 1987. – С. 180–188. 9. Шарон Н., Лус Х. // В мире науки. – 1993. – № 2–3. – С. 104–112. 10. Forens-Sieczkowska M., Midro N. // Glycoconj. J. – 1999. – Vol. 16. – P. 573–577. 11. Лакмин В.М. // Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 2. – С. 187–217. 12. Schwick H.G., Haught H. // Cell surface carbohydrates and cell development / Eds. Fukuda M. – Boca Raton (Florida), 1992. – P. 127–159. 13. Якшибаева Ю.Р., Виницкий В.Б. // Эксперим. онкол. – 1999. – Т. 21, № 2. – С. 207–215. 14. Gabius H.J., Gabius S. Lectins and Cancer. – Berlin, 1991. – P. 1–12. 15. Бугакова Г.Н., Баэряков Д.В. // Лабор. дело. – 1976. – № 4. – С. 210–221. 16. Rohrer J.S., Cooper G.A., Townsend R.R. // Anal. biochem. – 1993. – Vol. 212, № 1. – P. 7–16. 17. Hakomori S.J. // National Cancer Institute. – 1983. – Vol. 71. – P. 231–251. 18. Ashwell C., Harpord J. // Biochem. – 1982. – Vol. 51, № 2. – P. 531–554. 19. Biou D., Chanton P. // Clin. chim. acta. – 1989. – Vol. 186. – P. 59–66. 20. Carlsson S.R., Roth J., Piller F. // J. biol. chem. – 1988. – Vol. 263, № 11. – P. 18911–18919. 21. Barriocanal J.G., Bonifacio J.S. // J. biol. chem. – 1988. – Vol. 263, № 1. – P. 167–205. 22. Fukuda M. Subcellular biochemistry. Vol. 22. Membrane Biogenesis / Ed. A.H. Maddy, J.R. Harris. – New York, 1994. 23. Benchimol S., Fuks A. // Cell. – 1980. – Vol. 57, № 2. – P. 321–334. 24. Ota H., Nakayama J. // Virchows Arch. – 1998. – Vol. 433, № 2. – P. 419–426. 25. Saso L., Valentini G. // Biochem. mol. biol. int. – 1998. – Vol. 46, № 4. – P. 867–875. 26. Chibber R., Ben-Mahmud B.M., Coppini D. // Diabetes. – 2000. – Vol. 49, № 8. – P. 1724–1730. 27. Ward J.D. // Diabetes care. – 1999. – Vol. 22, Suppl 2. – P. B84–88. 28. Shantara M. // Clin. exp. hypertens. – 1999. – Vol. 21, № 1. – P. 69–77. 29. Shimoike T., Inoguchi T., Umeda F. // Metabolism. – 2000. – Vol. 49, № 7. – P. 1030–1035. 30. Baldus S.E., Zirbes T.K., Monic S.P. // Tumour Biol. – 1998. – Vol. 19, № 3. – P. 445–453. 31. Kuhajada F.P., Katumuluwa A.I., Pasternack G.R. // Proc. natl. acad. sci. USA. – 1989. – Vol. 86, № 4. – P. 1188–1193. 32. Thompson S., Cantwell B.M.J., Cornell C. // Br. J. cancer. – 1991. – Vol. 64, № 3. – P. 386–390. 33. Галич И.П., Ештушенко Н.В. // Онкология. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 4–9.

Надійшла до редколегії 07.09.04

УДК 612.014.482:575.191

Е.А. Дьоміна, д-р біол. наук, Н.М. Рябченко, пр. інж.,
А.Г. Кудрявцева, асп., В.М. Войціцький, д-р біол. наук

ОЦІНКА І ПРОГНОЗУВАННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ РАДІАЦІЙНОЇ ЧУТЛИВОСТІ НА ОСНОВІ ТЕСТ-СИСТЕМИ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

Досліджено індивідуальну радіаційну чутливість умовно здорових киян за допомогою G₂-assay. Уперше було встановлено, що індивідуальні відмінності радіочутливості формуються за рахунок обміну хроматидного типу й виявляються незалежно від дози γ-опромінення. Використання модифікованого G₂ тесту об'єктивізує формування груп підвищеного променевого та канцерогенного ризику.

Individual radiosensitivity of the clinically normal inhabitants of Kyiv was investigated with the help of G₂-assay. For the first time it was established that variations in individual radiosensitivity are formed due to the exchanges of chromatide type and are displayed independently of the dose of γ-radiation. Application of the modified G₂-assay makes it possible to objectify the formation of the groups with the increased radiation and cancer risk.

Вступ. Одним з фундаментальних питань радіобіології є оцінка стабільності функціонування генетичного апарату, оскільки ураження геному складають основу пошкоджень імунної системи, розвитку канцерогенезу, зниження тривалості життя тощо. Інформацію про стан генетичного апарату соматичних клітин людини можна отримати за допомогою аналізу рівня та спектра аберацій хромосом у лімфоцитах периферичної крові, які є найчутливішим індикатором мутагенної дії та рекомендовані ВОЗ і МАГАТЕ для біоіндикації ступеня променевої дії. При оцінці радіаційно-індукованих ефектів малих доз радіації за частотою аберацій хромосом у соматичних клітинах встановлено складну нелінійну залежність "доза – ефект", що характеризується наявністю дозозалежної ділянки. При цьому слід відмітити більш високу ефективність дії на одиницю дози опромінення в області низьких доз, ніж в області великих [1].

Разом з тим показано, що аберації хромосом відіграють важливу роль в активації протоонкогенів та інактивації генів-супресорів пухлинного росту [2]. Тому підвищений рівень аберацій хромосом може оцінюватися як показник підвищеного cancer-risk, а ряд ендо- та екзогенних факторів модифікують генетичні ефекти і, таким чином, схильність до розвитку злослих новоутворень (ЗН). Така оцінка неможлива без вивчення та прогнозування індивідуальної радіочутливості людини, яку здійснюють за допомогою тестуючого опромінення в найбільш радіочутливому періоді клітинного циклу – G₂ періоді [3]. Розбіжності в показниках індивідуальної радіочутливості хромосом обстежених осіб, що спостерігаються при тестуючому опроміненні можуть бути наслідком порушень репарації ДНК.

Оскільки групою найвищого радіаційного ризику є учасники ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на ЧАЕС 1986 р. [4], актуальним і практично вагомим є дослідження ступеня нестабільності геному соматичних клітин опромінених осіб з метою формування груп підвищеного променевого та онкологічного ризиків.

Вивчення індивідуальної радіочутливості на хромосомному рівні (G₂-assay) у комплексі з іншими біомаркерами є одним з перспективних підходів до оцінки нестабільності геному умовно здорових осіб. Проте порівняно короткий термін його застосування вимагає подальшого вдосконалення, стандартизації, пошуку шляхів пояснення та подолання розбіжностей у даних, що виникають при дослідженнях у різних лабораторіях [5].

Мета роботи – оцінити ступінь дестабілізації геному в опромінених осіб і умовно здорових мешканців м. Києва в умовах променевого навантаження *in vitro*.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження виконувались за допомогою тест-системи лімфоцитів периферичної крові людини. Вивчено характер дозової залеж-

ності променевих маркерів (дицентричних хромосом) у лімфоцитах периферичної крові УЛНА із злослихими новоутвореннями (ЗН) та іншими захворюваннями. Для аналізу відмінностей променевих маркерів у УЛНА із захворюваннями різних класів обчислено коефіцієнти кореляції цитогенетичних показників з документованою дозою опромінення.

Індивідуальну радіочутливість умовно здорових донорів оцінювали за допомогою G₂-assay [6]. Опромінення в дозах 1,0 і 1,5 Гр γ-променями ⁶⁰Со (потужність дози 1,5 Гр/хв) здійснювали через 46 год після стимуляції лімфоцитів.

Культикування лімфоцитів периферичної крові проводили за стандартною методикою протягом 52 год з наступним розгорнутим цитогенетичним аналізом, що виконувався згідно з міжнародними критеріями.

Усього виконано 120 досліджень і проаналізовано 16 тисяч метафаз.

Результати та їх обговорення. Нами вперше встановлено, що в групі УЛНА із ЗН коефіцієнти кореляції променевих маркерів (дицентрики, центричні кільця – 0,59 і 0,56 відповідно) з дозою опромінення, вірогідно перевищують відповідні коефіцієнти в групах УЛНА із захворюваннями нервової системи, системи кровообігу, органів травлення. Це означає, що незважаючи на віддалені терміни обстеження і пов'язану з цим елімінацію значної частини променевих маркерів з периферичної крові, тільки в групі ліквідаторів із ЗН зберігається залежність "доза – ефект" для цих показників. В інших групах дозова залежність слабо виражена або відсутня. Ці дані свідчать про те, що низькі дози поглиненої радіації є статистично значущими факторами ризику виникнення ЗН, що може бути пов'язано з недостатньою інтенсивністю антиканцерогенного захисту організму за дії радіації в цьому діапазоні доз, який включає елімінацію абераційних клітин системою імунного нагляду за антигенною стабільністю внутрішнього середовища організму, репарацію, відновно-компенсаторні процеси тощо [7].

На рис 1, а, б наведено результати дослідження індивідуальної радіочутливості умовно здорових киян за частотою аберацій хроматидного типу, які є найхарактернішим видом ушкоджень хромосом при опроміненні в G₂ періоді. Найбільші розбіжності у виході загальної частоти хроматидних аберацій спостерігаються при опроміненні в дозі 1,5 Гр (рис. 1, б). Наприклад, частота хроматидних аберацій у пацієнтів № 2 і № 6 розрізняється більше ніж у 3 рази.

Хроматидні й ізохроматидні делеції становлять 79 % від загального числа хроматидних аберацій. Найбільші індивідуальні розбіжності в рівні цих показників відмічаються при опроміненні в дозі 1,5 Гр (рис. 1, б).

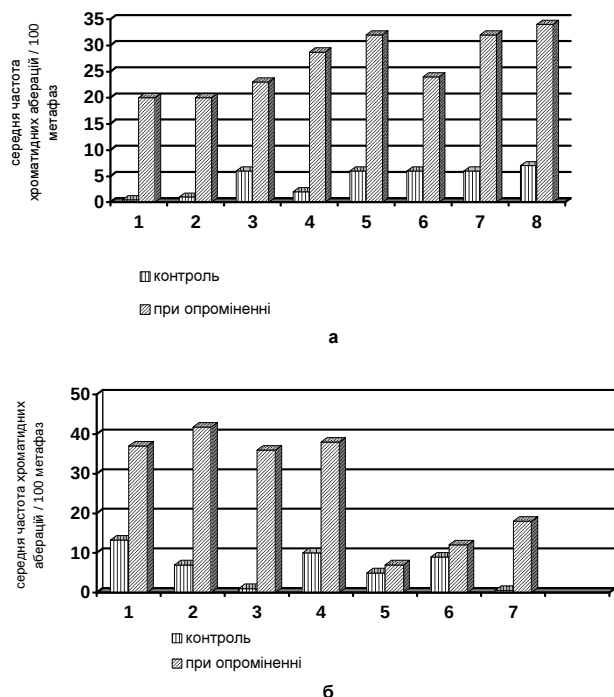


Рис. 1. Частота аберацій хроматидного типу в лімфоцитах умовно здорових донорів до і після тестуючого опромінення в дозі 1,0 Гр (а) та 1,5 Гр (б)

УДК 577.152

І.І. Паталах, канд. біол. наук

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦІЯ КЛІТИННИХ СИГНАЛІВ

Запропоновано огляд сучасних даних щодо регуляторної ролі прооксидантно-антиоксидантних реакцій у проведенні клітинних сигналів. Розглянуто механізми редокс-регуляції роботи сигнальних молекул та їх участь у перетворення фізіологічних реакцій у патологічні.

Some actual data on prooxidant-antioxidant regulation of cell signal transduction have been proposed. It is shown how redox-regulation can influence signal molecules and which are their participation in reversion of physiological reaction into pathology.

Вступ. Традиційні уявлення про систему передавання сигналів через плазматичну мембрану до ядра та формування клітинної відповіді базуються на теорії гормональної регуляції, де чільне місце належить рецепторному механізму розпізнавання зовнішнього сигналу. Поряд з тим, гіпо- чи гіпертермія, гіпоксія й гіпероксія, взаємодія з патогенами, механічні ушкодження та багато інших екзогенних чинників викликають первинні зміни фізико-хімічних властивостей мембран з наступним утворенням активних радикалів кисню та органічних радикальних продуктів. Вільні радикали можуть виконувати роль міжклітинних сигнальних молекул, якщо вивільняються в екстрацелюлярний простір (наприклад, у плазму крові як наслідок "оксидативного вибуху" фагоцитів чи в апопластну рідину рослин, де функціонують екзогенні пероксидази). Але як відбувається трансдукція подібних сигналів у клітину? Чи можна розглядати продукування вільнорадикальних інтермедіатів як розширення спектра вторинних посередників сигнальної системи клітин? Чи є необхідність у відповідних рецепторах на поверхні мембран? Для з'ясування цих питань ми намагалися проаналізувати редокс-систему на відповідність щодо певних критеріїв: 1) інформативність, тобто спроможність відобразити природу та інтенсивність сигналу; 2) наявність механізмів швидкого гальму-

Висновки. Нами вперше встановлено, що індивідуальні розбіжності радіочутливості, що формуються за рахунок аберації хроматидного типу, виявляються незалежно від дози γ -опромінення (1,0; 1,5 Гр).

Ураховуючи зв'язок між радіаційно-індукованою нестабільністю геному та схильністю до розвитку ЗН, обстежені особи з виявленою підвищеною хромосомною нестабільністю належать до групи потенційно високого канцерогенного ризику й потребують тривалого медичного та цитогенетичного моніторингу, об'єктивізація яких пов'язана з подальшим удосконаленням застосування G_2 -assay.

1. Гофман Д. Рак, вызываемый облучением в малых дозах / Под ред. Е.Б. Бурлаковой, В.Н. Лысцова. – М., 1994. – Т. 1. 2. Hagman L., Brogger A., Hansteen J., Heim S. // Radiat. res. – Vol. 54. – P. 2919–2922. 3. Darroudi F., Vyas R.C., Vermeulen S., Natarajan A.T. // Mutat. res. – 1995. – Vol. 328. – P. 83–90. 4. Бариляк И.Р., Демина Э.А. // Доп. НАН України. – 2001. – № 2. – С. 190–193. 5. Pallitti F., Pichierri P., Franchitto A. et al. // Int. J. radiat. biol. – 1999. – Vol. 75. – P. 621–627. 6. Scott D., Barber J.B.P., Spreadborough A.R. et al. // Int. J. Radiat. Biol. – 1999. – Vol. 75. – P. 1–10. 7. Djomina E.A. The role of the increase of cancer occurrence in liquidators of Chernobyl accident consequences // Eur. Congr. radiol. – Vienna, 2001.

Надійшла до редколегії 20.09.04

вання продукції сигнальних молекул після припинення дії сигналу; 3) здатність до вибіркової активації чи інактивації функціональних молекул (у першу чергу білків-ферментів і регуляторних білків).

Чи існує редокс-регуляція? Сучасні наукові публікації свідчать про "еволюційну" зміну уявлень щодо біологічної ролі прооксидантно-антиоксидантних процесів. Поступово формується розуміння, що поряд із захистом клітин і участю в розвитку патологічних станів вільнорадикальні продукти та компоненти антиоксидантної системи захисту (АОС) відіграють важливу роль у регуляції життєзабезпечення клітини й підтримки міжклітинних контактів. Автори кількох цікавих оглядів з цієї теми навіть почали впевнено використовувати термін "редокс-регуляція" [1–3].

Аналізуючи більш ніж 600 повідомлень, В. Дрог [1] підсумовує, що редокс-регуляція є необхідною умовою забезпечення деяких фізіологічних функцій і клітинних процесів, а саме:

- ♦ підтримка тонусу судин;
- ♦ контроль за функцією дихання шляхом регуляції вмісту кисню в судинах;
- ♦ релаксація смугастих м'язів;
- ♦ продукція еритропоєтину;
- ♦ підсилення імунологічних реакцій;

♦ забезпечення міжклітинних контактів та інших ефектів з участю мембранних рецепторів;

♦ проліферація та ріст клітин.

Досить активно накопичуються дані про участь продуктів вільнорадикальних процесів (ПВРП) у проведенні зовнішніх сигналів, що відображено в оглядах В. Адлер зі співавт. [4], Р. Аллен та М. Трессіні [5], Т.П. Дальтон зі співавт. [6], А. Аззі зі співавт. [7] і багатьох інших. Вільнорадикальні процеси в біологічних об'єктах ініціюють утворення як радикальних (O_2^- , $^{\bullet}OH$, $HO^{\bullet}$, $NO^{\bullet}$, $NOO^{\bullet}$), так і нерадикальних (O_2 , H_2O_2 , $ONOO^-$, $ROOH$) продуктів. Усі вони можуть взаємно перетворюватись, швидко зникаючи чи даючи новий спектр активних похідних; підсилюючи чи, навпаки, обриваючи, ланцюг вільнорадикальних перетворень. Тому часто важко було визначити біологічні ефекти окремих компонентів ПВРП. Проте саме ця їхня властивість забезпечує "естафетний" характер редокс-регуляції, а також можливість підсилення чи гальмування клітинного сигналу.

У будь-яких клітинах чи біологічних тканинах існує певний фізіологічний рівень ПВРП, який є результатом гомеостатичної рівноваги між їхньою продукцією та утилізацією. Нейтралізація активних форм кисню (АФК), азоту (АФА) та органічних радикалів забезпечується компонентами антиоксидантної системи (АОС) захисту, як ферментативними, так і неферментативними.

Формування редокс-залежного сигналу. Активування редокс-залежної сигнальної системи відбувається тоді, коли порушується прооксидантно-антиоксидантний баланс. Подібний дисбаланс виникає за рахунок надлишкової продукції вільних радикалів або пригнічення АОС. Тому цікаво проаналізувати можливі кількісні ефекти: слабкі зовнішні сигнали повинні швидко гаснути внаслідок вмикання гомеостатичних механізмів клітини; сфера впливу сигналів середньої чи високої інтенсивності може обмежуватись посттрансляційною (метаболічною) регуляцією або досягати ядра та вмикати генетичну відповідь.

Важливою умовою формування редокс-сигналу є нетривалий дисбаланс, адекватний до сили й терміну дії фактора-індуктора. Вчасно загальмувати оксидативне збурення має АОС. Ферментативні антиоксиданти дивовижно пристосовані до виконання цієї функції: СОД і каталаза – це однострукатні ферменти, які не потребують кофакторів і підкоряються співвідношенню Міхаеліса – Ментен (чим вище концентрація субстрату, тим більша активність ферменту) [8].

Глутатіон-пероксидаза – це двострукатний фермент, але його другий субстрат (відновлений глутатіон) завжди міститься в клітинах у надлишкових кількостях, до того ж клітина має механізм постійного відновлення глутатіону за рахунок глутатіон-редуктази [9].

Гіперпродукція ПВРП викликає стан насичення субстратом або навіть гальмування ферментів (як у випадку гальмування деяких ізоформ СОД гідропероксидом водню). У клітинах існує додатковий запобіжний механізм, здатний попереджати такі ситуації. Це так званий багаторівневий захист: K_m каталази й аскорбат-оксидази набагато більші за K_m СОД і ГПО, що дозволяє підключати їх як ферменти другої лінії захисту, здатні працювати з підвищеними кількостями пероксидних субстратів. Існують певні механізми третьої лінії захисту, одним з яких тепер вважають навіть протеоліз білків: перехід амінокислот із зв'язаного стану у вільний підвищує АО властивості клітин. Амінокислоти-антиоксиданти, безперечно, є

слабкими АО, але захисний потенціал цього механізму забезпечується їхньою кількістю [10].

Коли в клітині різномірні системи АО захисту функціонують неефективно, розвивається хронічний оксидативний стрес. У цих умовах редокс-регуляція стає неможливою, оскільки не спрацьовують механізми вмикання-вимикання сигналів.

Трансдукція редокс-сигналу на сигнальні молекули білкової природи. Існує багато свідчень щодо використання редокс-залежної сигнальної системи тих самих сигнальних шляхів, які запускаються ростовими факторами [11, 12]. Рецепторами-редокс-сигналами можуть слугувати НАДФН-залежні оксидази, протеїнкінази, фосфоліпази. Механізми оксидативної активації тирозинових і серин/треонінових протеїнкіназ і фосфатаз, фосфоліпаз PLA_2 та PLC, а також багатьох факторів транскрипції розглянуто в оглядовій статті Г. Камата та Г. Хірата [2]. Можливість модуляції активності регуляторних білків (зокрема білків MAP-кіназного каскаду) шляхом окиснювальної модифікації цистеїнових залишків з утворенням дисульфідів ($RSSH$), сульфенових ($RSOH$), сульфінних (RSO_2H) і сульфонових (RSO_3H) похідних обговорюється [11]. Вважають, що майже всі амінокислоти є чутливими до АФК, до того ж тирозин, триптофан, гістидин і цистеїн мають антиоксидантні властивості [13, 14]. Таким чином, білки й пептиди можуть бути об'єктами оксидативної модифікації, унаслідок якої змінюються їхні функції або структура, або запускаються механізми вибіркового протеолізу. Помічено, що мікромолярні концентрації пероксиду водню підсилюють протеоліз, тоді як мілімолярні, навпаки, його гальмують, що призводить до накопичення окиснених форм протеїнів [15]. Напевно, просторове розташування амінокислотних залишків також впливає на редокс-чутливість білків, бо показано, що амінокислоти БСА окиснюються вдвічі швидше за глутамін-синтазу [16].

Установлено, що високі (вищі за внутрішньоклітинні) концентрації H_2O_2 індукують дозозалежне підвищення фосфорилування тирозинових залишків, що входять у склад рецептора GM-CSF (гранулоцит-макрофаго-колонієстимулюючий фактор) та інших сигнальних білків на поверхні плазматичних мембран [17].

Використання антиоксиданту піролідиндітіокарбонату, здатного зменшувати рівень АФК, які генеруються під час продукції факторів росту, призводило до змін сигнальної функції GM-CSF. Ці результати підтверджують здатність АФК впливати на послідовність передачі поміжклітинних сигналів, зокрема шляхом впливу на фосфорилування тирозину.

Приклади перемикання фізіологічного розвитку вільнорадикальних процесів на патологічний. Забезпечення редокс-регуляції виконується тільки за умов жорсткого контролю процесів ініціації, генерування та розповсюдження вільнорадикальних реакцій. Будь-яке порушення механізмів контролю є дуже небезпечним і може призводити до розвитку патологій. Тому останнім часом поширюється кількість досліджень, спрямованих на з'ясування умов і способів перемикання фізіологічних шляхів окиснювального метаболізму в патологічні. Зокрема розглядають зв'язок між процесом запалення як захисною реакцією організму та канцерогенезом – однією з найскладніших патологій.

Вважають, що запалення є тригером проліферації з такою послідовністю реакцій: каскад арахідонової кислоти модифікує MIF (інгібітор міграції макрофагів), PAF

(фактор активації тромбоцитів), PDGF (ростозабезпечуючий фактор тромбоцитів), TNF (фактор некрозу пухлин), активатори плазмалогенів і про-запалювальний цитокін інтерлейкін 1, який, у свою чергу, активує PG_2 , стимулятор ангіогенезу [18]. Зокрема, ПОЛ контролює cGMP (циклічний гуанозинмонофосфат), який вмикає клітинну проліферацію, а кисневі радикали – фактор транскрипції NF- κ B, що індукує активацію прозапалювальних IL₁, IL₆ та TNF α , а також активує онкогени [19]. IL₁ стимулює колагенез і проліферацію фібробластів [20].

Пошкодження біомембран вільними радикалами викликає порушення мембранних функцій, зокрема інактивацію ензимів, клітинних рецепторів та іонних насосів (Na⁺/K⁺ і Ca-АТФаз). Саме зростання концентрації внутрішньоклітинного кальцію та натрію зумовлює клітинну проліферацію, зокрема кальцій сприяє проліферації ендотеліальних клітин [21].

Згідно з повідомленнями [20, 21] формування карцином починається паралельно з ініціюванням ангіогенезу, який запускається внаслідок припинення продукції тромбоспондіну – інгібітора ангіогенезу. В ядрах клітин працюють продукти пухлинних супресорів – генів p53 і pRB, які є факторами транскрипції, що лімітують клітинний поділ. Унаслідок ефектів пероксидації ліпідів змінюється стан мембранних білків і відбувається пригнічення білкового синтезу, оскільки в клітині накопичується окиснений глутатон (як результат пригнічення GR), збільшується кількість зшивок з участю МДА та гідроксильних радикалів. Таким чином, ПОЛ ініціює ангіогенез, руйнуючи тромбоспондин, p16 (продукт гена-супресора пухлин MTS 1 та один з наймогутніших інгібіторів клітинного ділення) [20] і викликаючи гени-супресори p53 і pRB [21]. До того ж, вільні радикали руйнують ДНК та інші клітинні структури.

Вільні радикали залучаються до онкологічного розвитку на трьох стадіях: ініціації, сприяння та злоякісного переродження [19]. Беручи участь у запаленні, ПОЛ викликає хронічне пошкодження ендотелію лімфатичних протоків і венул. Тому визначення активності вільнорадикальних процесів має важливе діагностичне значення, якщо обрані параметри прогресують у відповідності до інших клінічних симптомів.

Унаслідок порушення синтезу ейкозаноїдів підвищеним рівнем ПОЛ [19] і пошкодження сполучної тканини судин і лімфатичних протоків при утворенні зшивок ДНК з МДА та ОН, їхні транспортні властивості та пропускна здатність знижуються. Відбувається аномальна реплікація клітин або синтез мутаційно змінених білків, активація ріст-стимулюючих генів (онкогенів) з одночасною інактивацією ростостримуючих генів (генів – супресорів пухлин) [20]. Ці зміни на генному рівні призводять до ангіогенезу й росту пухлин.

Необхідно зауважити, що не завжди канцерогенез пов'язується з інтенсифікацією ПОЛ. Зокрема М. Саттлер і співавт. [12] установлено, що в тканинах епітеліальної пухлини ротової порожнини знижувався вміст фосфоліпідів і підвищувалось співвідношення холестерол : фосфоліпідів, що викликало зниження інтенсивності ПОЛ з одночасним підвищенням концентрації глутатону та активності ГПО і ГТ.

Існують імуногістохімічні й біохімічні докази участі АФК у розвитку шоківих станів, запалення та ішемічно-реперфузійних пошкоджень [22]. Показано, що АФК, ініціюючи ПОЛ, безпосередньо пригнічують роботу ферментів мітохондріального дихального ланцюга, інактивують гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу, пригнічують активність K⁺/Na⁺ АТФаз і натрієвих каналів на

мембранах за рахунок окиснювальної модифікації мембранних білків. АФК (супероксидні, пероксинітрильні, гідроксильні радикали та перекис водню) – це могутні ініціатори процесів пошкодження первинної структури ДНК, оскільки здатні активувати ядерну полі(АДФ-рибозо)синтетазу, що призводить до зниження енергетичного забезпечення клітин і загибелі клітин шляхом некрозу. Антиоксидантна терапія в цих випадках спрямована на інгібування полі(АДФ-рибозо)синтетази та попередження пошкодження органів унаслідок шоку, запалення або ішемічної реперфузії.

Намагаючись відповісти на питання, чому відбувається порушення функцій клітинних мембран у відповідь на атаку вільних радикалів, вчені схиляються до висновку, що пошкоджується в першу чергу не ліпідний матрикс, а мембранні білки (периферійні та інтегральні). Отже, ПОЛ не повинно суттєво впливати на функціональний стан мембран, тоді як зсув у співвідношенні між відновленим і окисненим станом мембранних білків може спричинити драматичні ефекти в їхній подальшій долі.

Проте Sen зі співавт. [23] не виключають участі ПОЛ у деструкції мембран еритроцитів унаслідок штучного лейшманіозу (який супроводжується зокрема анемією). Автори запропонували такий ланцюг розвитку подій на мембранах: окисдавна денатурація гемоглобіну призводить до утворення всередині еритроцитів тілець Гейнца, що преципітують на мембрані. МДА, що утворюється як кінцевий продукт ПОЛ, викликає пошкодження мембран, утворюючи зшивки з аміногрупами фосфатидилетаноламіну, білків та ін. Таким чином, одночасно відбувається дезорганізація гемоглобіну та клітинних мембран. Знижена активність СОД та каталази призводить у хворих тварин (хом'ячки) до утворення O₂⁻ та H₂O₂, які, у свою чергу, генерують більш реакційноздатні ОН-радикали. Зниження рівня відновленого глутатону та пригнічення GR і ГПО в післяінфекційний період призводить до дефіциту АО захисту. Деградація мембранних білків (як білків цитоскелету, так і інтегральних), що існує протягом усього терміну розвитку захворювання (близько трьох місяців) призводить до дестабілізації мембран та раннього лізису еритроцитів в умовах експериментального вісцерального лейшманіозу.

Висновки. Високі концентрації вільних радикалів та їхніх нерадикальних дериватів виявляють руйнівні ефекти, пошкоджуючи клітинні структури. ПВРП у низьких (фізіологічних) і середніх концентраціях відіграють важливу роль як медіатори, що залучаються до регуляції сигнальних процесів. Це забезпечує формування захисної відповіді клітини чи відновлення її гомеостазу. Наведені в запропонованому огляді факти свідчать про важливу участь редоксзалежних реакцій у формуванні ряду фізіологічних функцій і попередженні розвитку патологічних станів. Впливаючи на білкові молекули, які залучаються до передавання клітинних сигналів, прооксиданти індують або втрачають функціональної активності сигнальних білків, або її підсилення. Отже, непряме (опосередковане) втручання в систему сигнальної трансдукції шляхом експресії домінантних білків-інгібіторів – учасників каскаду сигнальної трансдукції – може бути корисним для регулювання клітинної відповіді на редокс-стрес.

Важливим регуляторним механізмом є також можливість перемикання функцій регуляторних білків залежно від інтенсивності редокс-сигналів, що забезпечується багаторівневим запуском різних ланок антиоксидантної системи захисту.

1. Dröge W. // *Physiological Reviews*. – 2002. – Vol. 82, №1. – P. 47–954.
 2. Kamata H. Hizata H. // *Cell. Signal*. – 1999. – Vol. 11, № 1. – P. 1–144.
 3. Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A. // *ann. rev. pharmacol. toxicol.* – 1999. – Vol. 39. – P. 67–101. 4. Adler V., Yin Z., Tew K.D., Ronai Z. // *Oncogene*. – 1999. – Vol. 18. – P. 6104–6111. 5. Allen R.G., Tressini M. // *Free radical. bio. med.* – 2000. – Vol. 28. – P. 463–499. 6. Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A. // *Ann. rev. pharmacol. toxicol.* – 1999. – Vol. 39. – P. 67–101. 7. Azzi A., Boscoboinik O., Mazilley D. et al. // *Am. J. clin. nutr.* – 1995. – Vol. 62. – P. 1337S–1346S. 8. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // *Успехи совр. биол.* – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 442–455. 9. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // *Успехи совр. биол.* – 1993. – Т. 113, вып. 1. – С. 107–121. 10. Stadtman E.R. // *Science*. – 1992. – Vol. 257. – P. 1220–1224. 11. Grant J.J., Loake G.J. // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 124. – P. 21–29. 12. Sattler M., Winkler T., Verma S. et al. // *Blood*. – 1999. – Vol. 93, № 9. – P. 2928–2935. 13. Davies K.J.A., Delsignore M.E., Lin S.W. // *J. biol. chem.* –

1987. – Vol. 262. – P. 9902–9907. 14. Stadtman E.R. // *Ann. rev. biochem.* – 1993. – Vol. 62. – P. 797–821. 15. Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A. // *FASEB J.* – 1997. – Vol. 11. – P. 526–534. 16. Berlett B.S., Levine R.L., Stadtman E.R. // *J. biol. chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 4177–4182. 17. Balasenthil S., Saroja M., Ramachandran C.R. // *Br. J. oral maxillofac. surg.* – 2000. – Vol. 38 (4). – P. 267–270. 18. Burdon R. // *Free radical biol. med.* – 1995. – Vol. 18. – P. 775–794. 19. Kzamer K. // *Dtsch. zsch. oncol.* – 1994. – Vol. 26, № 3. – P. 77. 20. Houtsmuller A.J. // *Bohn Stafleu van Loghum*. – 1995. – P. 12–40. 21. Oliff A., Gibbs J.B., McCormick F. // *Scientific American*. – 1996. – P. 146–147. 22. Cuzzocrea S., Riley Dennis P., Caputi Achille P., Salvemini D. // *Reperfusion Injury* – 2001. – Vol. 53, № 1. – P. 135–159. 23. Sen G., Mukhopadhyay R., Ghosal J., Biswas T. // *Ann. Hematol.* – 2001. – Vol. 80 (1). – P. 32–70.

Надійшла до редколегії 04.10.04

УДК 612.821:612 821.83

С.В. Федорчук, інж., В.І. Тараненко, провід. фізіолог,
Ю.П. Горго, д-р біол. наук

ПОКАЗНИКИ РЕАКЦІЇ НА РУХОМИЙ ОБ'ЄКТ У ОПЕРАТОРІВ ТЕПЛОВИХ ЕЛЕКТРОСТАНЦІЙ

Досліджено реакцію на рухомий об'єкт у операторів теплових електростанцій. Виявлено, що для визначення особливостей оцінки параметрів часу й простору при операторській діяльності цілком доцільно використовувати такі показники реакції на рухомий об'єкт, як критерії випередження і запізнення та їхню варіативність, коефіцієнти балансу реакцій і балансу варіативності випереджальних і запізнілих реакцій.

There were investigated reactions on the moved object of operators of power stations. It was detected, that for definition of features perception of parameters of time and space at operator activity it is quite possible to use such indexes of a response on moving plant as criteria of advancing and delay and them factors of variation, factors of balance of responses and balance of factors of variation of anticipating and lagging responses.

Вступ. Практично всі види операторської діяльності так чи інакше пов'язані з необхідністю обліку й корекції просторово-часових параметрів об'єктів керування.

Відповідно до концепції Б.Г. Ананьєва [1], процес сприйняття простору і часу є функцією полімодальною, тобто здійснюється аналізаторними системами різних модальностей, і поліфункціональною, оскільки здійснюється за участю багатьох систем організму. У ряді досліджень установлено, що процес сприйняття часу і простору є результатом спільної діяльності багатьох аналізаторів і зв'язаний з інтегральною роботою кори великих півкуль мозку [2, 3]. При цьому найважливіше значення має руховий аналізатор, аферентні імпульси якого відіграють роль зворотного зв'язку в здійсненні рухів і оцінці просторово-тимчасових відносин [4].

Одними з індикаторів індивідуальних особливостей оцінки просторових і часових характеристик руху виступають показники реакції на рухомий об'єкт (РРО). Під час виміру реакції на рухомий об'єкт маємо справу з визначенням моменту зустрічі одного рухомого об'єкта з іншим, який рухається, чи нерухомим ("ціллю", "мішенню", "візиром").

Метою дійсного дослідження було визначення показників реакції на рухомий об'єкт у операторів теплових електростанцій за найоптимальнішим для експрес-діагностики варіантом методики тестування РРО – реалізованим на комп'ютері.

Об'єкт і методи досліджень. За запропонованим варіантом методики дослідження реакції на рухомий об'єкт було протестовано 129 операторів електростанцій, які навчалися у Спеціалізованому центрі підготовки кадрів Міненерго України.

Обстежуваним пропонувалося за допомогою однієї певної кнопки клавіатури комп'ютера відзначати швидким натисканням момент перетинання двох яскравих ліній, що рухаються на екрані дисплея. Правила руху цих ліній були запропоновані такі:

- ♦ лінії виникають і рухаються з постійною швидкістю

від країв екрана до центра йдесь перетинаються, продовжуючи надалі свій рух;

- ♦ лінії завжди починають "старт" з різних боків (не обов'язково тільки протилежних);

- ♦ вибір місця "старту" ліній підкоряється закону випадкових величин;

- ♦ вибір моменту перетинання ліній також випадковий.

Режим руху ліній – прямолінійний з постійною швидкістю.

Для одноразового вивчення РРО проводилося 25 вимірів (елементарних актів РРО). Адже за даними, отриманими Н.С. Лейтесом [5], схильність до переваги тих чи інших реакцій – запізнення або випередження помітніше виступає в перших 25 реакціях. Крім того, дані, отримані при дослідженні особливостей РРО на 25 подразниках, не відрізнялися від тих, які було отримано за більшої кількості подразників [6].

Основним показником точності реакції на рухомий об'єкт ми вважали середню арифметичну величину часу відхилення реакції досліджуваного від моменту перетинання двох рухомих ліній – ТР. Цей показник не відбивав фактор "випередження-запізнення", тому що вираховувався за модулем. За одиницю відхилення використовували величину відхилення в мілісекундах. Стійкість отриманого результату, а також ступінь відпрацювання і автоматизації навичок оцінювалися за коефіцієнтом варіації точності РРО.

Для більш детальної інтерпретації результатів тестування окремо визначалися середні арифметичні величини запізнілих (ЗР) і випереджальних (ВР) реакцій – критерії запізнення та випередження, а також коефіцієнти варіації цих показників. Коефіцієнт балансу РРО (КБР) визначався як відношення середнього арифметичного запізнілих реакцій (ЗР) до середнього арифметичного випереджальних реакцій (ВР). За співвідношенням коефіцієнтів варіації показників ЗР і ВР визначався коефіцієнт балансу варіативності РРО (КВР).

Результати та їх обговорення. Результати проведених досліджень наведено у табл. 1. За середніми значеннями вимірюваних показників у протестованих операторів спостерігалася тенденція до переваги реакцій випередження. Це узгоджується з результатами деяких дослідників [5], згідно з якими більшості досліджуваних у РРО властива тенденція до випередження. Можливо, визначене співвідношення реакцій запізнювання і випередження у протестованих операторів зумовлене професійним стилем діяльності – адже краще попередити порушення в роботі енергооб'єкта, ніж запізнитися з виконанням необхідних дій, що може призвести до аварійної ситуації.

Для визначення індивідуально-типологічних особливостей реакції на рухомий об'єкт з урахуванням властивості урівноваженості основних нервових процесів у проведеному дослідженні застосовувався коефіцієнт балансу РРО (КБР). За літературними даними значення цього коефіцієнта наближається до одиниці, якщо ос-

новні нервові процеси збалансовані (урівноважені). За явної переваги процесу збудження над процесом гальмування показники ЗР і ОР відрізняються більш ніж у 2 рази. З неурівноваженістю основних нервових процесів при дослідженні РРО пов'язують крайні випадки односторонньої та стійкої переваги тієї чи іншої тенденції (запізнювання-випередження) [5]. Проте за середнім значенням коефіцієнта КБР ($0,937 \pm 0,029$) роботи висновок щодо врівноваженості чи неурівноваженості нервових процесів у обстежених операторів було б некоректно. У даному випадку необхідно аналізувати тільки індивідуальні результати тестування кожного оператора окремо або використовувати інші статистичні методи.

Варіативність випереджальних реакцій теж була де-що вища, ніж варіативність реакцій запізнювання. Але ця спрямованість РРО була не досить стійка ($\text{КБР} > 0,5$).

Таблиця 1. Значення вимірювальних показників реакції на рухомий об'єкт у операторів енергопідприємств ($n = 129$)

Показники	Середнє арифметичне $M \pm m$	Мінімальне значення показника	Максимальне значення показника	Середнє відхилення
Точність реакції на рухомий об'єкт	$0,068 \pm 0,001$	0,016	0,153	0,027
Варіативність РРО	$31,47 \pm 1,09$	0,00	165,00	21,51
Критерій запізнення	$0,102 \pm 0,004$	0,000	1,007	0,071
Критерій випередження	$0,123 \pm 0,004$	0,000	0,849	0,074
Варіативність запізнених реакцій	$23,09 \pm 1,01$	0,00	164,80	19,88
Варіативність випереджальних реакцій	$29,58 \pm 1,20$	0,00	122,70	23,70
Коефіцієнт балансу РРО	$0,937 \pm 0,029$	0,119	7,130	0,552
Коефіцієнт балансу варіативності РРО	$0,88 \pm 0,06$	0,00	8,08	1,04

Висновки. Крім показників точності й варіативності РРО не менш інформативними та змістовними показниками реакції на рухомий об'єкт виступають критерії випередження і запізнення та їхня варіативність. Коефіцієнти балансу РРО й балансу варіативності РРО має сенс використовувати лише як додаткові показники РРО. Для професії оператора, де необхідність обліку й корекції просторово-часових параметрів об'єктів керування вважається професійною вимогою, дослідження індивідуально-типологічних особливостей реакції на рухомий об'єкт доцільно використовувати при психофізіологічному відборі.

1. Афанасьев Б.Г. Системный механизм восприятия пространства и парная работа больших полушарий головного мозга // Проблемы восприятия пространства и пространственных представлений – М., 1961.
2. Лисенкова В.П. Восприятие времени в связи с некоторыми хронометрическими характеристиками человека // Экспериментальная и прикладная психология. – Л., 1968.
3. Лисенкова В.П. Об особенностях отражения пространства и времени человеком // Психологический журнал. – 1981. – Т. 2, № 3. – С. 113–119.
4. Бернштейн Н.А. Очерки по физиологии движений активности. – М., 1966.
5. Лейтес Н.С. // Типологические особенности ВНД человека. – М., 1963. – Т. 3.
6. Куценко Т.В. Стан властивостей психофізіологічних функцій у дітей молодшого шкільного віку: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2000.

Надійшла до редколегії 27.10.04

УДК 631.8:591.6

О.В. Залоїло, асп., О.М. Філенко, канд. біол. наук,
Л.П. Бучацький, д-р біол. наук

ПОРІВНЯЛЬНА ЕКОТОКСИКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ВПЛИВУ НОВІТНІХ ІНСЕКТИЦИДІВ НА ГРУНТОВИХ ЧЕРВ'ЯКІВ

Проведено екоотоксикологічну оцінку впливу інсектицидів Банкол, Циклон, Вірін-ЗСП, Оперкод та А-8 на черв'яків *Eisenia foetida*. Установлено, що LC_{50} інсектициду Вірін – ЗСП реєструється при 1000 мг/кг, інсектициду А8 – 1 мг/кг, а для інсектицидів Банкол, Циклон та Оперкод не реєструється; LC_{100} не реєструється для інсектицидів Вірін-ЗСП та Оперкод, для інсектицидів Банкол і А8 становить 100 мг/кг, а для препарату Циклон – 1000 мг/кг; LC_{50} для препарату Банкол складає $60,71 \pm 14,5$ мг/кг, Циклон $17,5 \pm 13,2$ мг/кг, Оперкод $1583,3 \pm 9,79$ мг/кг, А-8 6,5 мг/кг субстрату, а для інсектициду Вірін-ЗСП за досліджуваних концентрацій установити не вдалося.

An ecotoxicological assessment of the effect of Bancol, Ciclon, Virin, Opercod and A-8 insecticides on the *Eisenia foetida* earthworms was carried out. It was found that LC_{50} of the Virin insecticide is 1000 mg/kg, for A8 it is 1 mg/kg, while for the Bancol, Ciclon and Opercod insecticides it is not detectable at all. LC_{100} is not detectable for Virin and Opercod, while for Bancol and A8 it is 100 mg/kg, and for Ciclon 1000 mg/kg. LC_{50} for Bancol is $60,71 \pm 14,5$ mg/kg, for Ciclon $17,5 \pm 13,2$ mg/kg, for Opercod $1583,3 \pm 9,79$ mg/kg, and for A-8 6,5 mg/kg of the substrate.

Вступ. Сучасні інсектициди є поширеним засобом для боротьби з комахами-шкідниками. Широкий спектр діючих хімічних речовин, які лежать в основі препаратів, запобігає виникненню адаптивних процесів і захисних реакцій у комах і пригнічує їхні природні резистентні властивості. Така штучна регуляція популяцій шкідників

безумовно спрямована на підвищення врожаю [5]. Оскільки інсектициди це не вузькоспецифічні токсини, то визначальним фактором для оцінки їх у польових умовах є не лише здатність до знищення шкідників, але й ступінь токсичності для мешканців ґрунту. Надмірне внесення цих хімічних препаратів (недостатньо ретельно

розраховані рекомендовані дози) призводить до зміни ґрунтової біоти, що викликає зміну складу ґрунтів і подальше зниження їхньої родючості [8, 9].

Земляні черв'яки – це невід'ємна складова будь-якої ґрунтової екосистеми. Їхня ґрунтоутворювальна функціональна роль очевидна. Використання земляних черв'яків як тест-об'єктів екоотоксикологічних досліджень є загальною умовою для визначення доцільності використання добрив і пестицидів у сільському господарстві [7].

У наших попередніх роботах [2–4] подано екоотоксикологічну оцінку впливу гербіцидів на ґрунтових черв'яків, а також вплив інсектицидів і фунгіцидів на ґрунтову мікрофлору циклу азоту. Дана робота стосується визначення летальних концентрацій LC_{50} інсектицидів Банкол, Циклон, Вірін-ЗСП, Оперкод та А-8 для земляних черв'яків *Eisenia foetida*.

Об'єкт і матеріали досліджень. У наших дослідженнях використовували тест на штучному ґрунті [7]. Відповідно до цього методу, для визначення гострої токсичності інсектицидів черв'яків *Eisenia foetida* утримували в штучному ґрунті (пісок, глина, торф'яний мох, $CaCO_3$), обробленому різними концентраціями препарату. Критерієм токсичної дії інсектицидів була смертність тест-об'єкта. Методику описано в наших попередніх роботах [2, 3].

Було перевірено п'ять інсектицидів: Вірін-ЗСП (діюча речовина – вірус ядерного поліедрозу зернової совки), Банкол (д. р. – бенсултап), Циклон (д. р. – альфа-

циперметрин), А-8 (д. р. – імідаклоприд), Оперкод (д. р. – лямбда-цигалотрин).

Спостереження проводили протягом 14 діб, ураховуючи результати досліду через день. Упродовж експерименту проводили спостереження за загальним станом тварин, їхньою рухливістю, реакцією на подразнення. Черв'яків вважали заггиблими, якщо вони не реагували на м'яке механічне подразнення на фронтальному кінці тіла.

Статистичну обробку даних проводили за Плохінським [1] з використанням пакету програм наукової графіки Microcal Origin 6.0.

LC_{50} розраховували за формулою

$$LC_{50} = \frac{(a-b) \cdot (50-B)}{A-B} + b,$$

де А – смертність вище 50,0 %, а – доза, яка викликає А; В – смертність нижче 50,0 %, b – доза, яка викликає В.

Результати та їх обговорення. При визначенні можливої токсичності інсектицидів Банкол, Циклон, Вірін-ЗСП, Оперкод і А-8 для черв'яків *Eisenia foetida* досліджували концентрації препаратів у діапазоні 1000–0,1 мг/кг штучного ґрунту. Було встановлено, що концентрації цих інсектицидів 1–0,1 мг/кг ґрунту нетоксичні для тварин ($P > 0,05$). LC_0 інсектициду Вірін-ЗСП реєструвалось при 1000 мг/кг, інсектициду А8 – 1 мг/кг, а для інсектицидів Банкол, Циклон і Оперкод не реєструвалась. LC_{100} не було зареєстровано для інсектицидів Вірін-ЗСП і Оперкод, для інсектицидів Банкол і А8 становило 100 мг/кг, а для препарату Циклон – 1000 мг/кг (табл. 1).

Таблиця 1. LC_0 , LC_{50} та LC_{100} досліджених інсектицидів для *Eisenia foetida*

Інсектицид	а, мг/кг	в, мг/кг	А, %	В, %	LC_0 , мг/кг	LC_{100} , мг/кг	LC_{50} (мг/кг)	Рекомендована польова доза
Вірін-ЗСП	–	–	–	–	1000	–	–	100 мл/га
Банкол	100	50	100	42,5	–	100	60,71±14,5	200–300 г/га
Циклон	20	10	60	15	–	1000	17,8±13,2	0,10–0,27 л/га
А-8	10	5	85	35	1	100	6,5±2,34	0,2 л/га
Оперкод	2000	1000	62,5	32,5	–	–	1583,3±9,79	0,3–0,4 л/га

Оскільки для інсектициду Вірін-ЗСП навіть у дозі 1000 мг/кг субстрату не було зареєстровано LC_{100} , то в подальшому були досліджені значно вищі концентрації препарату 8000–500 мг/кг субстрату з коефіцієнтом розведення 2. Ці концентрації інсектициду суттєво не впливали на тестований об'єкт протягом усього терміну спостереження. При найвищій із досліджуваних концентрацій загибель черв'яків не перевищувала 7,5 %. Решта тварин нічим не відрізнялися від контрольних, вони були активними, рухливими, з наповненим кишечником. Отже, у діапазоні вивчених концентрацій ні LC_{100} , ні LC_{50} визначити не вдалося. Беручи до уваги норми витрат інсектициду Вірін-ЗСП, не було необхідності досліджувати вищі концентрації, оскільки досліджені нами значно більші від тих, які пропонуються для обробки лісів, а відповідно і тих, що потрапляють при цьому в ґрунт.

Оскільки при концентрації 1000 мг/кг субстрату інсектицидів Банкол і Циклон смертність черв'яків становила 100 % ($P < 0,001$) (рис. 1), то для визначення LC_{50} цих препаратів проводили дослідження з концентраціями 100–6,25 мг/кг субстрату з коефіцієнтом розведення 2 (рис. 2, а).

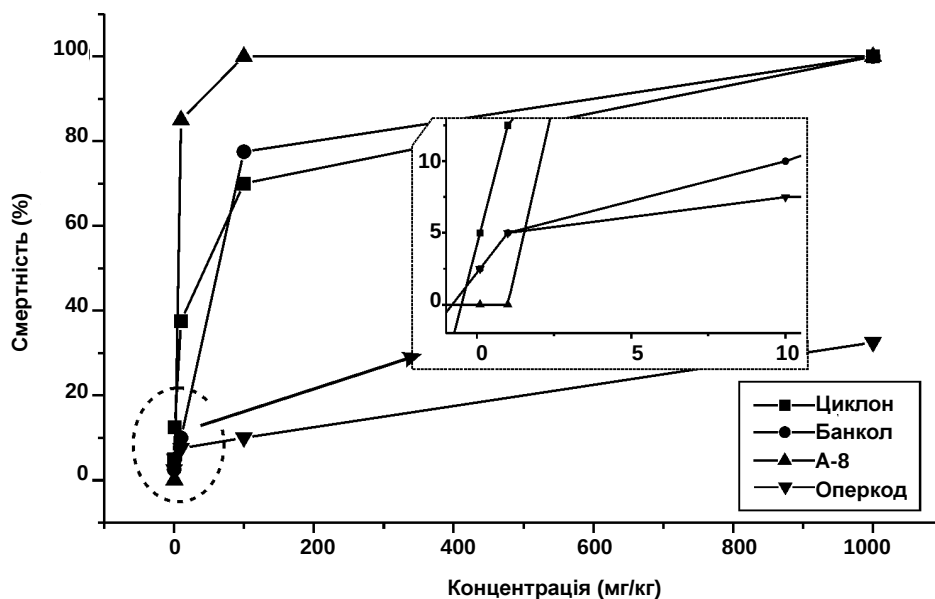
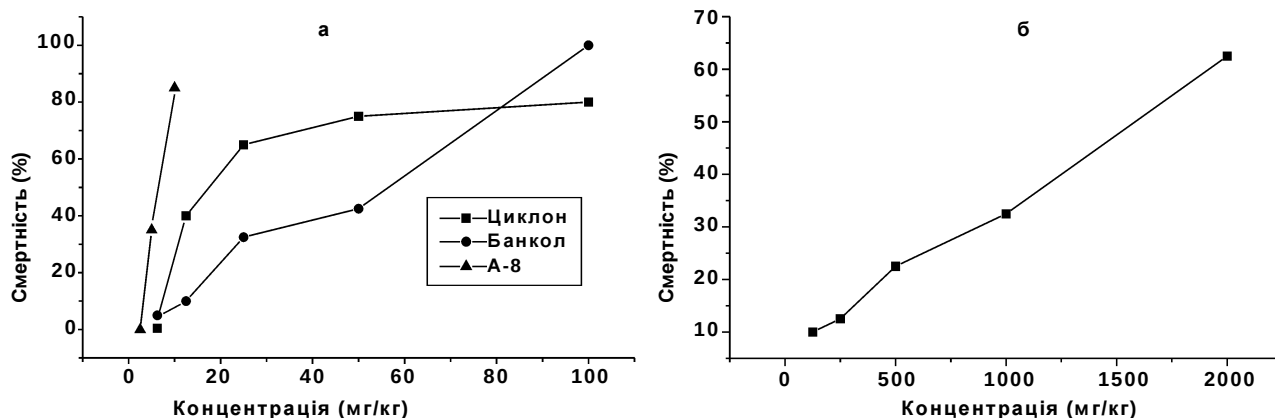
Оскільки при концентрації 1000 мг/кг субстрату інсектициду Оперкод смертність черв'яків була 32,5 % ($P < 0,01$) (рис. 1), то для визначення LC_{50} даного інсектициду проводили дослідження з концентраціями 2000–125 мг/кг з коефіцієнтом розведення 2 (рис. 2, б).

Як видно з рис. 1, при концентрації інсектициду А-8 10 мг/кг субстрату смертність черв'яків становила 85 % ($P < 0,001$), а при концентрації 1 мг/кг субстрату – 0 %. Для визначення LC_{50} цього інсектициду проводили дослідження з концентраціями 10–0,625 мг/кг субстрату з коефіцієнтом розведення 2 (рис. 2, а).

Як видно з рис. 2, А, порогова доза інсектициду Циклон становила 10 мг/кг, смертність тварин при цьому була 15 % ($P < 0,05$), а для інсектициду Банкол порогова доза була 25 мг/кг сухого ґрунту ($P < 0,01$) і смертність черв'яків складала 32,5 %. Препарат Циклон у мінімальній концентрації викликав 0,5 % смертності, а Банкол – 5 %. Підставляючи дані таблиці у формулу, в умовах нашого експерименту LC_{50} препаратів становила 17,8±13,2 мг/кг субстрату для Циклону та 60,71±14,5 мг/кг для препарату Банкол.

Препарат Оперкод у концентрації 125 мг/кг викликав 10 % смертності тварин ($P < 0,05$) (рис. 2, б). В умовах нашого експерименту LC_{50} інсектициду становила 1583,3±9,79 мг/кг.

З рис. 2, а видно, що препарат А-8 в концентрації 2,5 мг/кг не викликав смертності тварин. Порогова концентрація препарату – 5 мг/кг сухого ґрунту ($P < 0,05$). В умовах нашого експерименту LC_{50} інсектициду А-8 була 6,5 мг/кг ґрунту.

Рис. 1. Вплив різних концентрацій інсектицидів на процентний показник смертності черв'яків *Eisenia foetida*Рис. 2. Визначення медіанної концентрації досліджених інсектицидів для *Eisenia foetida*

Визначивши LC_{50} для чотирьох інсектицидів, беручи до уваги їхні норми витрат у польових умовах, адсорбцію на листі [6] та рівномірний розподіл у ґрунті [8], можна стверджувати, що рекомендовані польові дози препарату А-8 і Циклон на 1–2 порядки, інсектициду Оперкод на 3–4 порядки, Банкол на 2–3 порядки нижчі порівняно з тими, які є токсичні для черв'яків *E. foetida* (табл. 1).

Обробка ґрунту різними дозами інсектицидів дозволила визначити межі їх впливу на земляних черв'яків. Два з п'яти препаратів (Оперкод і Вірін-ЗСП) не викликали 100 %-у смертність тварин. Найтоксичнішим з інших трьох препаратів виявився інсектицид А-8. Він, на відміну від препаратів Банкол і Циклон, викликав 100 %-у смертність тварин не тільки при концентрації 1000 мг/кг субстрату, а навіть при концентрації 100 мг/кг субстрату. У результаті проведених досліджень з'ясовано, що серед п'яти інсектицидів найменш токсичним був препарат Вірін-ЗСП, тому що навіть при дозі 8000 мг/кг сухого субстрату смертність черв'яків була лише 7,5 %, а найбільш токсичним – препарат А-8, оскільки в концентрації 10 мг/кг субстрату він викликав 85 % смертності тварин.

Дослідивши токсичність інсектицидів для земляних черв'яків, можна розмістити препарати в порядку зростання їхньої токсичності:

Вірін-ЗСП < Оперкод < Банкол < Циклон < А-8.

Висновки. Установлено LC_{50} чотирьох інсектицидів (Банкол, Циклон, Оперкод і А-8) для черв'яків *E. foetida*. Показано, що рекомендовані польові дози препарату А-8 і Циклон на 1–2 порядки, інсектициду Оперкод на 3–4 порядки, Банкол на 2–3 порядки нижчі порівняно з тими, що є токсичними для черв'яків. З'ясовано, що серед перевірених інсектицидів найтоксичнішим є препарат А-8, найменш токсичним – Вірін-ЗСП.

1. Плехинский Н.А. Спорные вопросы биометрии. Биометрические методы. – М., 1975.
2. Залойло О.В., Філенко О.М., Славний П.С., Бучацький Л.П. // Вісн. проблем біології та медицини. – 2004. – № 2. – С. 3–6.
3. Залойло О.В., Філенко О.М., Бучацький Л.П. // Агроєкологічний журнал. – 2004. – № 4. – С. 17–20.
4. Залойло О.В., Бучацький Л.П. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2003. – № 41. – С. 133–135.
5. Попов С.Я., Дорожкіна Л.А., Калинин В.А. Основы химической защиты растений. – М., 2003.
6. Anon R. Revision of recommended laboratory test for assessing side-effect of pesticides on soil microflora // 4-th Internat. Workshop in Basle, Switzerland, 1989, 18–21 Sept. – Basle, 1989. – P. 27–32.
7. Reinecke A.J. A review of ecotoxicological test methods using Earthworms // Ecotoxicology of Earthworms / Ed. Dr. P.W. Greig-Smith et al. – Nort York, UK, 1992. – P. 7–19.
8. Kokta C. Measuring effects of Chemicals in the laboratory: Effect Criteria and Endpoints // Ecotoxicology of Earthworms / Gen. Ed. Dr. P.W. Greig-Smith et al. – Nort York, UK, 1992. – P. 55–62.
9. Moster M.A., Schoeman A.S., Merwe M., van der. // Pest Management Science. – 2002. – Vol. 58. – P. 446–450.

Надійшла до редколегії 25.05.04

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STEADINESS OF ROSES IN TRANSFORMED ENVIRONMENT

Some results of ecological steadiness researches for roses in conditions of polluted industrial environment are presented in dependence on content of pigment cyanidine-3,5-diglycoside, on ashes elements and on building of coating tissue of leaves.

Наведено результати досліджень екологічної стійкості троянд в умовах трансформованого середовища залежно від вмісту пігменту ціанідін-3,5-диглікозиду, елементів золи та будови покривної тканини листків.

Introduction. Roses are used often for the planting of greenery at industrial enterprise territories but their reaction on the gas-laden atmosphere does not studied enough for today. In the literature there are only a few references about the laboratory experiments on some rose sorts concerning their gas-laden steadiness and some data about the reactions of Park and Polyantha roses in natural conditions, in zones of industrial environment pollution.

Plants react on the gas-laden of environment in different manner. That is why the different types of gas steadiness are distinguished: the plant ability to renew its overground organs few times during one season; morphological and anatomical building of coating leaf tissue; physiological – ability of plant organism to bound up and to neutrolize adsorbed toxic substances.

Basing on this it is possible to consider that some rose sorts have types of gas-laden steadiness described above. Roses renew their grafts 2–5 times during the vegetational period. They can accumulate enough quantity of ashes elements, due to this – to bound up and to neutrolize toxic products adsorbed in them and to clean an air in such a way. Many sorts have the coarse or leather-like coating tissue of leaves that is an obstacle for the penetration of gases and sprays into the plant organism.

The main factor in the rose gas-laden steadiness against the harmful activity of industrial products is an active type of immunity: organism ability to bound up, to neutrolize and to utilize the different penetrated compounds of salts, acids and alkalies. These roles play charged cations – Na, K, Ca, Mg that are adsorbed, diluted into the cell inner content. Due to their functions the cation-anion balance in the plant organism may be renewed if this balance was changed as the result of toxic industrial products accumulation.

In the process of observations of damaged assimilation apparatus for the different rose sorts in conditions of transformed environment we have registered that the most steady in ecological meaning were the sorts with the leaves coloured by anthocyanins. They were damaged rarely and in the less degree in comparison with other sorts. The positive role of pigments in toxin neutralizations was already described in literature [1].

Our purpose was to study the ecological steadiness of sorts that represented the seven rose groups from collection of Botanic garden named after Academician O.V. Fomin in dependence on the accumulation in their leaves of ashes elements and content of cyanidin-3,5-diglycoside.

Object and methods of researches. Experiments were carried on at the territory of machine-building factory in Kiev and simultaneously in Botanic garden named after Academician O.V. Fomin (at Kiev State University named after Taras Shevchenko). In the spray mixtures of this factory were oxides of sulphur, nitrogen, chromium and titanium. Concentration of some of them exceeded the limits of permissible norms in near-earth air in 10 and more times according to data from laboratory of factory.

The summarized action of these ingredients on the roses planted there was taken into account that characteristically for transformed environment

The main object of our investigations were the sorts of the seven garden rose groups: Polyantha, Hybrid Polyantha, Floribunda, Grandiflora, Hybrid Tea, Climbing and Park sorts from the Botanic garden collection. Morphological and biological changes in assimilation apparatus for these rose sorts were studied in the process of phenological observations simultaneously at the territory of factory and at Botanic garden. The levels of the gas-laden steadiness were studied according to the methodics [2]. Content of the ashes elements in leaves of roses were examined at laboratory conditions trice per season: Mg, Ca – by titration with Trilon, K, Na – using photometer [3]. Pigment content in leaves was studied according to the methodics of Kolesnikov P.A. and Zere S.V. [4]. In the present article the quantity of pigment is given in mg of Congo red per 1 g of the green leaf mass [5]. Used agrotechnic methods were already described [6].

Results and discussion. Table 1 demonstrates that the roses during the vegetation process can adsorb and accumulate the great quantity of ashes elements at the territory of industrial enterprise as well as at the territory of Botanic garden. This fact may be explained as the result of every year addition to the ground of fertilizers and organic manures with Na, K, Ca, Mg and other compounds. Calcium is accumulated in the leaves in the highest degree, sodium is accumulated in the lowest degree, quantities of potassium and magnesium are approximately the same.

Basing on these data it is possible to suppose that the roses reactions of defence against the toxic substances is determined in some degree by their ability for accumulation of significant amounts of ashes elements. In this way the cation-anion balance in organism is renewed and the plant steadiness against the toxic substances is increased.

Table 2 demonstrates the results of investigations of ecological steadiness for 12 sorts of 7 garden rose groups in dependence on the content of cyanidin-3,5-diglycoside and on the structure of the leaf coating tissue.

Obtained data evidences that between the gas-laden steadiness of the roses and their pigment – cyanidin-3,5-diglycoside content exists the noticeable positive correlation. The sorts of roses with the higher content of cyanidin-3,5-diglycoside have the higher steadiness against the toxic substance influences. The sorts of roses with the higher pigment contents are more steady for toxic pollution. Only exclusion were the sorts of Rosemary Rose and Super Star – they have not demonstrated such positive correlation. From our point of view, this fact may be explained by the observation that the first sort was very sensitive for the drought, the second one – was able for damaging by *Sphaerotheca pannosa* Lev. greatly. Such double "overloading" of plant organism influenced negatively on its gas-laden steadiness.

Conclusions. During the vegetation process the roses can accumulate significant amounts of ashes elements and renew, in such a way, in their organisms the cation-anion balance, necessary for the successful defence against the toxic substances.

Our experiments evidence that there is a positive correlation between the gas-laden steadiness and the content of pigment cyanidin-3,5-diglycoside. The sorts with the highest anthocyan content have, simultaneously, the highest steadiness.

Table 1. Ashes accumulation in the rose leaves during the vegetation period in Botanic garden named after Academician O.V. Fomin and in conditions of industrial atmosphere pollution. Kyiv, 1991

Sort	Group	Data of investigation	Content of ashes and ashes elements, %									
			Ca		K		Mg		Na		Ashes	
			BG	IP	BG	IP	BG	IP	BG	IP	BG	IP
Orange Triumph	Pol	05,05	2,56	2,32	0,45	0,70	0,78	0,58	0,018	0,022	11,14	13,68
		08,06	2,48	0,92	0,45	0,53	0,58	0,53	0,012	0,016	11,42	13,32
		13,09	2,80	1,92	0,67	0,68	0,58	0,73	0,018	0,022	11,48	15,08
Pink Poulsen	HPol	05,05	2,00	2,00	0,35	0,50	0,39	0,39	0,012	0,012	9,68	11,36
		08,06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		13,09	2,40	2,64	0,40	0,50	0,58	0,53	0,014	0,030	11,06	12,12
Kordes' Sondermeldung	FI	05,05	1,68	1,84	0,54	0,62	0,58	0,58	0,010	0,020	8,70	8,12
		08,06	1,28	–	0,60	–	0,39	–	0,010	–	6,38	–
		13,09	1,76	2,88	0,90	0,78	0,58	0,63	0,022	0,020	8,82	11,30
Mercedes	FI	05,05	1,76	1,36	0,50	0,60	0,56	0,48	0,011	0,010	9,44	8,16
		08,06	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		13,09	2,64	1,60	0,58	0,70	0,58	0,58	0,012	0,010	11,18	12,20
New Dawn	LCI	05,05	1,28	1,44	0,50	0,50	0,58	0,73	0,010	0,010	6,44	7,40
		08,06	1,76	1,44	0,40	0,55	0,68	0,63	0,011	0,010	8,78	8,19
		13,09	1,28	1,60	0,60	0,60	0,78	0,58	0,020	0,014	9,06	10,60
Paul's Scarlet Climber	LCI	05,05	1,76	2,40	0,32	0,30	0,49	0,68	0,008	0,010	7,42	9,90
		08,06	1,84	2,16	0,45	0,37	0,53	0,53	0,010	0,011	8,34	10,30
		13,09	1,60	2,48	0,52	0,42	0,56	0,82	0,012	0,014	8,36	11,70

Note: BG – Botanic garden; IP – industrial factory.

Table 2. Ecological steadiness of roses in dependence on the content of pigment cyanidine-3,5-diglycoside and on the leaf structures. Kyiv, 1991

Sort	Group	Degree of gas-laden steadiness	Cyanidin-3,5-diglycoside, Congo red per 1g of green mass weight	Leaf surface
Orange Triumph	Pol	++	1,1 ± 0,02	coarse
Rosenmärchen	HPol	+	0,9 ± 0,03	leather-like
Salmon Spray	HPol	+	0,8 ± 0,01	coarse
Kordes' Sondermeldung	FI	+++	2,4 ± 0,04	– " –
Prominent	FI	+++	2,0 ± 0,05	leather-like
Plamja Vostoka	FI	+++	2,1 ± 0,03	coarse
Rosemary Rose	FI	+	2,6 ± 0,03	– " –
Centenaire de Lourdes	FI	++	0,8 ± 0,02	– " –
Queen Elizabeth	Gr	++	1,1 ± 0,04	leather-like
Super Star	HT	+	1,3 ± 0,05	– " –
Paul's Scarlet Climber	LCI	+++	1,7 ± 0,03	coarse
Conrad Ferdinand Meyer	HRug	+	0,9 ± 0,01	leather-like

Note: +++ – high steadiness; ++ – middle steadiness; + – weak steadiness.

1. Мандре М. Биохимическая характеристика сортов роз, различающихся по устойчивости к мучнистой росе // Болезнеустойчивость растений. – Таллин, 1974. – С. 29–42. 2. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. – М., 1968. – Вып. 6. 3. Крешков А.П. Основы аналитической химии. – М., 1976. – С. 155–195. 4. Колесников

П.А., Зере С.В. // Физиология растений, 1962. – № 9. – С. 154–158. 5. Sondheimer E., Kortesz Z.J. // Analyt. chem., 1948. – № 20. – P. 18–30. 6. Ткачук О.А., Ткачук О.О. Троянди. – К., 1993.

Надійшла до редколегії 25.05.04

АДАПТАЦІЙНІ ОСОБЛИВОСТІ ВОДНИХ РОСЛИН У ШТУЧНИХ БАСЕЙНАХ ЗАХИЩЕНОГО ҐРУНТУ

Наведено адаптаційні особливості водних рослин в умовах штучних басейнів захищеного ґрунту. Для інтродукованих водних рослин встановлено вплив різного рівня води на виживання проростків, сіянців та ювенільних рослин. Визначено, що порогом адаптаційної можливості особин водних рослин є глибина води 5–10 см.

The adaptive peculiarities of aquatic plants under the conditions of artificial reservoirs in greenhouses have been given. For introduced aquatic plants it has been established the influence of different water-level on survival of sprouts, seedlings and juvenile plants. It has been determined that a threshold of adaptive possibility for individuals of aquatic plants is a depth of 5–10 cm.

Вступ. Водні рослини в загальній структурі флори та рослинності представлені практично в кожному ботаніко-географічному регіоні. Порівняно з іншими еколого-ценотичними комплексами вони таксономічно й ценотично менш різноманітні. Через це вивчення їхніх адаптаційних особливостей в умовах захищеного ґрунту на сьогодні є актуальним. Тому нині впровадження гідрофітів в озеленення переживає друге народження, а зацікавленість до них набуває масштабного характеру. У рослинному покриві гідрофіти займають особливе місце, бо зберегли найбільшу кількість реліктових видів. Гідрофітна флора зараз нараховує 1000 видів, а в Україні всього 195. Тому світова спільнота дійшла остаточного висновку щодо екологічної цінності цих рослин і непоправності наслідків втрати їх. Тепер у захищеному ґрунті ботанічних садів помірної зони вирощується близько 200 видів цих рослин, а у відкритому – менше 100. Тому напрямок на поповнення асортименту водних і прибережно-водних рослин за рахунок інтродукованих видів, різновидів, гібридів і культиварів світової флори сьогодні як ніколи дуже важливий. З одного боку, це дасть змогу вивчити біоекологічні особливості, способи їх культивування та розмноження в умовах захищеного й відкритого ґрунту, а з іншого боку, – виявити їхні адаптаційні можливості й у подальшому спрямувати роботу щодо розширення асортименту більш перспективних декоративних водних рослин.

Питання про походження та адаптаційні особливості гідрофільних покритонасінних вивчалася багатьма вченими [1, 2]. Водні рослини – архетип квіткових мезоксерофільної або навіть ксерофільної природи [3, 4]. Через це водне середовище для квіткових рослин є стороння стихія і не є зоною їхнього проживання [5, 6].

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктами досліджень були рослини 25 родин колекції водних тіа прибережно-водних рослин Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка; методи – інтродукційний, фенологічний та лабораторні.

Результати та їх обговорення. Об'єм гідрофільної флори не перевищує 1–1,5 % від загального складу світової. Життєві форми гідрофітів чітко вказують, що судинні квіткові мають різну ступінь та відносну адаптацію до водного середовища. Найбільш спеціалізовані форми, родини *Lemnaceae* S.F. Gray., насправді не мають екогенетичного зв'язку з водним середовищем і є неотенічною формою за А.Л. Тахтаджяном [2]. Вода як середовище існування квіткових рослин освоєна ними далеко не повністю і через це питання походження життєвих форм віднесено нами до особливостей водних рослин. Вони належать за класифікацією життєвих форм до групи аерогідрофітів (гідатоаеро-фітів) [4–7]. Це – водні трави, життєвий цикл яких проходить у лімнофазі й прибережній екофазі, а деякий час вони

вегетують у лімозній (болотяній) екофазі. У таких природних умовах вони забезпечені 100 % освітленості. Адаптаційна здатність їх до зростання в декількох екофазах, зокрема болотяної та берегової, широко використовується у практиці інтродукторів водних і прибережно-водних рослин. У штучних басейнах захищеного ґрунту кількість світла, яке отримує рослина, з глибиною зменшується до 10 %. Через це немає ніякого сенсу створювати водойми, особливо штучні, у захищеному ґрунті з глибинами більше 1,0 м, оскільки ці рослини нормально розвиваються на менших глибинах. Водні рослини при культивуванні в умовах захищеного ґрунту перебувають під дією екологічних факторів, які впливають на ріст і розвиток усієї колекції водних і прибережно-водних рослин безпосередньо через технічний режим підтримання штучного клімату, архітектуру оранжереї, інженерні облаштування самих водойм, ґрунт, вологість повітря, перепади нічних і денних температур, воду та її хімічний склад. Температурний і територіальний природні фактори в умовах помірної зони України є найважливішими, оскільки вони визначають тривалість періоду опалення оранжереї, штучне освітлення та об'єм штучних водойм.

Дослідження за рослинами родин *Acantaceae* Juss., *Alismaceae* Vent., *Amaranthaceae* Juss., *Amaryllidaceae* Jaume St.-Hil., *Apiaceae* Lindl., *Aponogetonaceae* J.G. Agardh, *Araceae* Juss., *Cabombaceae* Richard, *Ceratophyllaceae* S.F. Gray., *Cyperaceae* Fritsch., *Haloragaceae* R.Br., *Hydrocharitaceae* Juss., *Lemnaceae* S.F. Gray., *Lentibulariaceae* Rich., *Lythraceae* Jaume St.-Hil., *Mimosaceae* R.Br., *Najadaceae* Juss., *Nelumbonaceae* Dum., *Nymphaeaceae* Salisb., *Onagraceae* Juss., *Poaceae* Barnhart, *Pontederiaceae* Kunth, *Potamogetonaceae* Dum., *Scrophulariaceae* Juss., *Trapaceae* Dum., проводилися в захищеному ґрунті оранжереї водних і прибережно-водних рослин Ботанічного саду ім. акад. О.В. Фоміна. Середня максимальна температура повітря в оранжереях становила +28 °C, абсолютний максимум +45,5 °C. Середня мінімальна температура повітря +17 °C, абсолютний мінімум +11 °C. Середня максимальна температура води в басейнах +25 °C, абсолютний максимум +30 °C. Середня мінімальна температура води +17 °C, абсолютний мінімум +15 °C. Максимальна відносна вологість повітря 100 %, мінімальна – 75 %. Максимальна освітленість 50000 лк (червень), мінімальна – 500 лк (грудень, січень) (рис. 1).

Для оптимізації газового режиму проводилося податкове постачання повітря компресорним способом. Субстрат для вирощування рослин готувався з річкового піску, дернової або заплавної землі, глини, органічних добрив (перепрілий 2–3-річний коров'ячий гній) і мінеральних калійних добрив у співвідношенні 1 : 2 : 1 : 0, 25 : 0,25.

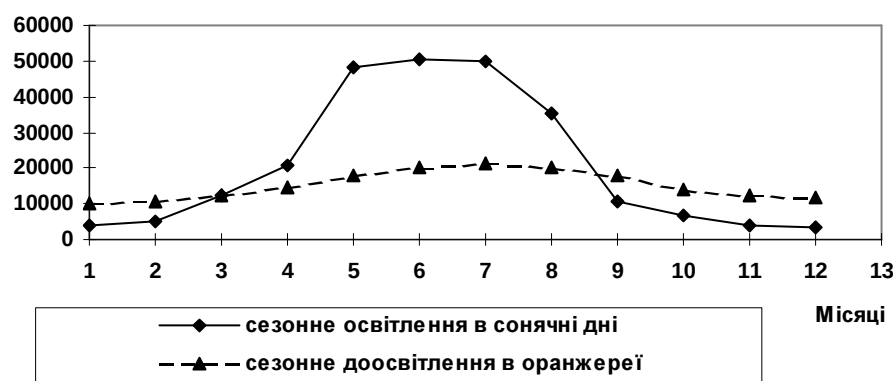


Рис.1. Сезонне природне та штучне освітлення, лк

У наших дослідках на глибинах від 5 до 40 см ростуть представники таких родин: *Alismataceae*, *Aponogetonaceae*, *Araceae*, *Cabombaceae*, *Ceratophyllaceae*, *Cyperaceae*, *Hydrocharitaceae*, *Lemnaceae*, *Lentibulariaceae*, *Lythraceae*, *Najadaceae*, *Nelumbonaceae*, *Nymphaeaceae*, *Onagraceae*, *Poaceae*, *Pontederiaceae*, *Potamogetonaceae*, *Scrophulariaceae*, *Trapa*. У природних тропічних і помірних водоймах допустимо, що фактор конкуренції з боку повітряно-водних рослин (*Typha* L., *Phragmites* Adans тощо) зумовлює заселення лімнічних ділянок водойм з більшими глибинами. Види цих родин на болотистих екосистемах водойм легко переносять і тимчасове пересихання. Подібні явища спостерігаються в межень на річках. Це дає право зробити логічне припущення про те, що всі водні рослини екологічно початково пов'язані з обводненими мочарами, неглибокими мікроекоценозами, які існували в усі геологічні епохи. Екогенетична природа гідрофітів підтримується завдяки їхній екології та фітоценології як терастральних рослин. Вони й тепер виявляють більшу приуроченість і вибірковість до заболочених і болотистих водойм. В умовах захищеного ґрунту помірної зони поведуть себе як рослини прибережно-водні. Але в наших умовах винятком є представники таких родин: *Aponogetonaceae*, *Cabombaceae*, *Ceratophyllaceae*, *Hydrocharitaceae*, *Lemnaceae*, *Lentibulariaceae* (*Utricularia*), *Najadaceae*, *Trapa*. Вегетативні органи у цих водних рослин характеризуються відсутністю механічних тканин, утрачених під час довгої гідрофільної еволюції. Ці обставини впливають на їхню біологічні морфологічні особливості і, перш за все, на листові пластинки, які розподілені нами на занурені у товщу води та ті, що плавають на її поверхні. Для переважності рослин в умовах захищеного ґрунту характерна гетерофілія, яка спостерігалася нами у рослин таких родин: *Acanthaceae*, *Alismataceae*, *Amaranthaceae*, *Apiaceae*, *Araceae*, *Cabombaceae*, *Cyperaceae*, *Haloragaceae*, *Hydrocharitaceae*, *Lentibulariaceae*, *Lythraceae*, *Nelumbonaceae*, *Nymphaeaceae*, *Onagraceae*, *Poaceae*, *Pontederiaceae*, *Scrophulariaceae*. У представників цих родин листові пластинки, крім занурених і плаваючих, бувають також піднімаються над поверхню води. У стоячих листках над поверхню води простежується наявність механічних тканин і відсутність характерної для багатьох видів розсіченої листової пластинки.

При вивченні впливу різного рівня води (5–10, 10–20, 20–30, 30–40, 40–50, 50–60, 60–70 см) як основного фактора в штучних басейнах захищеного ґрунту на проростки, сіянці та ювенільні рослини таких родин, як *Alismataceae*, *Lythraceae*, *Nelumbonaceae*, *Nymphaeaceae*, *Onagraceae*, *Potamogetonaceae*, *Scrophulari-*

aceae, *Trapa*, встановлено, що у проростків спостерігається видовження епікотелю та черешків плаваючих листків на глибині 30–40, 40–50, 50–60, 60–70 см. Розвиток кореневої системи сіянців на глибині 40–50, 50–60 і 60–70 см уповільнюється, а в подальшому спостерігається спливання їх на поверхню води та успішне вкорінення на глибинах 5–10 см. Так, на глибині 20–30, 30–40, 40–50 см, у видів: *Vasora*, *Ludwigia*, *Najas*, *Peplis*, *Potamogeton*, *Trapa*, спостерігається активний ріст листових черешків і стебла та збільшення міжвузлового проміжку (до 20 см). Через 20 днів після проростання, на глибині 40–50, 50–60, 60–70 см, у проростків *Nelumbo*, *Nymphaea* та *Nuphar* спостерігається скручування черешків. Сіянці, що утримувалися на глибинах 20–30 і 30–40 см, мали також видовжений епікотель та черешки, але скручування не спостерігалось. Сіянці названих рослин на глибинах 5–10 см розвивалися добре. У подальшому в ювенільних рослин *Nymphaea* та *Nuphar*, які утримувалися на глибині 40–50, 50–60, 60–70 см, утворювалися лише підводні листки в кількості 15–18 шт. Плаваючі листки з'являлися на 3-й рік. У рослин, що вирощувалися на глибинах 20–30, 30–40 см, утворення підводних листків спостерігалось в червні в кількості 8–10 шт, а плаваючі листки з'являлися на 2-й рік. У рослин, що ростуть на глибині 5–10 см, підводні листки утворювалися лише в кількості 5–8 шт. і тільки в серпні на поверхні з'являлися перші плаваючі листки.

Висновки. В умовах захищеного ґрунту штучних водойм простежується здатність водних рослин реагувати на коливання рівня води зміною морфологічних структур, кореляцією росту й розвитку, що є однією з головних адаптаційних реакцій на умови середовища. При вивченні впливу глибин на проростки, сіянці та ювенільні рослини в умовах захищеного ґрунту помірної зони України виявилось, що порогом адаптаційної можливості для виживання інтродукованих родин водних рослин є глибина води 5–10 см.

1. Вульф Е.В. История флор Земного шара. – М.: Л., 1944.
2. Тахтаджян А.Л. Происхождение и расселение цветковых растений. – Л., 1970.
3. Вернадский В.И. Биосфера и ноосфера. – М., 1989.
4. Краснова А.Н. Структура гидрофильной флоры техногенно трансформированных водоемов Северо-Двинской водной системы. – Рыбинск, 1999.
5. Hejny S. Ökologische charakteristik der Wasser und Sumpflpflanzen in den slowakischen Tiefebene. – Bratislava, 1960.
6. Hejny S. // Preslia. – 1962. – Vol. 34, № 4. – S. 359–367.
7. Кузьмичев А.И., Краснова А.Н., Карасева В.М. Высшие водные и прибрежно-водные растения РСФСР (СССР) // Библиографический указатель – М., 1992.
8. Камелин Р.В. Процесс эволюции растений в природе и некоторые проблемы флористики // Теоретические и методологические проблемы сравнительной флористики / Под ред. А.Л. Тахтаджяна. – Л., 1987. – С. 36–42.

Надійшла до редколегії 28.09.04

УДК 547.96: 582.4

Н.І. Карпенко, пров. інж., В.Р. Бойко, асист.

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДІВ *SECURIGERA* DC. І *CORONILLA* L.

Наведено результати електрофорезу запасних білків насіння представників родів *Securigera* DC. і *Coronilla* L. у поліакриламідному гелі. Досліджено зразки насіння 8 видів. Зроблено припущення про доцільність перенесення видів *C. varia*, *C. elegans* і *C. cretica* до роду *Securigera*.

The data from storage proteins electrophoresis of *Securigera* DC. and *Coronilla* L. species' samples in PAAG were presented. The samples' seeds of 8 species were investigated. It is made a supposition about expediency to transfer the *C. varia*, *C. elegans* & *C. cretica* into the genus *Securigera*.

Вступ. Роди *Securigera* DC. та *Coronilla* L. входять до складу триби *Coronilleae* (Adans.) Boiss. (Fabaceae). Вони є критичними в таксономічному відношенні й деякі автори включають до їхнього складу різну кількість видів, а саме: рід *Coronilla* у флорі України визнають або в широкому розумінні (у кількості 7 видів) [1–3], або у вузькому розумінні, включаючи в *Coronilla* лише 2 види: *C. coronata* L. і *C. scorpioides* (L.) W.D.J. Koch [4, 5], а решту видів переносять до родів *Securigera* DC. і *Hippocrepis* L.

Спірним залишається питання про зростання на території нашої країни гірського виду *Coronilla rostrata* Boiss. et Sprun., який і досі наводиться в літературних джерелах [2–4], але не підтверджений у гербаріях KW і Нікітського ботанічного саду жодним зразком. Можливо, цей вид наведений для флори України помилково (через його схожість з *C. cretica*) або є зниклим.

Для з'ясування систематичного положення видів рослин названих родів крім традиційних, морфологічних методів [1–3, 5–7, 10], використовувалися також біохімічні [8–11]. Ми скористалися методом електрофоретичного фракціонування запасних білків насіння. Білок безпосередньо і найбільш повно відображає належність організму до біологічного виду і може бути використаний як фактор ідентифікації сортів, біотипів і видів рослин [12–15]. Крім того, спектр білків залишається стабільним незалежно від умов середовища. У випадку запасних білків окремі їхні смуги можуть бути специфічно представлені у різноманітних генотипів рослин, що дає можливість розпізнавати генотип за присутністю/відсутністю характерних для них смуг у генетично різноманітному матеріалі.

Мета нашого дослідження – уточнення даних про систематичне положення видів двох родів: *Coronilla* та

Securigera за результатами електрофоретичного вивчення їх запасних білків.

Об'єкт і матеріали досліджень. Були використані зразки насіння, отримані з ботанічних установ Європи й зібрані в місцях природного зростання на території України, а саме: *C. emeroides* Boiss. et Sprun. № 11 – Україна, Крим, с. Малий Маяк; *C. valentina* L. (цей вид не є представником флори України, але за [4, 5] прийнятий як типовий для роду *Coronilla* замість *C. varia*) № 31 – Італія, м. Генуя, ботанічний сад університету; *C. coronata* L. № 2 – Україна, Тернопільська обл., с. Гутисько; *C. scorpioides* (L.) Koch. № 55 – Україна, Крим, Нікітський ботанічний сад; *C. cretica* L. № 2 – Україна, Крим, Нікітський ботанічний сад; *C. varia* L. № 4 – Україна, Крим, с. Малий Маяк; *C. elegans* Pans. № 2846 – Німеччина, м. Єна, ботанічний сад університету; *Securigera securidaca* (L.) Degen et Doerfl. № 56 – Україна, Крим, Партеніт.

Для отримання електрофоретичних спектрів запасних білків насіння досліджуваних видів застосовано методику ступінчатого електрофорезу за Леммлі [13].

Назви видів подані за визначником вищих рослин України[2].

Результати та їх обговорення. Порівняльне електрофоретичне дослідження запасних білків зазначених вище видів дозволило виявити від 6 до 13 електрофоретичних білкових смуг (ЕФ-смуг), рівномірно розподілених по всій електрофореграмі. Білкові спектри досліджуваних видів відрізнялися кількістю фракцій, інтенсивністю їх прояву та значеннями відносної електрофоретичної рухливості (табл. 1).

Таблиця 1. ВЕР запасних білків представників родів *Coronilla* та *Securigera*

№ фракції	C. coronata № 1	C. scorpioides № 55	C. cretica № 2	C. varia № 6	C. elegans № 2846	S. securidaca № 56
1	0,297	0,258	0,31	0,323	0,323	0,323
2	0,322	0,297	0,323	0,361	0,361	0,361

3	0,342	0,361	0,329	0,361	0,400	0,400	0,400
4	0,394	0,419	0,361	0,400	0,439	0,439	0,516
5	0,439	0,516	0,400	0,439	0,516	0,516	0,645
6	0,458	0,542	0,516	0,516	0,555	0,555	0,710
7	0,470	0,710	0,600	0,645	0,710	0,632	
8	0,516	0,666	0,716	0,716		0,710	
9	0,542						
10	0,594						
11	0,645						
12	0,665						
13	0,710						

Найменшу кількість білкових фракцій мав вид *S. securidaca* – 6, а найбільшу – *C. emeroides* – 13. Білкові спектри *C. valentina*, *C. scorpioides*, *C. cretica* та *C. elegans* склалися з 8 фракцій; *C. coronata* та *C. varia* – із 7.

Запасні білки насіння різних видів містили ряд ідентичних електрофоретичних компонентів. Найближчими за електрофоретичними показниками виявилися види *C. varia* і *C. elegans*, які мали по сім ідентичних фракцій (0,323–0,329; 0,361; 0,400; 0,439; 0,516; 0,555; 0,710–0,716); *C. valentina* й *C. coronata* (теж по сім фракцій з однаковими значеннями відносної електрофоретичної рухливості: 0,258; 0,329; 0,361; 0,419; 0,516; 0,542; 0,710–0,716); а також *C. cretica* та *S. securidaca* (шість фракцій: 0,323–0,329; 0,361; 0,400; 0,516; 0,645; 0,710–0,716). П'ять фракцій об'єднують види *C. valentina*, *C. coronata* та *C. scorpioides*; і п'ять спільних мають *C. cretica*, *C. varia*, *C. elegans*, *S. securidaca*.

Установлено, що три електрофоретичні смуги з ВЕР 0,323–0,329; 0,516; 0,710–0,716 спостерігалися в білкових спектрах усіх вивчених нами видів.

Використовуючи наявність фракцій і значення їхньої відносної електрофоретичної рухливості, було проведено кластерний аналіз електрофоретичних спектрів запасних білків насіння представників двох родів. Розрахунки й побудова дендриту виконано за допомогою програмного пакету STATISTICA.

Для об'єднання об'єктів застосували метод Варда; як міру подібності між об'єктами використали метрику "відсоток незбіжностей" [16]. На дендрограмі досліджувані види за ступенем подібності електрофоретичних спектрів розділилися на 3 кластери. У першому об'єдналися морфологічно дуже близькі види – багаторічники *C. varia* і *C. elegans* з однорічниками *C. cretica* та *S. securidaca*; у другому – *C. valentina* та *C. coronata* – багаторічники – з однорічником *C. scorpioides*; а третій кластер утворений багаторічником *C. emeroides*.

Висновки. Електрофоретичні спектри запасних білків насіння багаторічних видів відрізнялися від таких однорічних видів у межах роду *Coronilla emeroides* Boiss. et Sprun. за біохімічними особливостями запас-

них білків насіння відрізнявся як від видів роду *Coronilla*, так і *Securigera*. Види *C. varia*, *C. elegans* і *C. cretica* виявилися більш близькими до роду *Securigera*, а не *Coronilla*, як вважалося раніше [1–3]. Отже, результати наших досліджень узгоджуються із даними роботи [4, 5], де автори переносять *C. varia*, *C. elegans* і *C. cretica* до роду *Securigera*, що раніше вважався монотипним, а саме: *Coronilla cretica* L. – до *Securigera cretica* (L.) Lassen; *Coronilla elegans* Pancic – до *Securigera elegans* (Pancic) Lassen; *Coronilla varia* L. – до *Securigera varia* (L.) Lassen.

1. Нечитайло В.А., Кучерява Л.Ф. Ботаніка. Вищі рослини. – К., 2000. – С. 288. 2. Шеляг-Сосонко Ю.Р. Род *Coronilla* // Доброчаев Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др. Определитель высших растений Украины. – К., 1987. – С. 198–199. 3. Флора СССР : В 30 т. – М.; Л., 1946. – Т. 13. – С. 247–255. 4. Mosyakin S.L., Fedoronchuk M.M. Vascular plants of

Ukraine. A nomenclatural checklist. – Kiev, 1999. – P. 210–211. 5. Lassen, P. A new delimitation of the genera *Coronilla*, *Hippocrepis*, and *Securigera* (Fabaceae) // Willdenowia. – 1989. – Vol. 19. – P. 49–62. 6. Uhrova A. // Beih. Bot. Centralbl. – 1935. – Vol. 53 (1–3). – P. 1–174. 7. Васильченко И.Т. // Тр. по прикл. бот. и селекц. – 1931. – Т. 25, № 4. – С. 183–194. 8. Білецький Ю.М. // Фармацевтичний журнал. – 1964. – № 1. – С. 22–25. 9. Комиссаренко Н.Ф., Зоз И.Г. // Растит. Ресурсы. – 1969. – Т. 5, вып. 2. – С. 178–182. 10. Зоз И.Г. // Бот. журн. – 1970. – Т. 55, № 7. – С. 982–994. 11. Стрижова-Салова Н.И. // Фармакол. и токсикол. – 1957. – Т. 20, № 3. – С. 59–63. 12. Сафонов В.И., Сафонов М.П. // Физиол. растений. – 1969. – Т. 16, вып. 2. – С. 350–357. 13. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М., 1981. 14. Конярев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. – М., 1983. 15. Лидюра О.И. Рід *Medicago* L. (Fabaceae) у флорі України. – К., 1998. 16. Боровиков В.П. Популярное введение в программу STATISTICA. – М., 1998.

Надійшла до редколегії 28.09.04

УДК 616.24-002.5 +612.014.1

І.В. Чорна, пров. інженер, С.В. Демидов, д-р біол. наук,
Н.М. Дергай, пров. інж.

ВИВЧЕННЯ МОРФОМЕТРИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ Т-ЛІМФОЦИТІВ СЕЛЕЗІНКИ МУРЧАКІВ ПРИ СЕНСИБІЛІЗАЦІЇ ПІД ВПЛИВОМ ТИМАЛІНУ Й ТИМОГЕНУ

Установлено, що зміна розміру ядра й клітини є важливим індикатором клітинної функції. Число ядерців можуть бути показниками метаболічних процесів у клітині, а також критерієм активності ділянок ДНК, що кодують рибосомальні гени. Застосування тималіну і тимогену призводить до активації генетичного апарату клітини, активізує метаболізм імункомпетентних клітин, що призведе до проліферації і диференціації Т-лімфоцитів.

It was demonstrated that changes of the nucleus and cell size is an important indicator of the cell function. Thus, nucleoli number can be a good indicator of the cell metabolic processes and also activity criterion of DNA sequences encoding ribosomal genes. Timalin and timogen using cause activation of the cell genetic apparatus, activate metabolism of the immunocompetent cells, that leads to the proliferation and differentiation of the T-lymphocytes.

Вступ. Фізіологічні чинники впливають на об'єм ядра подвійно: під час поділу клітини й при функціональних змінах у ядрі. Перші каріометричні спостереження мали відношення до функціонального стану клітин. Різновидності функціонального стану клітини так чи інакше стосуються клітинного метаболізму: настають зміни білкового синтезу, а також зміни в депонуванні, у синтезі або виведенні різноманітних метаболітів. Об'єм цитоплазми залежить від активності ядра, а також від його об'єму. Об'ємні зміни ядра, які настають у результаті функціональних змін, передують змінам об'єму цитоплазми.

Спостереження за поділом клітин призвели до розшифрування ряду важливих каріометричних співвідношень [1].

Дослідженнями Р. Хертвіг [2] було показано, що між розміром ядра й розмірами клітини є тісна залежність і що ядерно-плазматичні відношення залишаються майже постійними. Згодом П. Хартманн [3] і Ф. Кормер [4] знайшли аналогічну кореляцію між величиною ядра та ядерця.

Результатом активації метаболізму клітини є зміна морфометричних показників ядра, ядерця і клітини. При цьому в ядрі й цитоплазмі відбуваються зміни алометричного типу [5–7]. Використовуючи метод оцінки каріометричних результатів клітини нами вивчався вплив тималіну й тимогену при сенсibilізації на ці показники.

Об'єкти й матеріали досліджень. У дослідженнях використано 50 мурчаків масою 250 ± 25 г. Для розвитку гіперчутливості негайного типу взяли класичну модель імунізації тварин конячою сироваткою.

Метод комп'ютерного аналізу зображень. Метод заснований на порівнянні інтенсивності фарбування структур. За інтенсивністю фарбування судять про кількісний вміст речовини в зразках. Комп'ютерний аналіз зображення проводився за системою "IBAS-2000" (виробництва ФРГ) за заданою програмою. Програма аналізу включає в себе морфометрію за такими параметрами: 1) площа клітини; 2) площа ядра; 3) відношення площі

ядра до площі клітини; 4) кількість ядерців, 5) сумарна площа ядерців; 6) відношення площі ядерців до площі ядра. Мікропрепарат з мікроскопа проектується на екран дисплея в чорно-білому зображенні. Інтенсивність фарбування структур слугує показником кількісного вмісту речовини. Отримане зображення корелюється, виводиться до друку, потім структури, які нас цікавлять, дискримінуються і проводиться обчислення необхідних параметрів.

Статистичну обробку результатів виконують за допомогою пакета прикладних програм "Кіндо" (мова реалізації "Фортран-77") на мікро-ЕВМ р-11/ 23, включаючи стандартну варіаційну статистику й регресійний аналіз. Окрім програм, які забезпечують підтримку математичних моделей систем, що розвиваються, нами застосовано діалогову персональну систему прийняття рішень (ДПСР), реалізовану на мові "Фортран-77" в операційному середовищі РХ-11м. До її функцій входило накопичення змістовних інтерпретацій стану різних ланцюгів клітинного та гуморального імунітету, а також молекулярних механізмів імунної відповіді на клітинному рівні. ДПСР – це пакет прикладних програм, які включають пакет програм статистичного аналізу "Кіндо", пакет програм маніпулювання класифікаціями (збудованими на

© І.В. Чорна, С.В. Демидов, Н.М. Дергай, 2005

основі роботи програм статистичного аналізу) і пакет програм діалогової підтримки процесу прийняття рішень у процесі аналізу закономірностей, що вивчаються. Отже, ДПСР у процесі проведення дійсного аналізу був настроєний на предметну область "Імунологія" і проблемну "Пошук і опис закономірностей". У результаті була синтезована вузькоспеціалізована діалогова підсистема "Імунологія", яка буде використана в подальших дослідках з розглянутої проблеми.

При дослідженні враховували наступні параметри: площу ядра, ядерця та клітини, ядерно-ядерцеві й клітинні відношення, кількість ядерців.

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що сенсibiliзація тварин кінською сироваткою змінює каріоцитометричні показники клітини.

Це, вірогідно, пов'язано з активацією метаболічних процесів. Так, при сенсibiliзації відбувається збільшення площі ядра з $24,46 \pm 1,97 \text{ мкм}^2$ у інтактних тварин до $27,49 \pm 2,69 \text{ мкм}^2$ (сенсibiliзованих) $P < 0,05$, що призводить до збільшення клітини в 1,3 рази. Застосування препаратів (тималіну й тимогену) збільшує площу ядра в 1,4 і 1,6 рази відповідно порівняно з показниками в сенсibiliзованих тварин, які не отримували препарати.

А це відповідно веде до адекватного збільшення площі клітини. Прийнято вважати, що об'єм ядра пропорційний вмісту в них ДНК [8]. Збільшення або ослаблення функціональної активності ядра відображається на кореляції між ДНК і об'ємом ядра.

Це положення підтверджується отриманими результатами. Як видно з табл. 1, збільшення вмісту

ДНК при сенсibiliзації впливає і на збільшення об'єму ядра клітини, така сама закономірність існує і при застосуванні препаратів тимуса на фоні розвитку сенсibiliзації. Таким чином, зміна об'єму ядра є важливим індуктором клітинної функції.

Наступним морфометричним показником активності Т-лімфоцитів є сумарна площа ядерця і кількість ядерця у клітині. Одна з основних якостей ядерця – мінливість морфометричних показників залежно від функціонального стану організму. Це зв'язано з виконанням ядерцями основних функцій синтезу клітинної РНК. Існує залежність між об'ємом ядерця й концентрацією в ній РНК, з одного боку, і кількістю РНК і білка в цитоплазмі, з іншого боку. Отже, розміри, кількість ядерця можуть бути показниками метаболічних процесів у клітинах, а також критерієм активності ділянок ДНК, кодуючих рибосомальні гени за кількісними показниками їхніх продуктів (9, 10).

Таблиця 1. Вплив тималіну й тимогену на морфометричні показники Т-лімфоцитів селезенки мурчаків при сенсibiliзації

N п/п	Площа клітин, мкм ²	Площа ядерця, мкм ²	Відношення площі ядра до площі клітини, відн. од.	Кількість ядерця	Сумарна площа ядерця, мкм ²	Відношення площі ядерця до площі ядра, відн. од.
Інтактні тварини	$37,03 \pm 3,25^*$	$24,46 \pm 1,97$	$0,66 \pm 0,02$	4	$3,27 \pm 0,24^*$	$0,14 \pm 0,02$
Сенсibiliзовані тварини	1	$46,92 \pm 3,71$	$27,49 \pm 2,63$	6	$4,09 \pm 0,28$	$0,15 \pm 0,03$
	2	$70,89 \pm 7,45$ $P_{1,2} < 0,05$	$38,78 \pm 4,33$ $P_{1,2} < 0,05$	7	$5,31 \pm 0,52$	$0,16 \pm 0,02$
	3	$76,71 \pm 8,33$ $P_{1,3} < 0,05$	$44,64 \pm 5,59$ $P_{1,3} < 0,05$	8	$5,31 \pm 0,52$	$0,16 \pm 0,02$

Примітки: 1 – тварини які не отримували препаратів; * – достовірність відмінностей між показниками в інтактній групі тварин. п. 1 – $P < 0,05$.

Як видно з табл. 1, при сенсibiliзації тварин збільшується кількість ядерця у Т-лімфоцитів, а також сумарна площа ядерця з $3,27 \pm 0,24 \text{ мкм}^2$ в інтактній групі тварин до $4,09 \pm 0,28 \text{ мкм}^2$ $P < 0,05$ у сенсibiliзованих тварин. Запровадження тимусних препаратів призводить до більшого збільшення сумарної площі ядерця. Так, застосування тималіну збільшує площу ядерця з $4,09 \pm 0,28 \text{ мкм}^2$ до $5,31 \pm 0,52 \text{ мкм}^2$, $P < 0,05$, тимогену – до $6,41 \pm 0,64 \text{ мкм}^2$, $P < 0,05$. Це взаємозалежно зі збільшенням кількості ядерця у клітині. Найбільш ефективним є тимоген.

Характер зміни морфологічних показників ядерця відповідає зміні РНК у клітині. Так, сенсibiliзація тварин кінською сироваткою призводить до збільшення сумарної площі ядерця Т-лімфоцитів в 1,3 рази й кількості РНК у 1,2 рази відповідно. Така сама закономірність і при застосуванні препаратів із тимуса (тималіну та тимогену).

Висновки. 1. Сенсibiliзація, викликана введенням конячої сироватки супроводжується зрушеннями в каріоцитометричних показниках клітини.

2. Наслідком активації метаболізму клітин є зміна морфометричних показників ядра, ядерця і клітини. При цьому ядро й цитоплазма мають зміни алотропічного типу.
УДК 612.3.: 612.014.42:612.26

3. Препарати з тимуса при розвитку ГНТ змінюють: площу ядра, ядерця і клітини, ядерно-ядерцеві та клітинні відношення, кількість ядерця імунокомпетентних клітин, що призводить до проліферації та диференціації

4. Застосування тималіну та тимогену призводить до активації генетичного апарату клітини. А це у свою чергу активізує метаболізм Т-лімфоцитів. Найбільшим ефект має тимоген.

1. К.Ташке. Введение в количественную цитогистологическую морфологию. – Бухарест, 1980 г. 2. Hertwig R. Wechselverhältnisse von Kern und Protoplasma. – München, 1903. 3. Hartmann P. // Arch. Zellforsch. – 1921. – № 15. – Z. 1. 4. Korner F. // Z. mikr.-anat. Forsch. – 1937. – № 42. – Z. 81. 5. Hulten M. // Clin. Genet. – 1978. – № 14. – P. 294–296. 6. Zwite B. // Clin. exp. immunol. – 1973. – № 13. – P. 343–375. 7. Хесин Л.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. – М., 1967. 8. Таска К. Introducere in morfologia contitave citohistologia. – Bucurest, 1976. 9. Буракова Е.В., Заславский Ю.А., Шишкин Л.И. // Информ. бюл. по радиобиол. – 1981. – № 24. – С. 18–20. 10. Булавка А.В., Васильев А.Н., Пастернак Н.Н. Количественная оценка реактивности кроветворных органов на облучение с использованием системы анализа изображений // Структурно-функциональные единицы и компоненты в органах висцеральных систем в норме и патологии: Тез. докл. научно-практ. конф. Харьков, 1–3 октября 1991 г. – Харьков, 1991. – С. 37.

Надійшла до редколегії 10.04.04

Н.М. Кургалюк, д-р. біол. наук, Г.М. Ткаченко, асп.,
В.К. Рибальченко, д-р біол. наук

НО-ЗАЛЕЖНІ ЕФЕКТИ ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТЕРВАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ ТА СТРЕСУ

Досліджено вплив попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну на функціонування мітохондрій міокарда, інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у крові й міокарді після курсу інтервальних гіпоксичних тренувань за умов стресу. З'ясовано, що стрес активує сукцинат-залежну компоненту АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда на фоні інтенсифікації процесів ліпопероксидації. Показано, що курс інтервальної гіпоксії з парентеральним введенням L-аргініну попереджує надмірну активацію процесів ліпопероксидації та виступає як важливий протекторний антистресовий чинник.

It was investigated the influence of nitric oxide precursor L-arginine on heart mitochondrial functional state, intensivity of processes of lipid peroxidation in blood and heart after intermittent hypoxia training at stress condition. It was shown that stress activate succinic-dependent component of ADP-stimulation respiration in mitochondria and intensify processes of lipid peroxidation. It made conclusion about intermittent hypoxia and L-arginine influence in processes of prevention excessively and lipid peroxidation processes activation and form protective effect at stress condition.

Вступ. Адаптація організму до змін умов існування пов'язана з NO-залежними ефектами функціонування мітохондрій (МХ) і продукцією активних форм кисню [5, 6, 8]. Фармакологічна корекція мітохондріальних дисфункцій, що виникають при надлишку катехоламінів за умов гострих стресових навантажень, засвідчена низкою експериментальних досліджень [2]. Одним з основних чинників значного протекторного ефекту методу інтервальної гіпоксії, як показали роботи останніх років, є виражене збільшення об'єму депо NO на фоні зростання потужності системи антиоксидантного захисту [1, 9]. Тому метою нашого дослідження було з'ясування впливу методу інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ) і введення попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну на процеси мітохондріального дихання, окисного фосфорилування та інтенсивність ліпопероксидації в міокарді щурів за умов стресу.

Об'єкт і матеріали досліджень. Дослідження проведено на 30 щурах-самцях лінії Вістар масою 0,20–0,22 кг. Перед дослідженням тварин поділили на групи по 6 тварин у кожній. Групу I складала інтактні щури, яким перед дослідом вводили 1 мл фізіологічного розчину. Інших тварин поділили на дві підгрупи і використовували в досліді після курсу 14-денних ІГТ. Кожного дня за цей період тварин поміщали в камеру, яку по чергово впродовж 15-хвилинних інтервалів вентильовали газовою сумішшю з 10 % кисню в азоті та кімнатним повітрям. Кількість циклів була 5 на день. Щоденно за 30 хв до гіпоксичного тренування першій підгрупі тварин парентерально вводили 1 мл фізіологічного розчину (група II), а другій (група III) – 1 мл L-аргініну (600 мг/кг, "Sigma", США). З метою моделювання стресу щурів обох підгруп (групи IV і V) після 14-денного курсу ІГТ поміщали на 30 хв у камеру, заповнену водою (22 °C) із сіткою. Відстань від води до сітки в камері становила лише 5 см. Дослідження функціонального стану мітохондрій (МХ) міокарда та інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тварин після ІГТ проводили на наступну добу після останнього курсу адаптації.

Мітохондрії виділяли з міокарда методом диференціального центрифугування. Середовище виділення містило, ммоль/л: KCl – 180, 0,5 % БСА, HEPES – 10, pH 7,2. Дихання та окиснювальне фосфорилування (ОФ) у МХ вивчали полярографічним методом [3] з використанням закритого електрода Кларка і полярографа LP-7. Середовище інкубації містило ммоль/л: *trisc*-HCl – 30, KCl – 125, NaCl – 10, KH_2PO_4 – 5, MgCl_2 – 1,5, EGTA – 3, pH 7,2. Як субстрати окиснення використовували 0,35 ммоль/л сукцинат натрію, 1 ммоль/л α -кетоглутарат натрію. Додатково проводили інгібіторний аналіз, який включав інгібітор сукцинатдегідрогена-

зи 2 ммоль/л малонат та інгібітор мітохондріального ферментного комплексу I (МФК I) 10 мкмоль/л ротенон. Додаток АДФ становила 200 мкмоль/л.

За отриманими полярограмами розраховували: стан відносного спокою (V_2), швидкість фосфорилуючого (в метаболічному стані 3 за Чансом, V_3) і контрольованого (у метаболічному стані 4, V_4) дихання МХ, дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4), коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О, швидкість фосфорилування (V_ϕ) [7]. Інтенсивність процесів ПОЛ оцінювали за вмістом ТБК-реактивних продуктів у крові і тканині серця [4]. Концентрацію білка вимірювали за Лоурі [10]. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій *t* Стюдента.

Результати та їх обговорення. Показано, що МХ міокарда тварин, які пройшли курс 14-денних гіпоксичних тренувань, характеризуються змінами основних параметрів функціонування при використанні основних субстратів окиснення циклу Кребса. Так, за умов окиснення СК вірогідно зростали величини ефективності окиснювального фосфорилування (АДФ/О) і спряженості процесів дихання й ОФ на 26,47 % і 20,95 % відповідно ($P < 0,05$) на фоні зниження швидкості фосфорилуючого дихання на 32 % ($P < 0,05$) (табл. 1). За умов окиснення КГЛ вірогідні зміни досліджено для величини АДФ/О: цей показник зростав на 19,92 % ($P < 0,05$).

Для МХ тварин, які пройшли курс адаптації до гіпоксії з парентеральним введенням попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну, досліджено вірогідні зміни функціонування МХ міокарда для двох зазначених субстратів окиснення. Зокрема, при окисненні СК у тварин з введенням L-аргініну порівняно з групою тварин, яким препарат не вводили, показано достовірне підвищення швидкості фосфорилуючого дихання в активному стані (V_3) на 29,92 % ($P < 0,05$) із зниженням величини ефективності процесу ОФ на 12,79 %. Під час окиснення КГЛ за цих умов спостерігали вірогідне зростання як швидкості фосфорилуючого дихання на 135,5 % ($P < 0,001$), так і швидкості процесу фосфорилування на 104,71 % ($P < 0,001$). Зазначені зміни супроводжувалися зростанням величини дихального коефіцієнта за Чансом (V_3/V_4). Отже, модифікуюча роль методу адаптації до гіпоксії в інтервальному режимі полягає у змінах значень ефективності споживання кисню у разі використання основних субстратів циклу Кребса. Ці зміни пов'язані з цитохромоксидазою дихального ланцюга МХ [6] і поглиблюються при парентеральному введенні L-аргініну.

Таблиця 1. Зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда щурів при адаптації до гіпоксії в інтервальному режимі під впливом парентерального введення L-аргініну і стресу у разі окиснення 0,35 ммоль/л сукцинату та 1 ммоль/л α -кетоглутарату. ($M \pm m$, $n=6$)

Умови досліджу	V_3 , нг ат О/хв·мг	Дихальний контроль, V_3/V_4	АДФ/О, мкмоль/л АДФ/нг ат О	V_ϕ , мкмоль/л АДФ/хв·мг
0,35 ммоль/л сукцинат				
Контроль	61,33 $\pm$ 5,12	2,53 $\pm$ 0,16	1,36 $\pm$ 0,01	83,41 $\pm$ 7,96

Група I				
ІГТ	41,71 ± 3,71*	3,06 ± 0,09*	1,72 ± 0,12*	71,75 ± 6,11
Група II				
ІГТ і L-аргінін	54,19 ± 4,19**	3,01 ± 0,12	1,50 ± 0,11	81,29 ± 7,36
Група III				
ІГТ і стрес	73,06 ± 5,53 [#]	3,17 ± 0,09	1,83 ± 0,07	133,70 ± 10,39 [#]
Група IV				
ІГТ, L-аргінін і стрес	122,16 ± 10,71 ^{###}	2,81 ± 0,11	1,14 ± 0,09 ^{###}	139,27 ± 11,22 ^{###}
Група V				
1 ммоль/л α-кетоглутарат				
Контроль				
Група I	36,24 ± 3,39	3,22 ± 0,21	2,36 ± 0,10	85,54 ± 7,06
Група II				
ІГТ	37,07 ± 4,22	3,60 ± 0,16	2,83 ± 0,11*	104,91 ± 10,31
Група III				
ІГТ і L-аргінін	87,30 ± 8,06**	3,90 ± 0,11	2,46 ± 0,14	214,76 ± 11,36**
Група IV				
ІГТ і стрес	69,69 ± 6,98 [#]	4,65 ± 0,21 [#]	2,07 ± 0,09 [#]	144,26 ± 12,61 [#]
Група V				
ІГТ, L-аргінін і стрес	140,48 ± 9,98 ^{###}	3,31 ± 0,16 ^{###}	2,09 ± 0,11	294,63 ± 16,69 ^{###}

Примітка: * – вірогідні зміни ($P < 0,05$) між ІГТ і контролем, ** – те саме між ІГТ з L-аргініном та ІГТ, [#] – між ІГТ і стресом та ІГТ, ^{###} – між ІГТ, L-аргініном і стресом та ІГТ і L-аргініном.

У тварин, які пройшли курс ІГТ, за умов стресу досліджено вірогідне зростання величини споживання кисню в активному фосфорилуючому стані органел при окисненні СК на 75,16 % і швидкості фосфорилування на 86,34 % ($P < 0,01$). Проте не досліджено вірогідного зростання величин ефективності ОФ і дихального коефіцієнту за цих умов. Окиснення КГЛ у щурів після курсу інтервальної гіпоксії за умов стресу супроводжувалося вірогідними змінами усіх досліджуваних показників, зокрема зростанням швидкості фосфорилуючого дихання на 88 % ($P < 0,01$), величини спряженості процесів дихання й ОФ на 29,17 % ($P < 0,01$) і швидкості фосфорилування на 37,51 % ($P < 0,01$), проте величина АДФ/О знизувалася на 26,86 % ($P < 0,01$).

Таким чином, стрес у щурів після курсу ІГТ характеризується зростанням значень фосфорилуючого дихання. При цьому зміна функціональних параметрів МХ міокарда супроводжувалася зростанням процесів економізації використання кисню. Показано, що останні через катехоламіни й активацію процесів ліпопероксидації модифікують енергосинтезуючі процеси в органелах [8]. Проте тільки за умов парентерального введення у курсі ІГТ щурам L-аргініну при окисненні СК досліджено зниження величини АДФ/О. При цьому зберігалися на високому рівні значення спряженості процесів дихання і фосфорилування та швидкості фосфорилування. Отже, структурна перебудова метаболічних шляхів функціонування МХ міокарда шляхом посилення економізації процесів використання кисню у процесах енергозабезпечення органел виступає протекторним чинником за умов стресу.

Для оцінки взаємокоригуючих впливів метаболічних шляхів у підтриманні функціонування МХ використовували інгібторний аналіз, який включав дослідження ротенончутливої компоненти (ротенон – інгібтор мітохондріального ферментного комплексу I) в окисненні СК і малонатчутливу компоненту в окисненні КГЛ. Малонат відомий як інгібтор потужного ферменту сукцинатдегідрогенази (СДГ), з функціонування якого дослідники пов'язують підвищення внеску у процеси споживання кисню дихальним ланцюгом МХ за екстремаль-

них впливів. Результати досліджень цієї серії експериментів наведено на рис. 1 (а, б).

Показано, що за умов стресу значно активується сукцинатчутлива компонента АДФ-стимульованого дихання на фоні зниження окиснення НАД-залежних субстратів. Парентеральне введення L-аргініну помітно підвищує роль НАД-залежних субстратів, КГЛ, зокрема у загальному метаболічному окисненні, оскільки саме малонат-, а не ротенончутлива компонента дихання зазнавала вірогідного зниження у процесі ІГТ і стресу. Отже, посилення ролі НАД-залежних субстратів в окисненні виступає ведучим чинником формування ефектів оксиду азоту як за умов курсу ІГТ, так і додаткової метаболічної корекції з використання попередника його біосинтезу.

Застосований нами метод стресу призводив до значної інтенсифікації процесів ліпопероксидації, що оцінювали за концентрацією ТБК-реактивних продуктів у міокарді та крові (рис. 1, в, г). Активація процесів ПОЛ зумовлена збільшенням під впливом наростаючої концентрації катехоламінів інтенсифікацією процесів споживання кисню мітохондріями, однак не підтримується належним рівнем системи антиоксидантного захисту. Тварини після курсу ІГТ з уведенням L-аргініну за умов стресу характеризуються нижчим показником інтенсивності процесів ліпопероксидації і зростаючою роллю НАД-залежного окиснення у функціонуванні МХ міокарда відносно величин у тварин без уведення L-аргініну. Відомо, що саме посилення NO-ергічної ланки, яка здатна функціонувати як унікальна стрес-лімітуюча система на етапах короткочасної та довготривалої адаптації, індукується сеансами ІГТ [1].

Літературні дослідження засвідчують участь NO-залежних механізмів у розвитку стрес-реакції. Інтенсивність останньої визначена співвідношенням активації стрес-системи, яка реалізує реакцію організму на стресовий чинник, і активацію стрес-лімітуючих систем, що можуть обмежувати надмірну активацію стрес-системи і, відповідно, ушкоджуючу дію стрес-гормонів на мітохондріальному рівні.

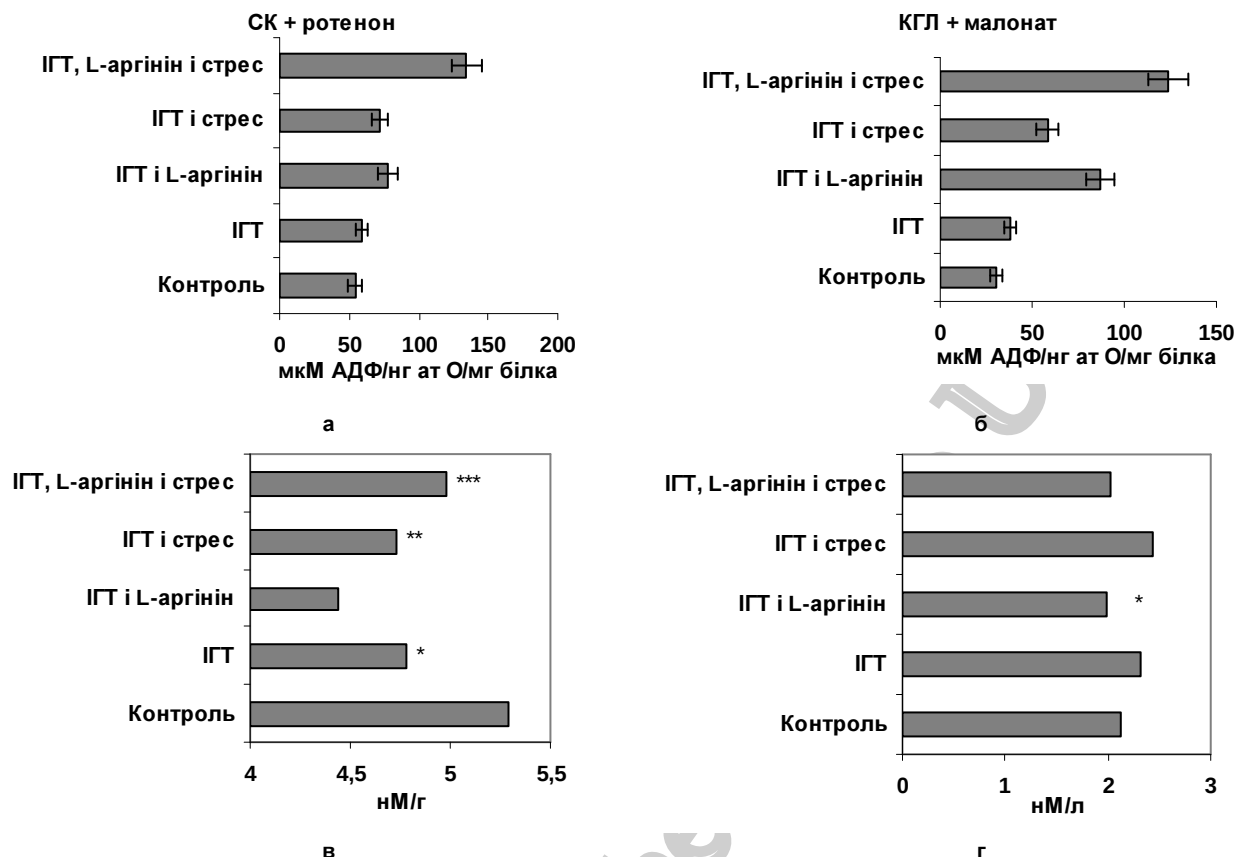


Рис. 1. Ротенончутлива компонента окиснення сукцинату (а) і малонатчутлива компонента окиснення α -кетоглутарату (б) показника АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда, вміст ТБК-активних продуктів у міокарді (в) і крові (г) щурів за умов інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ), ІГТ з уведенням L-аргініну та стресу

Висновки. Таким чином, адаптація до гіпоксії в інтервальному режимі, знижуючи інтенсивність процесів ліпопероксидації та ушкодження функціонування мітохондріальних мембран шляхом економізації процесів використання кисню, виступає важливим протекторним чинником й опосередковується оксидом азоту.

1. Кураалюк Н.Н. // Успехи физиол. наук. – 2002. – Т. 33, № 4. – С. 65–79.
2. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. – М., 1998.
3. Чекман Т.С., Горчакова Н.О., Рибальченко В.К. та ін. // Га-

- лицький лікар вісн. – 2000. – № 2. – С. 8–11.
4. Тимирбулатов Т.А., Селезнев С.И. // Лаб. дело. – 1988. – № 4. – С. 209–211.
5. Bredt D.S., Snyder S.H. // Ann. Rev. biochem. – 1994. – Vol. 63. – P. 175–195.
6. Brown G. // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1411, № 2–3. – P. 351–369.
7. Chance B., Williams G. // Adv. Enzymol. – 1956. – Vol. 17. – P. 65–134.
8. Halliwell B., Gutteridge J. Free radical in biology and medicine. – Oxford, 1989. – P. 543–555.
9. Kurhalyuk N., Ikkert O., Halkiv M. et al. // Aminoacids and their derivatives in biology and medicine. – Grodno, 2001. – P. 65–66.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 575

А.С. Драницина, асп.,
Г.Д. Телегесв, канд. біол. наук, М.В. Дибков

МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ДНК: МАРКЕРИ RAPD І МІНІСАТЕЛІТИ

Узагальнено літературні дані, отримані при вивченні поліморфізму ДНК за допомогою таких молекулярно-генетичних маркерів: мінісателітів і маркерів RAPD. Відмічено сфери застосування даних ДНК-маркерів, розглянуто обмеження їхніх можливостей при аналізі генетичних процесів у популяціях.

In the present paper literature data obtained during studying of DNA polymorphism by the following molecular-genetic markers: minisatellites and RAPD-markers have been summarized. Fields of application of these DNA-markers were designated and limitations of their possibilities were considered in analysis of genetic processes in populations.

Новий клас генетичних маркерів з'явився в середині 1980-х років після відкриття поліморфізму ДНК завдяки розвитку методів виділення, клонування та розрізання (рестрикції) генів. Вирішальну роль у становленні й розвитку "нової генетики" зіграло відкриття полімеразної ланцюгової реакції. На сьогодні поліморфізм ДНК знайдено в мітохондріальній та ядерній ДНК, у кодуючих

і некодуючих ділянках останньої, в їхніх унікальних послідовностях і в тих, що повторюються [1].

За допомогою методу ампліфікації випадкових фрагментів ДНК, або ампліфікації ДНК з одиничним випадковим праймером (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (він ще має інші, менш популярні, назви: AP-PCR (від Arbitrary Primers – PCR) і DAF (від DNA Amplified

Fragments)) можна отримати набір продуктів, зчитаних з різних, випадково відібраних праймером ділянок ДНК, котрі за електрофоретичного фракціонування дають набір смуг (патерн, спектр) різної інтенсивності [2, 3].

Швидкості зміни патернів RAPD у різних великих таксонів (примати, дроздофіла) суттєво відрізняються, але всередині таксона можна прослідкувати залежність між ступенем дивергенції патернів і часом віддалення таксону. Ступінь поліморфізму патернів залежить від специфіки ДНК і праймера, його довжини, умов ампліфікації та від якості ферменту.

На відміну від мікросателітів чи однолокусних мінісателітів, за допомогою яких вивчаються конкретні локуси геному, маркери RAPD, як і мультилокусні мінісателіти, дозволяють досліджувати геном у цілому, не потребують знання конкретної послідовності й попереднього картування та секвенування і дозволяють отримувати відповідні "фінгерпринти", або дактиловідбитки – набори характерних специфічних смуг певної геномної ДНК [3, 4].

Для аналізу RAPD використовують звичайно короткі (10–20 нуклеотидів) праймери з довільно обраними послідовностями й за допомогою ПЛР ампліфікують анонімні ділянки ДНК. Так, широко застосовують готові набори фірми "Operon Ltd" (USA), які містять по 20 10-мерних олігонуклеотидів. Сайти зв'язування праймерів випадково розподілені по геному, а поліморфізм у таких сайтах виявляється в присутності відповідних фрагментів у гені [5, 6].

Також поліморфізм RAPD-профілів зумовлений повною/неповною комплементарністю праймерів до сайтів геномної ДНК і відстанями між ними. Звідси RAPD-смуги з'являються або зникають унаслідок дії мутацій, інверсій, делецій, хромосомних перебудов відносно сайтів зв'язування праймерів. RAPD-смуги різної молекулярної маси розглядаються як окремі локуси. Різниця в інтенсивності смуг може пояснюватися різною кількістю копій продуктів, гетерозиготністю, коміграцією та частковою незбіжністю сайтів відпалу праймерів [7].

RAPD-маркерам притаманне менделівське наслідування, як правило, домінантного типу. Проте за наявності даних про потомство можна виявити й деякі кодомінантні маркери, що складають, наприклад, 2–3 % від усіх RAPD-маркерів.

RAPD-маркери локалізовані переважно в некодуючих ділянках ДНК, оскільки вона складає переважну частину геному еукаріотів. Швидкість утворення мутацій у некодуючій ДНК приблизно вдвічі вища, ніж у кодуєчій. До того ж RAPD-маркери іноді ампліфікуються з регіонів ДНК, що повторюються і можуть відображати високі швидкості їхнього мутаційного процесу [1].

Однак слід зазначити, що даний метод має і певні недоліки: однакові за розміром фрагменти можуть бути зчитаними з різних локусів або, навпаки, смуги різного розміру можуть містити гомологічні локуси. Вважається, що маркери RAPD можуть скринінгувати геном не так випадково, як на це сподівалися. Беручи до уваги те, що RAPD-праймери мають високий GC вміст [2, 3], потрібний для успішного відпалу за низьких температур, вони можуть виявляти GC-багаті регіони, нерівно розподілені по геному. З іншого боку, відповідно до випадкової природи ампліфікації, як ядерна, так і ДНК органел може бути ампліфікованою під час ПЛР. Наприклад, у досліді Агаарда та співроб. на піхті (*Pseudotsuga menziesii*) 19 % смуг RAPD-фінгерпринту могли бути віднесені до ДНК органел. Відповідним фрагментам не притаманне менделівське наслідування через їхню гаплотність і клональну спадковість [7].

Існує проблема домінантних і "нуль" алелів; у гаплотипних організмах як домінантні (присутність) і "нуль" алелі (відсутність) можуть бути зчитаними, але в диплоїдних організмів не можливо встановити, чи є генотип гомозиготним за домінантним алелем або гетерозиготним [8]. Також RAPD-аналіз характеризується низькою відтвореністю попередніх результатів [5]. Найвагомішою похибкою даного методу є так зване змагання між різними фрагментами ДНК за участь у ампліфікації. Частота таких похибок для поліморфних смуг становить $\approx 15\%$ незалежно від складності геному [6]. Не виключена можливість появи артефактних смуг унаслідок утворення вторинних структур у праймерах чи продукті. Проте дані недоліки є наслідком того, що виникнення артефактів здебільшого залежить від властивостей ДНК, праймера, і можуть контролюватися за допомогою певних підходів, наприклад, ідентифікація продуктів RAPD методом перенесення за Саузерном, секвенування смуг, поліпшення електрофоретичного розподілу тощо [7, 8].

Таким чином, RAPD-маркери залишаються хорошим робочим інструментом, особливо на перших етапах молекулярно-генетичних досліджень.

Метод RAPD дозволяє виявити велику кількість (до декількох сотень) маркерів, розсіяних по всьому геному, тому саме такі маркери є зручними для побудови генетичних карт [5] або карт зчеплення з локусами господарсько-важливих властивостей. Прикладом цього є роботи з генетичного картування винограду та аналізу родинних зв'язків між різними фруктами, їхніми мутантами та клонами [9].

Завдяки використанню даного методу було показано подібність патернів RAPD за різними праймерами в диких і домашніх форм баранів, що свідчило про їхню найближчу спорідненість. За допомогою методу RAPD досліджено деякі види копитних, змії, риб. Доведено гібридне походження та визначено двостатеві види ажірок, котрі в минулому були батьківськими [4]. Дослідження в цьому напрямку полегшується мономерністю й стабільністю патернів RAPD у партеногенетичних популяцій рептилій і невеликим рівнем гетерогенності батьківських видів [4].

У роботі [10] з порівняння генетичних профілів ентробактерій (*Yersinia enterocolitica*) різних штамів і серотипів, що були виділені з людей і свиней, за допомогою RAPD-аналізу було показано, що деякі фрагменти ДНК продукують більшу кількість смуг, ніж інші. Це явище можна було пояснити або ампліфікацією з численних ідентичних регіонів ДНК, або ампліфікацією різних послідовностей ДНК, що продукували фрагменти однакового розміру. Різний розмір спектрів у штамів однієї групи пояснювався делеціями та інсерціями, що модифікували розмір фрагментів ДНК. Також при порівнянні RAPD-спектрів, отриманих за допомогою різних праймерів, було одержано несподіваний результат: штамів різних серотипів виявляли однакові ампліфікаційні профілі [10].

При аналізі RAPD-фінгерпринтів ДНК кількох видів хвойних було показано, що поряд із мінливими всередині виду RAPD-маркерами виявляються інваріантні, що не показують індивідуальну й географічну мінливість, проте здатні до диференціації видів усередині роду, тобто видоспецифічні. Таку ДНК запропонували відрізнити від поліморфної, назвавши її RAMD – randomly amplified monomorphic DNA, і розглядати як вияв генетичного мономорфізму на рівні ДНК, відкритого раніше для білкових маркерів. Можливо, такого роду видоспецифічні RAMD-маркери виявляються розповсюдженими й серед інших організмів і можуть використовуватися при вирі-

шені таксономічних питань [1]. Так, RAPD-аналіз явив собою зручне знаряддя ідентифікації. За допомогою даних маркерів визначено видову належність і філогенетичні зв'язки різних видів збудників лептоспірозу (*Leptospira interrogans* spp), виділених із хворих людей. При використанні одного і того самого праймера для аналізу одного і того ж виду всі головні смуги RAPD-фінггерпринту були однаковими (видоспецифічними) і відрізнялися від RAPD-спектрів інших видів [11].

RAPD-маркери можуть бути використані для пошуку специфічних для різних хромосом продуктів ампліфікації. Так, у птахів виявлено смугу, специфічну для W-хромосоми. Даний фрагмент було виділено, секвеновано й показано, що він є одним із консервативних регуляторних білків структурування ДНК (CHO₂) [12]. Специфічний маркер Y-хромосоми було виявлено у вівці, свині, бика, причому два види бичачих відрізнялися за наявністю цього фрагмента [4]. При скануванні продуктів від 700 праймерів, які було отримано на ДНК самців і самок дикого (*Bombyx mandarina*) і домашнього (*B. mori*) видів шовкопряда (формули статевих хромосом: у самців ZZ, у самок ZW), удалося, напевне, знайти фракції, специфічні для W-хромосоми. Дані такого типу можуть виявитися інструментом для вивчення механізмів визначення статі та партеногенезу.

Наявність видоспецифічних ознак RAPD дозволяє використовувати ці маркери для вивчення гібридогенезу як видоутворювальної події. Для дослідів з міжвидової гібридизації особин, яких узяли в природі, наприклад при вивченні сітчастої еволюції, потрібні відомості про індивідуальну мінливість батьківських популяцій.

Нині проводяться роботи з ідентифікації продуктів RAPD, чому сприяє поєднання цього методу з методом переносу за Саузерном із подальшою гібридизацією з обраним праймером. Серед продуктів ампліфікації сьогодні виявлено всі типи ДНК – унікальні гени, середні й повтори, що часто повторюються, причому, наприклад, у ДНК сої з 11 досліджених фрагментів 6 зчитані з унікальних генів, а 3 та 2 – відповідно з указаних повторів [2]. У секвенованих фрагментах RAPD ДНК паразитичних нематод роду *Trichinella* містяться здебільшого унікальні локуси та такі, що мають невелику кількість повторів, серед яких виявлені гени хітинази, матурази й численні послідовності, гомологічні генам нематод *Caenorhabditis elegans*. Очевидно, серед RAPD-фрагментів можна очікувати появу будь-яких локусів залежно, в основному, від специфіки праймера [4, 6].

Маркери RAPD успішно використовуються для ідентифікації статі, як це було показано при визначенні статі економічно важливих тварин. RAPD-спектри свиней містили смуги, специфічні для самців. На їхній основі були сконструйовані праймери для масштабного визначення статі вищезазначених тварин за допомогою простого й ефективного методу ПЛР [12].

RAPD-аналіз може бути використаним в екотоксикології, даючи інформацію про всі прямі й непрямі шляхи дії токсичних речовин на генетичну структуру популяцій.

У літературі зазначено, що RAPD-аналіз, проведений за точно визначеними умовами, може бути корисним засобом визначення токсичних популяційних генетичних ефектів, особливо беручи до уваги те, що даний метод є відносно недорогим та інформативним (значна кількість виявлених локусів). На сьогоднішній день напрямок досліджень є новим. Тому, відповідно до своєї "випадкової" природи, дані RAPD мають розглядатися як попередні до їхнього підтвердження шляхом клонування, секвеновання та гібридизації із зондами [1, 7].

Обговорюється питання широкомасштабного впровадження методу RAPD у судову медицину, де різні види мух, личинки яких, знайдені на трупі, розвиваються в різний час, є необхідними для визначення часу настання смерті. Оскільки личинок м'ясної мухи важко ідентифікувати, особливо на ранніх стадіях розвитку, і через брак часу в розслідуваннях невідкладних кримінальних справ, де очікування перетворення личинок на імаго є неприпустимим, RAPD-аналіз як швидкий, недорогий і надійний метод є безцінним знаряддям ідентифікації [13].

Таким чином, метод RAPD за адекватного використання та інтерпретації даних є достатньо інформативним сучасним засобом вивчення генетичного різноманіття видів у природі, зокрема для дослідження генетичного поліморфізму популяцій на внутрішньо- та міжвидовому рівнях.

Він є незамінним інструментом при встановленні ступеня спорідненості та подібності й широко використовується для генетичної паспортизації порід і ліній домашніх тварин. Даний метод особливо ефективний для вирішення демографічних проблем і численних завдань, пов'язаних з оцінкою генетичного різноманіття, раціонального використання генетичних ресурсів, а також для розробки наукового обґрунтування рекомендацій щодо збереження та відтворення рідкісних видів тварин і рослин [4, 7].

Застосування RAPD аналізу значно розширило коло біологічних проблем, що вирішуються, і дозволило проводити в більш стислі терміни вивчення генетичної мінливості організмів будь-якого таксономічного рангу, незалежно від знання структури й розмірів геному, якості та кількості досліджуваних зразків (особливо на першому етапі досліджень).

Геномна дактилоскопія – це метод виявлення та аналізу гіперваріабельних тандемних повторів, або мінісателітів, описаних Джеффрісом та співавт. у середині 80-х років [14].

Мінісателіти, або число тандемних повторів, що варіює (VNTR – variable number of tandem repeats). Послідовності, які утворені з тандемних повторів з довжиною "мотиву" (core) від 9–10 до сотень нуклеотидів кожна і який повторюється 4–64 рази. За приблизними оцінками в геномі людини нараховується приблизно 1500 диспергованих локусів даного типу [15, 16].

Мінісателітам притаманна еволюція. Так, швидкість спонтанного мутаційного процесу за даними ділянками геному становить близько 2–4 мутацій на 10000 п.н/локус (10^{-2} – 10^{-4} п.н/локус) за покоління (в алозимних генів – близько 5–6 мутацій на 10000 п.н/локус (10^{-5} – 10^{-6} п.н/локус)).

Мутації типу інсерцій, делецій, котрі виникають через зсув і неточне спарювання ланцюгів ДНК при реплікації та внаслідок нерівного кросинговеру, змінюють число повторів, тобто загальну довжину такої багатокопійної послідовності, і, таким чином, є причиною поліморфізму, що спостерігається.

Такі гіперваріабельні ділянки ДНК мають багатий GC вміст і характеризуються менделівським кодомінантним успадкуванням алелів.

Ступінь гетерозиготності за локусами мінісателітів є достатньо високою (на порядок перевищує алозимну); досягає майже 100 %, і, відповідно, вони можуть бути використаними як маркерів при картуванні генів [1, 14].

Дані локуси в основному розташовані в некодуючих ділянках геному і, таким чином, зазвичай є селективно нейтральними. Це загальне правило, напевне, має деякі виключення у випадку тісного зчеплення з адаптив-

но значущими генами. Ряд фактів засвідчують, що деякі мінісателіти можуть слугувати кодуючими або регуляторними елементами, іноді їх знаходили всередині екзонів і асоціювали з хворобами [1].

Властивості довгих полімерів, зокрема тандемних повторів, дають їм можливість утворювати структури вищих порядків, котрі, наприклад, описуються кривизною молекули. Ця кривизна, вважають, відіграє роль у позиціонуванні часток нуклеосомного кора і в утворенні компактного сателітного гетерохроматину так само, як і у зв'язуванні певних білків.

Не виключена спеціальна роль, наприклад, альфойдної ДНК, у компактизації нуклеосом центромірних ділянок. Конструкції УАС, що містять альфойдну ДНК центромірних ділянок, при їх уведенні в клітини людини чи хом'яка утворюють структури, котрим притаманні властивості центромір, що виявляються цитологічно [4].

Мінісателіти людського геному розташовані нерівномірно, головним чином на кінцях хромосом, що передбачає обмеження у використанні даних послідовностей при аналізі зчеплення. Така субтеломерна локалізація людських мінісателітів корелює з високою густиною хізм під час мейозу та свідчить про асоціацію з мейотичним кросинговером. Людська Х-хромосома містить мало мінісателітів, хоча кластер мінісателітів розташований у Х-У парному регіоні. На відміну від людей мишачий геном не має кластерів мінісателітів на кінцях хромосом [16].

При вивченні хромосомної еволюції південноамериканського гризуна туко-туко (*Ctenomys*) знайдено кореляції між хромосомними перебудовами й ампліфікацією та делецією мажорного сателіта цього організму.

Мегасателіт RS 447 людини кодує убіквітинізуючий фермент, причому транскрипція тієї ж ділянки іншого ланцюга з утворенням антисенсової РНК може модулювати рівень експресії ферменту в мозку [4].

Велике алейне різноманіття та гетерозиготність, висока швидкість мутаційного процесу, соматична й онтогенетична стабільність відкривають широкі можливості для індивідуальної ідентифікації, зокрема для вирішення деяких завдань судової медицини (ДНК-фінгерпринтинг) [14, 15], вивчення індивідуального мутаційного процесу, а також у різних демографічних, екологічних і природоохоронних дослідженнях [17].

Мінісателіти виявляють при розрізанні ДНК за допомогою рестриктаз; Саузерн-блотингу зі специфічною пробою ДНК (зондом), комплементарною до послідовності, що повторюється. Полілокусні проби дозволяють виявляти одразу кілька гіперваріабельних локусів завдяки спорідненості повторів у деяких родин мінісателітів, що призводить до утворення високо індивідуальної картини – геномного дактиловідбитку (DNA fingerprints). Однолокусні проби виявляють лише одну родину мінісателітів. У більшості випадків монолокусні зонди при "пом'якшенні" умов гібридизації використовувалися як полілокусні, і навпаки, за більш "жорстоких" умов полілокусні проби можуть проявляти властивості монолокусних.

Розміри алейних варіантів, що виявляються за допомогою зондів, можуть бути різними: від 23000 п. н. до повної відсутності їх – "нуль" алейів, які з'являються внаслідок мутації [15].

Джеффризу зі співавторів [14] вдалося вперше показати, що зонди на основі кор-послідовності тандемних повторів можуть бути використані для одночасного виявлення великої кількості відповідних генетичних локусів. Це стало можливим після відкриття невеликого мінісателіта в гені

людського міоглобіну, що містить 4 повтори послідовності, яка складалася з 33 п. н. у межах одного з інтронів.

Відповідні зонди, названі 33.6 та 33.15, існують у вигляді рекомбінантних форм векторів, отриманих на основі бактеріофага M13. Кожна з них виявляє близько 15 високополіморфних смуг у діапазоні 4000–20000 п. н. [18, 19].

Зонд на основі фага M13, описаний Вассартом та співавторами, а також Рисковим та співавторами, [15] є одним із найпоширеніших зондів, що використовуються для виявлення гіперваріабельних ділянок геному організмів, котрі належать до різних таксономічних груп [8]. Послідовність із геному одноланцюгового бактеріофага M13 виявляє родину гіперваріабельних послідовностей, як-що використовується як зонд при гібридизації з геномною ДНК людини. Ця послідовність є частиною фагового гена III, який кодує білок, що бере участь у прикріпленні до бактеріальних F-пілей під час інфекції та містить дві ділянки GC-багатих тандемних повторів. Родина гіперваріабельних ділянок геному, що виявляється тандемним повтором із гена III бактеріофага M13, відрізняється від родин, які детектуються за допомогою мінісателітних зондів 33.6 та 33.15, але подібні високим ступенем поліморфізму, а також тим, що частота алейів зменшується пропорційно їх розмірам.

Середня частота співвідношення для однієї смуги в індивідів європейського походження, що не є родичами, становить близько 0,20 для фрагментів більш 2000 п. н., причому для окремого індивіда таких смуг виявляється 15–20. Отже, тандемний повтор M13 виявляє картину "відбитків ДНК", порівняну за своєю складністю з картинами, що отримують при використанні мінісателітів, і дозволяє проаналізувати 15–20 додаткових гіперваріабельних ділянок у ДНК людини та інших ссавців [15].

ДНК-дактиловідбитки повністю специфічні для певної людини і, таким чином, являють собою ефективний інструмент для позитивної ідентифікації [1, 4, 14]. Вони майже завжди характеризуються соматичною стабільністю, є ідентичними в монозиготних близнюків і підтримуються в культурі клітинних ліній. Відомі лише два приклади соматичної варіації. По-перше, незначні відмінності між тканинами були знайдені, використовуючи рестрикційні ендонуклеази, такі як Hinf I та Sau 3A, сайти яких можуть бути блокованими метилуванням (наприклад, сайт Sau 3A, що має на кінці mCG, GATmCG, стійкий до дії Sau 3A). Така варіація дактиловідбитків ДНК, можливо, є результатом різниці тканин щодо метилування і зникає, коли використовуються рестриктази, наприклад, Alu I та Hae III, котрі не можуть бути блокованими CpG метилуванням. Друге виключення з правила соматичної стабільності можна спостерігати в пухлинах [15]. ДНК-фінгерпринти також демонструють стабільність клітин зародкового шляху і всі тандемні повтори ДНК дитини прослідковуються не лише в батьків, але й у минулих поколіннях. Узагалі, ДНК-дактиловідбитки характеризуються індивідуальною специфічністю, виключення складають лише монозиготні близнюки [14]. Смуги, що складають ДНК-фінгерпринти, як уже зазначалося, успадковуються за законами Менделя. Вважаючи, що швидкість мутаційного процесу становить 4 помилки на 10000 (10^{-4}) п. н./мейоз, можна зробити висновок, що майже всі смуги геномного дактиловідбитку даної людини мають виявлятися також у відбитках ДНК або його матері, або батька. Близько половини смуг у нащадків повинні мати батьківське походження. І це є достатнім для достовірного встановлення родинних зв'язків та ідентифікації особистості в судовій медицині, незважаючи на те, що більшість батьківських фраг-

ментів не мають чітко визначених алельних пар, передбачаючи існування значної різниці в розмірі між алелями даного локусу і те, що алелі часто присутні в комплексі малих фрагментів ДНК, які важко детектувати. Якщо можливий батько не є біологічним батьком, більшість смуг його ДНК-фінгерпринта будуть відсутні в дактиловідбитку дитини, демонструючи численні виключення.

Широко досліджуючи різні родини, де батьківство поза сумнівом, Джеффріз із співавт. попередньо підрахували, що 1 із 300 фрагментів нащадка не може бути визначеним у будь-якого з батьків. Цей грубий підрахунок рівня мутаційного процесу щодо нової довжини алелей, котрий узгоджується з попередніми популяційно-генетичними підрахунками, є, звичайно, низьким серед усіх тандемних повторів і, ймовірно, змінюється від локусу до локусу. Ймовірність того, що можливий батько буде випадково мати всі 15 фрагментів і що помилкове батьківство буде встановлене, дуже мала ($< 4 \cdot 10^{-11}$, якщо можливий батько не родич справжнього батька, $< 4 \cdot 10^{-5}$, якщо вони брати) [14, 15].

Якщо кор-послідовність ДНК людини – це сигнал рекомбінації [14, 18], який, ймовірно, зберігається в еволюційному процесі, то це свідчить про те, що людські полілокусні зонди здатні гібридизуватися з мінісателітами ДНК інших видів. Дійсно, були проведені досліді, в яких обидва зонди 33.6 та 33.15 гібридизувалися з численними повторами ДНК різних хребетних, починаючи із ссавців і птахів та закінчуючи рептиліями, амфібіями й рибами. До того ж, розглядаючи інтенсивність і складність гібридизаційних зразків, можна побачити відсутність систематичного спадання відповідно філогенетичного віддалення від людини. У собак складність і генетичні властивості ДНК-фінгерпринту подібні до таких у людини, але з більш високоваріабельними фрагментами, що були одержані з численного розсіяного аутосомного собачого локусу. ДНК-відбитки котів виявилися менш складними, хоча так само високо інформативними [18].

Середня кількість локусів, що виявлялися на людському фінгерпринті, становила 29,5 (використовуючи обидва зонди 33.6 та 33.15) і була вдвічі й утричі більшою, ніж відповідно у собак (13,0) і котів (10,0). Середнє число смуг, отриманих у хатнього горобця (залежно від умов проведення ДНК-фінгерпринтингу) було від 7,5 до 21,5 [19].

Потрібно зазначити, що мультилокусний ДНК-фінгерпринтинг із M13 як зонд є на сьогоднішній день найефективнішим методом аналізу клонального різноманіття та індивідуальної мінливості в популяціях одностатевих видів хребетних, як це було показано при дослідженні популяцій партеногенетичної скельної ящірки (*Darevskia rostrombekovi*) [20].

Гібридизація людського полілокусного зонда з ДНК тварин також сприяє дослідженню мінісателітів у генетично вивчених тварин. Аналіз ДНК "відбитків" у рекомбінантних інбредних родів мишей дає змогу локалізувати індивідуальні фрагменти ДНК "відбитків" на мишачих хромосомах. Як і в людей, варіабельні локуси є аутосомними та розсіяними, і, що більш важливо, не є краще асоційованими з регіонами повторюваної ДНК: теломерами й центромерами. Таким чином, використовуючи роди мишей із відомими родоводами, стає можливим оцінити рівень нестійкості зародкової лінії різних мінісателітів. Несподіваним є те, що цей рівень змінюється від локусу до локусу. Один мишачий мінісателіт після специфічного виникнення характеризується незвичною не-

стійкістю, темп мутаційного процесу котрого щодо нової довжини алелів, становить більш ніж 1 % на гамету. Такі високо нестабільні локуси створюють ідеальну систему для більш спрямованого вивчення темпів і механізмів зміни довжини алелів у мінісателітів і для дослідження додаткової гіпотези, що кор-послідовність – це сигнал рекомбінації в ДНК хребетних. Окрім цього існує багато можливих прикладів використання ДНК-фінгерпринтингу у тварин, наприклад, ідентифікація вкрадених тварин; перевірка зразків сперми задля штучного запліднення; визначення родоводів, аналіз зчеплення та пошук кількісних специфічних екологічно важливих локусів. Тестування батьки – діти на тваринах може призвести до більш детального розуміння генетичної структури природних популяцій і також може використовуватися для видів, що зникають, задля максимізації розмноження тварин у неприродних умовах [1, 14, 17].

Отже, метод RAPD можна використовувати для вивчення генетичного внутрішньопопуляційного поліморфізму й сегрегації, історії та географії популяцій, вивчення гібридогенезу на межі алопатичних популяцій і видів; дослідження механізму утворення гібридогенних партеногенетичних форм; батьківського аналізу та ідентифікації батьківських форм у поліандричних угрупованнях; пошук споріднення диких і домашніх форм; визначення критеріїв для розмежування понять вид – підвид – популяція та інші проблеми.

Мінісателіти можна широко застосовувати в генетиці популяцій (особливо з використанням однолокусних зондів); мультилокусні зонди більш ефективні для ідентифікації індивідуальних генотипів, для оцінки спорідненості, аналізу родоводів, паспортизації видів, виявлення зчеплення маркера з локусами хвороб або господарсько-важливих ознак, дослідженні індукованого мутаційного процесу (зокрема під впливом радіаційного чи хімічного забруднення навколишнього середовища), для дослідження популяційної дивергенції та мікроеволюції.

1. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 9. – С. 1173–1195.
2. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al. // Nucleic Acids Research. – 1990. – Vol. 18, № 22. – P. 6531–6535.
3. Welsh J., McClelland M. // Nucleic Acids Research. – 1990. – Vol. 18, № 24. – P. 7213–7218.
4. Гречко В.В. // Генетика. – 2002. – Vol. 38, № 8. – С. 1013–1083.
5. Uptmoor R., Wenzel W., Friedt W. et al. // Theor. Appl. Genet. – 2003. – Vol. 106. – P. 1316–1325.
6. Hansen M., Hallden C. et al. // Plant Mol. Biol. Rep. – 1998. – Vol. 16. – P. 139–146.
7. Wolf H.D., Blust R., Backeljart T. // Mutation Research. – 2004. – Vol. 566. – P. 249–262.
8. Taylor J.W., Geiser D.M., Burt A. et al. // Clinical Microbiology Reviews. – 1999. – Vol. 12, № 1. – P. 126–146.
9. Ye G., Weeden N.F., Reisch B.I. et al. // Vitis. – 1998. – Vol. 37. – P. 33–38.
10. Leal T.C.A., Leal C.N. et al. // Genet. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 22. – P. 109–115.
11. Natarajaseenivasan K., Prabhy N., Selvanayagi K. et al. // Jpn. J. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 57. – P. 193–197.
12. Horng Yan-Ming, Huang Mu-Chion // Theriogenology. – 2003. – Vol. 59. – P. 841–848.
13. Benecke M. // Forensis international. – 1998. – Vol. 98. – P. 157–168.
14. Jeffreys A.J., Wilson V., Wong Z. et al. // Biochem. Soc. Symp. – 1987. – Vol. 53. – P. 165–180.
15. Анализ генома. Методы / Под ред. К. Дейвис. – М., 1990.
16. Ramel C. // Environmental Health Perspectives. – 1997. – Vol. 105. – P. 781–788.
17. Васильев В.А., Стеклёнов Е.П., Морозова Е.В. и др. // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 515–520.
18. Jeffreys A.J., Morton D.B. // Animal Genetics. – 1987. – Vol. 18. – P. 1–15.
19. Burke T., Bruford M.W. // Nature. – 1987. – Vol. 327. – P. 149–152.
20. Мартыросян И.А., Рысков А.П., Петросян В.Г. и др. // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 6. – С. 828–835.

Надійшла до редколегії 24.09.04

УДК 577.245

М.М. Перепелюк, асп., А.М. Слончак,
М.Ю. Оболенська, д-р біол. наук

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ДО ВИВЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА В ІНТАКТНІЙ І РЕГЕНЕРУЮЧІЙ ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

Розроблено методичні підходи щодо визначення експресії інтерферону α в інтактній і регенеруючій печінці щурів. Експериментально обґрунтовано, що при виділенні РНК необхідно використовувати центрифугування в CsCl задля повного очищення препарату РНК від домішок ДНК. Підбрано праймери для ампліфікації фрагмента ІФНа-специфічної кДНК і випробувано умови проведення зворотної транскрипції з наступною ланцюговою полімеразною реакцією.

The methodological approaches to detect interferon α in intact and regenerating rat liver were elaborated. It was experimentally proved that to obtain RNA, free from DNA the centrifugation in CsCl is an obligatory step. The primers for amplification of IFN α -specific cDNA were selected. The conditions of reverse transcription and polymerase chain reaction were developed.

Вступ. У роботі розробляються методичні підходи щодо визначення експресії інтерферону α в інтактній і регенеруючій печінці щурів.

Після класичної операції видалення 2/3 печінки у щурів відбувається вторинний розвиток органа, який до деякої міри нагадує його формування під час внутрішньоутробного періоду. Високодиференційовані клітини, які в інтактній печінці тварин діляться рідко (мітотичний індекс 1/1000), переходять з проліферативно неактивного стану в проліферативно активний. Унаслідок поділу клітин печінки всіх типів відновлюється маса й функції органа. Цей процес передбачає злагоджену діяльність усіх клітин, яка забезпечується численними медіаторами, зокрема тими, що продукуються клітинами печінки. Відомо, що в процесах формування органів клітини мезенхімального походження за допомогою медіаторів, які вони продукують, управляють ростом і диференціацією клітин епітеліального походження [1]. У печінці клітини епітеліального походження – це гепатоцити. До клітин мезенхімального походження належать синусоїдальні клітини, а саме клітини Купфера, перисинусоїдальні, осідлі лімфоцити (Ріт-клітини) та ендотеліальні. Численні цитокіни, ростові фактори, ейкозаноїди, реакційні проміжні сполуки кисню та оксиду азоту здебільшого продукуються в печінці синусоїдальними клітинами. У регенеруючій печінці щурів різні набори медіаторів функціонують на різних етапах відновлювального процесу [2].

Відомо, що після ЧГЕ необхідною умовою для переходу гепатоцитів із фази G₀ у фазу G₁ є активація клітин Купфера і продукція ними медіаторів, зокрема ФНП α , ТФР, ІІ-1 тощо [2]. Клітини Купфера здатні продукувати ще один цитокін – інтерферон α , а можливу його роль у регенераційному процесі не досліджували. Дані, отримані раніше в нашій лабораторії, засвідчили підвищення активності 2-5-олігоаденілатсинтетази на ранньому етапі регенерації [3, 4]. Цей фермент є специфічною мішенню для інтерферону [5]. Зважаючи на викладене, а також на величезний перелік генів-мішеней для ІФНа, автори передбачають його важливу роль у відновлювальному процесі печінки.

Нашим першочерговим завданням було підібрати відповідний метод для детекції РНК, яка кодує інтерферон α . Найвірогідніше, що цей інтерферон продукують клітини Купфера, які становлять лише 15 % від усіх клітин печінки. Тому відносний вміст мРНК інтерферону в нефракціонованій РНК печінки може бути малим і тільки високочутливий метод здатний його визначити. Для виконання нашого завдання було вирішено застосувати метод зворотної транскрипції з наступною ампліфікацією. Висока чутливість обраного методу вимагає високого ступеня чистоти препарату РНК, а саме відсутності в ньому будь-яких домішок ДНК.

Об'єкт і методи досліджень. Об'єктом дослідження була інтактна та регенеруюча печінка через 0,5, 1, 3, 6 та 12 год після часткової гепатектомії (ЧГЕ). Операцію виконували за методом Хіггінса – Андерсона. Перфузію печінки проводили in situ фізіологічним розчином.

Виділення РНК за методом Хомчинського [6]. 100 мг тканини розтирали в порошок у ступці з рідким азотом, переносили в пробірку (Falkon), додавали для лізису клітин 1 мл 4 моль/л ГТЦ – буфера (4 моль/л гуанідин ізотіоціанат, 25 ммоль/л Na-ацетат, рН 7,0, 1 % β -меркаптоетанол) і декілька разів пропускали через ін'єкційну голку діаметром 0,7 мм для фрагментації ДНК. До гомогенату додавали 1/10 об'єму 2 моль/л Na-ацетату, рН 7,0, такий самий об'єм фенолу й 1/2 об'єму хлороформу. Вміст пробірки перемішували на вортексі 15 с, охолоджували на льоду 15 хв, центрифугували 15 хв при 10 000 г і температурі 4 °С. Після центрифугування РНК була у водній фазі, тоді як ДНК і білки залишалися в інтер- та фенольній фазі відповідно. Водну фазу відбирали, до неї додавали рівний об'єм охолодженого ізопропанолу і ставили в холодильник при температурі –20° на 1–3 год для преципітації РНК. Суміш центрифугували 1 год при 10000 g, обережно відбирали супернатант, осад промивали 2 рази 70 %-м етанолом. Після центрифугування впродовж 30 хв етанол відбирали, осад підсушували й розчиняли в ТЕ(трис-ЕДТА)-буфері. Концентрацію РНК визначали за оптичною густиною при $\lambda=260$ нм, а чистоту препарату – за співвідношеннями A_{260}/A_{280} і A_{260}/A_{230} . Щоб позбавитись від залишків фенолу, до розчину РНК додавали 1/10 об'єму 3 моль/л Na-ацетату, 3 об'єми 96 %-го етанолу і ставили на ніч у холодильник при температурі –20 °С. Центрифугували при 10000 g 10 хв. Для того, щоб протягом довгого часу зберігати РНК, у розчин так само додавали 1/10 об'єму 3 моль/л Na-ацетату й 3 об'єми 96 %-го етанолу.

Метод виділення РНК з CsCl [7]. 400 мг тканини розтирали в ступці з рідким азотом, для лізису клітин додавали 4 мл 4 моль/л ГТЦ – буфера (4 моль/л гуанідин ізотіоціанат, 25 ммоль/л Na-ацетат, рН 6,0, 1 %-й β -меркаптоетанол), обробляли ультразвуком і пропускали через ін'єкційну голку діаметром 0,7 мм для фрагментації ДНК. Гомогенат нашаровували на 5,7 моль/л розчин CsCl у співвідношенні 1:1, центрифугували в роторі SW-40 протягом 26 год зі швидкістю 24 тис. об./хв. Під час центрифугування РНК утворює осад на дні пробірок, а ДНК і білки залишаються в супернатанті. Супернатант обережно відбирали, а осад промивали 70 %-м етанолом, що усувало CsCl і поліпшувало розчинення РНК. Осад розчиняли в ТЕ-буфері (Трис-ЕДТА), рН 7,6, розчин переносили в одну мікропробірку, додавали 1/10 об'єму

2 моль/л Na-ацетату, рівний об'єм фенолу і 1/2 об'єму хлороформу. Суміш струшували й центрифугували 15 хв при 10000 g. Цей етап потрібен був для остаточного очищення препарату РНК від білків. Супернатант відбирали, додавали такий самий об'єм ізопропілового спирту й залишали на ніч на холоді при температурі -20°C . Після центрифугування впродовж 20 хв при 10000 g осад розчиняли в ТЕ-буфері (рН 7,6). Визначення концентрації РНК, переосадження і приготування її для тривалого зберігання таке саме, як і в попередньому методі.

Метод зворотної транскрипції. Зворотну транскрипцію (ЗТ) проводили в об'ємі 50 мкл. 12,5 мкг РНК розчиняли у воді, яку перед тим було оброблено діетилпірокарбонатом (ДЕПК), додавали 2,5 мкл (0,2 мкг/мкл) випадкових гексамерних праймерів (Pharmacia) і інкубували при 70°C 5 хв для відпалу праймерів. Додавали 5 мкл 10 ммоль/л дезоксинуклеозидтрифосфатів (MBI Fermentas), 10 мкл п'ятикратного буферу (250 ммоль/л Трис- HCl , рН 8,3, 250 ммоль/л KCl , 250 ммоль/л MgCl_2 , 50 ммоль/л ДТТ) (MBI Fermentas). Через 5 хв інкубації при 25°C додавали 2,5 мкл M-MuLV зворотної транскриптази (200 од/мкл) (MBI Fermentas) і інкубували 60 хв при 42°C . Реакцію зупиняли охолодженням на льодовій бані.

Полімеразна ланцюгова реакція. Реакційна суміш для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) об'ємом 50 мкл містила 15 мкл кДНК у буфері 10 ммоль/л трис- HCl , рН 8,8, 50 ммоль/л KCl , 1,5 ммоль/л MgCl_2 , чотири нуклеозид-трифосфати, 0,2 ммоль/л кожний (MBI Fermentas, Литва), 20 пмоль кожного з праймерів (ЗАО Синтол, Росія) і 2,5 од. Тақ полімерази. Щоб запобігти випаровуванню, суміш покривали краплиною стерильного мінерального масла.

У ПЛР були використані такі праймери:

5'-ACCTATTTAAGACACATCCACACAG-3',

5'-TCTTGTTCCCTGAGGTTATGAGTATG-3'.

Реакція ампліфікації фрагментів кДНК складалася з попередньої денатурації (94°C , 4 хв), 30 циклів ампліфікації (денатурація -94°C , 1 хв, відпал праймерів -54°C , 1 хв, синтез -72°C , 30 с) і завершальної полімеризації (72°C , 7 хв).

Після проведення ПЛР мінеральне масло відбирали, до реакційної суміші додавали 5 мкл 3 моль/л Na ацетату та 3 об'єми 96 %-го етанолу і залишали на ніч на холоді при температурі -20°C . Після центрифугування при 10000 g 10 хв супернатант відбирали, а осад розчиняли в 10 мкл бідистильованої води. Отримані 10 мкл розчину ПЛР-продукту разом із 2 мкл 6-кратної фарби для нанесення (MBI Fermentas) вносили у 2 %-й агарозний гель, що містив 1 мкг/мл етидіумброміду. Електрофорез проводили в 1-кратному TBE буфері.

Рестрикція. Для визначення відповідності продукту ампліфікації очікуваному продукту його піддавали рестрикції ферментом NcoI (MBI Fermentas). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила 15 мкл ПЛР-продукту, 10 од. рестриктази NcoI, 33 ммоль/л Трис-ацетат (рН 7,9 при 37°C), 10 ммоль/л Mg-ацетат, 66 ммоль/л K-ацетат і 0,1 мг/мл БСА. Рестрикцію проводили протягом 4 год при 37°C . Електрофорез проводили в 2 %-у агарозі й 1хTBE буфері.

Результати електрофорезу візуалізували на приладі Ultrosan і фотографували цифровим фотоапаратом Canon PowerShot A75.

Результати та їх обговорення. Для того, щоб з'ясувати методом ЗТ-ПЛР вміст будь-якої мРНК у складі суміші декількох РНК, необхідно мати послідовність відповідної кДНК. У базі даних NCBI було проведено пошук нуклеотидної послідовності, яка кодує інтерферон альфа. Знайдено послідовність X00336, що позначалась як інтерферон альфа 1 щурів і була розшифрована авторами Dijkema et al., 1984 [8]. Саме цей підтип генів інтерферонів альфа переважно експресується після вірусної інфекції. Праймери до фрагмента знайденої послідовності та умови проведення його ампліфікації були підібрані в програмі Vector NTI.

Обидва праймери були перевірені на здатність утворювати димери і шпильки. Специфічність праймерів визначили в програмі Blastn. Дані праймери обмежують ділянку в 209 п. н. послідовності кДНК (уся послідовність має розмір 729 п. н.). Відомо, що в геномі щурів існує ще 11 послідовностей, гомологічних послідовності X00336. Комп'ютерний аналіз у програмі Vector NTI показав, що підібрані праймери реасоціюють лише з ІФН α 1-специфічною послідовністю і не взаємодіють з жодною із інших одинадцяти ІФН-подібних послідовностей. Вони також не взаємодіють з послідовністю інтерферону β , що гомологічна на 40,3 % послідовності інтерферону α .

Для того, щоб визначити, чи є продукт ЗТ-ПЛР ІФН α 1-специфічним, передбачалось використати рестрикційний аналіз. За даними програми Vector NTI ампліфікована послідовність має сайт для фермента NcoI, який розділяє її на два фрагменти довжиною 102 і 107 п. н.

Ген інтерферону α відрізняється від багатьох генів еукаріотів тим, що не містить інтронів. Це є певною проблемою для ЗТ-ПЛР, тому що в разі наявності домішок ДНК у препараті РНК продукт ампліфікації кДНК неможливо відрізнити від продукту ампліфікації геномної ДНК.

Спочатку ми виділяли РНК за методом Хомчинського. Щоб перевірити препарат РНК на наявність домішок геномної ДНК, проведено реакцію ампліфікації без попередньої зворотної транскрипції. Реакція виявила ампліфіковані цільові продукти, що свідчить про наявність домішок ДНК у препараті РНК. Тому було зроблено висновки, що виділення РНК за методом Хомчинського не підходить для наших цілей. Метод виділення РНК з CsCl виявився надійнішим. Ампліфікація, яку було проведено без попередньої зворотної транскрипції, не дала ніякого продукту. Це свідчить про те, що метод тривалого центрифугування (26 год) надійно розділяє РНК і ДНК. Надалі ми виділяли РНК методом з CsCl.

У результаті зворотної транскрипції та ланцюгової полімеразної реакції було отримано продукт, який виявлявся на електрофореграмі смугою, що відповідала передбачуваній довжині ампліфікованого фрагмента 209 п. н. Рестрикційний аналіз продукту показав, що рестриктаза NcoI розрізає його на 2 фрагменти – 102 і 107 п. н., що передбачалось первинною послідовністю ІФН α -специфічної кДНК, обраною для ампліфікації.

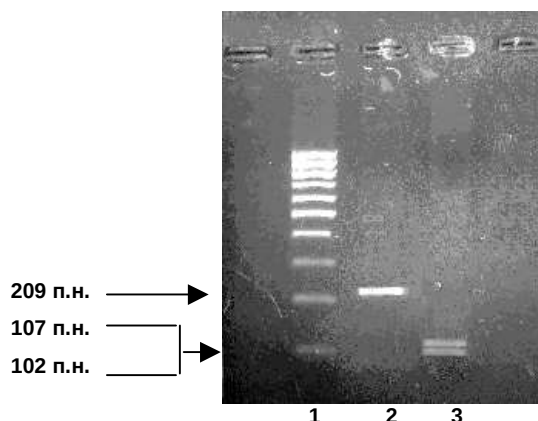


Рис. 1. Електрофореграма продукту ЗТ-ПЛР і його рестриктів.
Доріжки: 1 – маркер, 2 – продукт ампліфікації, 3 – продукти рестрикції ферментом NcoI

Отже, отриманий продукт ампліфікації відповідає мРНК, яка кодує ІФН α 1. Використані методи виділення РНК із печінки з подальшою зворотною транскрипцією та ПЛР дозволили виявити ІФН α -специфічну мРНК у складі нефракціонованої РНК.

Висновки. 1) Виділення РНК з печінки щурів з використанням CsCl є методом вибору для подальшого використання РНК у реакції зворотної транскрипції з наступною ампліфікацією ІФН α -специфічної мРНК.

2) Метод ЗТ-ПЛР є достатньо чутливим методом для визначення ІФН α -специфічної мРНК в нефракціонованій РНК печінки щурів. 3) Використання методу ЗТ-ПЛР дозволило виявити мРНК, яка кодує інтерферон альфа, в інтактній і регенеруючій печінці щурів. Кількість мРНК, що кодує інтерферон альфа, збільшу-

ється через 3 год після часткової гепатектомії порівняно з інтактною. ІФН α 1-специфічна мРНК детектується протягом 12 год після ЧГЕ.

1. Гилберт С. Биология развития. – М., 1993–95. – Т. 1–3.
2. Obolenskaya M.Yu. // EOS – J. Immunology and Immunopharmacology. – 1997. – Vol. 17, № 2. – P. 51–58.
3. Оболенская М.Ю., Кэлье М., Сазонова Л.Я. // Биополимеры и клетка. – 1997. – Т. 13, № 5. – С. 391–396.
4. Obolenskaya M.Yu., Sazonova L., Rybalko S., Bisbal C. // Биополимеры и клетка – 2000. – Т. 16, № 5. – С. 380–383.
5. Kerr I. M., Brown R.E., Ball L.A. // Nature. – Vol. 250. – P. 57–59.
6. Chomczynski P., Sacchi N. // Analytical Biochemistry. – 1987. – Vol. 162. – P. 156–159.
7. Molecular cloning: a laboratory manual / Ed. Sambrook F., Fritsch E.F., Maniatis T. – New York, 1989.
8. Dijkema R, Pouwels P, Reus A et al. // Nucl. Acids Res. – 1984. – Vol. 12. – P. 1227–1242.

Надійшла до редколегії 12.09.03

УДК 581.1:582.951:576.851:633.57

Н.Ф. Погоріла, канд. біол. наук

ЛЕКТИНОЛОГІЯ – ПЕРСПЕКТИВНА ГАЛУЗЬ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Подано коротку ретроспективу досліджень в галузі лектинології, зокрема рослинних аглютининів. Окреслено пріоритетні напрямки вивчення фітоаглютининів науковцями України.

Here was presented a short retrospective review in the field of lectinology, namely plant agglutinins. There were described priorities in the directions of phytoagglutinins research of Ukrainian scientists.

Серед розмаїття біологічних субстанцій рослинних організмів увагу дослідників останніми роками привертають речовини білкової природи – лектини. Ці сполуки мають здатність вибірково та зворотно зв'язувати й осаджувати (аглютинувати) специфічні вуглеводні сполуки. Цікаво, що історична "біографія" лектинів нараховує більше ста років. У 1888 р., 3 березня, о 12 год в актовому залі Тартуського університету (колишнього Дерптського, Естонія) почався урочистий захист докторської дисертації з медицини. Свою роботу "Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euforbiaceae" ("Про рицин, отруйний фермент з насіння рицини та деяких інших молочайних") подав 28-річний Петер Герман Штільмарк (Stillmark P.H., 1860 – 1923). Цю подію в історії науки вважають днем зародження нової галузі – лектинології. Штільмарк наголошував, що для вивчення рицину він першим застосував кров, вважаючи це гуманною методикою дослідження, оскільки тварини не травмувались. Він стверджував, що найцікавішою і найважливішою властивістю рицину є його осаджувальна дія на червонокривці. Добре відома нам фірма "Мерк" ще в кінці позаминого століття впровадила виробництво рицину

потрібної якості в необхідних кількостях на основі розробленої Штільмарком методики. З препаратами цієї фірми проводив свої класичні імунологічні дослідження Пауль Ерліх, тобто історія наукової імунології також нараховує близько 100 років. У докторській дисертації Василя Миколайовича Воронцова "Матеріали до питання про захисну роль печінки в організмі тварин", яку захистив у 1910 р., один з розділів присвячено рицину, будова якого й механізм токсичної дії з'ясовано лише в 1986 р. Слід пояснити, що термін "лектини" (від лат. *ligo* – з'єднувати) – відтворює найсуттєвіше у функції цих білків неімуноглобулінової природи, а саме вибірковість до певних вуглеводних залишків з утворенням агрегатів. Саме цей термін запроваджено Бойдом і Регуєра в 1949 р., коли було чітко продемонстровано можливість застосування лектинів для тестування еритроцитів певної групи крові. Оскільки об'єктом-мішенню для лектинів є певні вуглеводні групи або їхня послідовність, то це й закладено в основу таких галузей застосування як: вивчення будови та функції біологічних молекул і надмолекулярних структур, ідентифікація різноманітних біологічних об'єктів, очищення та характеристика глікокон'югатів, цілеспрямований вплив на певні стадії клі-

тинного метаболізму і т. д. Цінність цих білків як мембранних реагентів полягає також у тому, що вони дозволяють дослідити функції мембран у живій клітині. На сьогодні лектини знайдено в усіх представників живих систем – від вірусів до людини [1 – 9].

За минуле сторіччя наші знання про розповсюдження лектинів, їхню будову й роль у життєдіяльності, аспекти практичного застосування в біології та медицині значно розширились [10]. Так, якщо з 1888 по 1965 рр. в чистому вигляді було одержано всього лише три лектини, то наприкінці 1980 р. – уже 104, а до 1990 р. – більше 500. Могутнім стимулом у розвитку лектинології стали роботи М. Бюрера та колег, які віднайшли важливу роль лектинових рецепторів у механізмах міжклітинного пізнання. Віддзеркаленням бурхливого накопичення знань у різних напрямках лектинології є опублікування лише за вказані десять років понад 15000 наукових повідомлень, присвячених різнобічному вивченню цієї цікавої групи білків. У 1978 р. було засновано Міжнародну асоціацію лектинологів, яка регулярно проводить наукові конгреси під назвою "Interlec" (Інтерлек) і публікує відповідний збірник наукових праць з біології, біохімії та клінічної біохімії лектинів. Наприкінці 1997 р. створено сайт у мережі Інтернет, який містить електронний журнал "The Electronic Lectin Journal: Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Наступний 22-й форум лектинологів заплановано провести у 2006 р. (м. Утрехт, Нідерланди).

Якщо розглядати рослинні лектини, то серед сільськогосподарських аспектів вивчення лектинів слід зазначити захист рослин. Установлено, що в деяких випадках спостерігається взаємодія за типом лектин-вуглеводного розпізнавання в системах рослина – фітопатоген (грибний чи бактеріальний). Так, лектини злаків мають сильну спорідненість із зародковими трубками та місцями проростання спор збудників іржі, гельмінтоспорозу та інших хвороб грибної природи. З іншого боку, лектини рослин протидіють фітопатогенам, руйнуючи пророслі спори грибів і т. п. Очищений фітолектин конканавалін А здатен знижувати пухлиногенну дію агробактерій на бульби картоплі, а лектин цитрусових – перешкоджати дії збудника раку цих рослин. Обприскування листя гороху розчином ендогенного лектину приводить до зникнення некротичних пошкоджень на поверхні листків, що викликаються фітопатогеном. Зважаючи на значущість проблеми азотфіксації для сільського господарства, питання симбіозу рослин і бульбочкових бактерій, а також ролі лектинів рослин-хазяїв постійно перебувають в полі зору дослідників [10, 11].

Важливим для всіх є питання, пов'язане з лектинами та харчовою цінністю кормів і продуктів харчування. Відомо, що найбільше лектинів міститься в насінні рослин (квасолі, гороху, сочевиці, сої та ін.). Постає питання про вплив лектинів насіння на їхню харчову цінність, оскільки високий вміст лектинів знижує її в сирій біомасі рослин (наприклад, рицину). Очищені лектини мають виключно високу стійкість у травному тракті ссавців, негативно впливаючи на гастродигестивні процеси. Роботи ведуться в декількох напрямках. По-перше, проводять відбір сортів і клонів виду рослини для одержання насіння, практично позбавленого лектинів. По-друге, досліджують оптимальні параметри обробки сировини, які знижують або повністю нейтралізують токсичність білків. Розробляються технології, згідно з якими лектини вилучаються із сировини. Наприклад, аглютинін зародків пшениці механічно відокремлюється від ендосперму зернівки на спеціально обладнаних борошномельних комбінатах [1, 9].

Серед перспективних напрямків дослідження лектинів і використання їх, над якими працюють вчені України, відмітимо такі:

- ♦ дослідження вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України);

- ♦ вивчення лектин-вуглеводних взаємозв'язків у формуванні бактеріально-рослинних симбіотичних систем (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Співробітники цих академічних установ Луцик М.Д. і Косенко Л.В. нагороджені міжнародною медаллю Штільмарка з нагоди 100-річчя відкриття лектинів. Доктор наук, професор М.Д. Луцик, один із фундаторів лектинології в Україні, разом з В.О. Антонюком заснував підприємство з виробництва препаратів лектинів "Лектинотест";

- ♦ ультраструктурний розподіл лектинових рецепторів на поверхні клітин (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького МОЗ України, Запорізький медичний університет);

- ♦ фізіологічна роль лектинів бобових у формуванні і функціонуванні симбіозу (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Уманський державний педагогічний університет ім. П. Тичини);

- ♦ вивчення функцій лектинів генеративних органів рослин (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Полтавська державна аграрна академія Мінагрополітики України);

- ♦ лектини і процеси клітинної диференціації (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України);

- ♦ дослідження лектинових властивостей ферментів (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України);

- ♦ лектини як гістохімічні реагенти у вивченні злоякісно трансформованих клітин (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Інститут біології клітини НАН України);

- ♦ антивірусні властивості лектинів (Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця);

- ♦ вивчення інсулінових рецепторів (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України);

- ♦ протипухлинна дія лектинів (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київський національний університет імені Тараса Шевченка);

- ♦ лектини лікарських рослин і папоротеподібних та проблеми взаємодії з важкими металами, стійкість до ураження вірусами (Київський національний університет імені Тараса Шевченка й Ботанічний сад ім. акад. О.В. Фоміна, Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького МОЗ України, Львівський НДІ гематології та переливання крові, Харківський НДІ хімії та технології лікарських засобів);

- ♦ лектини морських водоростей, продукування їх у довкілля та вплив на супутні види (Інститут біології південних морів ім. О.Ковалевського (м. Севастополь);

- ♦ фізіологічна роль лектинів у процесах росту та розвитку рослин (Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України).

Останніми роками інтенсивне вивчення фітолектинів проводиться на кафедрі фізіології та екології рослин, яке започаткувала великий ентузіаст своєї справи, до-

цент кафедри генетики, канд. біол. наук Євгенія Львівна Голинська (01.04.24 – 20.11.93). Робота проводиться в декількох напрямках – від пошуку нових лікарських і діагностичних засобів на основі лектинів рослин до з'ясування фізіолого-біохімічних механізмів стійкості рослин у несприятливих умовах довкілля (посуха, вірусраження, забруднення важкими металами). Результати цих досліджень були представлені на міжнародних наукових заходах у США, Іспанії, Італії та ін. Рослинні аглютиніни стали також предметом вивчення майбутніми фахівцями – біологами, якими захищено 14 дипломних робіт і виконано 5 кандидатських дисертацій з питань фітолектинології. Група співробітників кафедри має пріоритет на розробку засобу підтримання фізіологічних функцій організму, що особливо актуально у зв'язку з Чорнобильською катастрофою [12–16].

Лектини є посередниками численних процесів, починаючи від простого на перший погляд осадження клітин і закінчуючи процесами росту та розвитку, що має загальнобіологічне значення. А це спонукатиме проведення подальших досліджень, сприятиме залученню студентства до наукової роботи в галузі лектинології. Також авто-

ри сподіваються на розширення співробітництва як у рідних стінах, так і поза їхніми межами,

1. Луцук М.Д., Панасюк Е.Н., Луцук А.Д. Лектини. – Львов, 1981.
2. Антонюк В.А. // Біополімери і клітина. – 2004. – Т. 20, № 6. – С. 493–497.
3. Peumans W.J., Van Damme E.J.M. // Plant Physiol. – 1995. – Vol. 109. – P. 347–352.
4. Лахтин В.М., Ямсков И.А. // Успехи химии. – 1991. – Т. 60, № 8. – С. 1777–1816.
5. Roth J., Zuber C., Komminoth P. et al. // Histochem. And Cell Biol. – 1996. – Vol. 106, № 1. – P. 131–148.
6. Gornik I., Maravic G., Dumic J. et al. // Clin. Biochem. – 1999. – Vol. 32, № 8. – P. 605–608.
7. Луцук А.Д., Детюк Е.С., Луцук М.Д. Лектини в гистохимии. – Львов, 1989.
8. Антонюк В.О., Рибак О.В. // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 153–158.
9. Лахтин В.М. Итоги науки и техники. – М., 1987. – Т. 2.
10. Кириченко О.В., Маліченко С.М., Косенко Л.В. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 6. – С. 539–544.
11. Маменко П.М., Коць С.Я., Якимчук Р.А. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т. 36, № 2. – С. 139–146.
12. Погоріла З.О., Мусієнко М.М., Бойко А.Л. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 46 (дод. 2). – С. 136.
13. Коваленко О.Г., Телегеева Т.А., Штакун А.В., Погоріла З.О. // Біополімери і клітина. – 2000. – Т. 16, № 1. – С. 53–58.
14. Погоріла Н.Ф., Суржик Л.М., Погоріла З.О. // Укр. бот. журн. – 2002. – Т. 59, № 2. – С. 217–220.
15. Погоріла З.О., Бойко А.Л., Капустіна Н.О. та ін. // Вісн. Київ. ун-ту. Біологія. – 2002. – Вип. 36–37. – С. 142–144.
16. Погоріла Н.Ф., Панюта О.О., Кухтей Р.Р. та ін. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т. 36, № 1. – С. 78–83.

Надійшла до редколегії 06.09.04

УДК 632.35 + 635.926

Л.Є. Огородник, канд. біол. наук, Л.М. Яковлева, канд. біол. наук

БАКТЕРІАЛЬНЕ ЗАХВОРЮВАННЯ АЙРУ ТРОСТИННОГО (*ACORUS CALAMUS L.*) В УКРАЇНІ

На території Хмельницької області України виявлено бактеріальні захворювання айру тростинного, які характеризувалися наявністю гнильних процесів кореневищ і бурюю плямистістю листя. За основними вивченими біологічними властивостями збудники віднесені до *Erwinia carotovora subsp. carotovora*, *Pseudomonas sp.* і бактерій роду *Bacillus*.

There were discovered bacterial diseases of sedge cane at the territory of Chmelnytskaya region, which are characterized by rot process of rhizomes and brown spot of leaf. At the base of investigation of biological properties bacteria were identified as *Erwinia carotovora subsp. carotovora*, *Pseudomonas sp.* and bacteria of genus *Bacillus*.

Вступ. Айр тростинний (*Acorus calamus L.*), який належить до групи прибережних рослин [1] і відноситься до родини Ароїдні (*Araceae Juss.*), є одним з представників гідрофільної флори. Це – багаторічна трав'яниста рослина з повзучим товстим кореневищем, яке є лікарською сировиною. Воно містить ефірні масла, завдяки чому його використовують у медицині та парфумерії, а також у лікєро-горілчаному виробництві [3]. Цю цінну лікарську рослину завезено в Європу з Туреччини в XVI ст. [2]. Росте на болотистих луках і болотах, на берегах річок, озер. *Acorus calamus L.* – елемент гідрофільного флористичного комплексу. Ценозоутворювач: формує чисті або змішані ценози з хвощем, осокою та іншими водними рослинами. За даними спеціалістів-ботаніків на сьогоднішній площі, що він займає, унаслідок обмеженості екологічних умов незначні й під впливом рекреаційного фактора ще більше скорочуються. Цю рослину рідко можна зустріти в Київській області, дуже рідкісна вона вже і в Черкаській. Невеликі території займає на Львівщині, Хмельниччині та Волині. Можливо, на скорочення ареалу розповсюдження айру впливають захворювання рослин, а саме бактеріальні. У літературі відсутні дані про хвороби водних рослин узагалі [4]. Тому мета нашої роботи полягала у вивченні етіології захворювання, виявленні та ідентифікації фітопатогенних бактерій, які вражають айр.

Об'єкт і матеріали досліджень. Об'єктом досліджень були зразки айру, які збирали під час літніх обстежень його заростей у Київській, Хмельницькій і Полтавській областях. Фітопатологічний аналіз і вивчення патогенних, морфологічних, фізіологічних, культуральних і біохімічних властивостей ізолюваних бактерій проводили за загальноприйнятими методиками [5]. Для

порівняльних досліджень до роботи були залучені з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМБ НАНУ типовий штам *Erwinia carotovora subsp. carotovora* 8982 ATCC (15713), *Pseudomonas fluorescens* 8937(908) та ізолюваний нами раніше з гербери *P. fluoro-violaceus* 189(3). Усі референтні штами викликають гнильні процеси на рослинах.

Результати та їх обговорення. Робота проводилась протягом 2003–2005 рр. [1]. При обстеженні заростей айру в різних областях України нами не виявлено будь-яких уражень цієї рослини на території Київської та Полтавської областей. І лише в Хмельницькій області на берегах річки Хомори (Полонський район) виявлено рослини з ознаками бактеріального ураження. На рослинах спостерігали такі типи ураження: 1) – буре м'яка гниль кореневища та його основи; 2) – захворювання листя айру, яке характеризується появою на всій верхній частині листка бурих вологих дрібних плям овальної форми розміром до 3–4 мм. На берегах річки Хомори спостерігався інтенсивний випас худоби. Мабуть цей фактор сприяв розповсюдженню захворювання рослин. У 2003 р. одержали фітопатогенні штами з уражених кореневищ айру і, вірогідно, унаслідок змін кліматичних умов, лише у 2004 р. змогли ізолювати штами з ураженого листя. Усього нами проаналізовано 50 зразків рослин, виділено 80 ізолятів. Патогенні властивості ізолятів перевіряли шляхом штучного зараження шматочків кореневища айру, бульб картоплі та цибулин цибулі в лабораторних умовах.

Після перевірки патогенних властивостей для подальшої роботи було відібрано 30 ізолятів. Слід відмітити, що бактерії *Erwinia carotovora subsp. Carotovora*

і *Pseudomonas* були виділені як з кореневища, так і з листя айру, а бактерії роду *Bacillus* – тільки з ураженого кореневища. Виділені нами штами бактерії вивчено за тридцятьма тестами. Більшість ізолятів за культурально-морфологічними властивостями ідентичні з бактеріями роду *Erwinia*. Це грамнегативні, рухомі, дрібні, кокоподібні палички з перитрихально розміщеними джгутиками. Спор не утворюють. На МПА колонії білого кольору, опалесцюючі, але не завжди, округлі з прозорим хвилястим краєм. На картопляному агарі вони утворюють сіро-білі колонії, блакитні в прохідному світлі, з хвилястим або рівним краєм, з трохи піднятим конусоподібним центром. На МПБ бактерії утворюють слабку, іноді сильну каламуть з тонкою ажурною плівкою або без неї. Факультативні анаероби. Як джерело вуглецю використовують глюкозу, сахарозу, галактозу, арабінозу, манозу, рамнозу, ксилозу, маніт з утворенням кислоти й варіабельно газу [7]. Не всі штами бактерій ферментують лактозу, мальтозу, розріджують желатин, зсідають молоко, утворюють кислоту на лакмусовій сироватці, варіабельно виділяють сірководень. Оксидазонегативні. Ці протиріччя свідчать про нестабільність деяких ознак, пов'язану, вірогідно, зі штамовою неоднорідністю цього виду.

За вивченими біологічними властивостями патогенні ізоляти розподілилися на дві групи: газоутворювальні та негазоутворювальні бактерії *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (20 штамів), флуоресцюючі і нефлуоресцюючі псевдомонаси (18 штамів) і бактерії роду *Bacillus* (20 штамів). Цікаво, що при вивченні штамів, ізольованих з уражених квіткових рослин, бактерії *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* також поділилися на групу газуючих і негазуючих, а бактерії роду *Pseudomonas* на дві групи – флуоресцюючі та нефлуоресцюючі, що, вірогідно, передбачає широку розповсюдженість цих форм патогенів на багатьох групах рос-

лин, що свідчить про широкий спектр уражень, які заважають збудники бактеріозів [6].

Висновки. Нами було виявлено бактеріальне захворювання цінної лікарської рослини – айру й описано його симптоми. Відмічено два типи ураження – бура м'яка гниль кореневища й бура плямистість листя. За основними властивостями бактерії, віднесені нами до виду *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, які не відрізнялися від властивостей типового штаму 8982 і властивостей цього виду за визначником [7]. Видова приналежність бактерій роду *Pseudomonas* потребує уточнення. Крім цього, виділено 20 ізолятів спороутворювальних бактерій. Отже, нами доведено, що бактеріальна гниль кореневища й бура плямистість айру викликається змішаною інфекцією, в якій беруть участь *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* та бактерії роду *Pseudomonas* і *Bacillus*. Бактеріальні захворювання зменшують кількість водної рослинності й забруднюють водоймища їхніми ураженими залишками. Виявлені на айрі фітопатогенні бактерії мають широке коло рослин-господарів і з потоками води можуть переноситися на великі відстані від основного джерела, тому вони є потенційною загрозою інфекцій для прибережної та сільськогосподарської рослинності.

1. Чорна Г.А. Рослини наших водойм (Атлас-довідник). – К., 2001.
2. Носаль І.М. Від рослини – до людини. Розповіді про лікувальні та лікарські рослини України. – К., 1992.
3. Лекарственные растения дикорастущие. – Минск, 1967.
4. Огородник Л.Е., Гвоздяк Р.И., Яковлева Л.М. Бактериальные болезни водных растений // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: Матер. междунар. конф. Минск, 26–28 мая 2004. – Минск, 2004. – С. 27–29.
5. Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. – К. 1968.
6. Огородник Л.Е. Бактериальные болезни цветочно-декоративных растений в Белоруссии и обоснование мер борьбы с ними: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – п. Самохваловичи, Минск. обл., 1987.
7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Baltimore; London, 1984. – Vol. 1.

Надійшла до редколегії 28.10.04

УДК 561.61: 58.02: 58.051

Н.М. Воробець, д-р біол. наук, В.І. Ніколайчук, д-р біол. наук,
В.І. Козловський, канд. біол. наук, Н.В. Бойко, канд. біол. наук,
А.І. Колесник, канд. біол. наук,

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ НАКОПИЧЕННЯМ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І ВОДНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ РОСЛИН ПРИ ЗРОСТАННІ ЇХ НА ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЯХ

Установлено, що домінуючі види рослин, які зростають на забруднених ґрунтах, стійкі до одночасної дії різних солей важких металів, зокрема кадмію, свинцю, цинку. Їх можна вважати концентраторами цих металів. Поглинання та накопичення рослинами солей важких металів залежить від рівня забруднення ґрунту, його типу та рН. Ці домінуючі рослини зберігають високий водний потенціал, високий відносний вміст води і тому зберігають здатність до активного росту й розмноження.

It has been done the comparison of heavy metal values records in the soil and *Solidago virgaurea* L. and *Stenactis annuus* Nees plants that growth on this soil. We revealed that this species can grow on the soil with high heavy metal concentration. Level of Cu, Pb, Zn, Cd, Fe absorbed and accumulated in plants depend on level of contaminated soil.

Вступ. Солі важких металів (ВМ) здатні утворювати природні або антропогенного походження природні акумуляції, де концентрація їх у сотні й тисячі разів перевищує кларкові рівні. Вони утворюють групу небезпечних забруднювачів природного навколишнього середовища. Оскільки тепер здебільшого відбувається комплексне забруднення довкілля солями важких металів, особливої актуальності набуло вивчення механізмів стійкості рослин до них.

У зоні Східних Карпат часто спостерігаються катастрофічні ситуації, які змінюють екологічний стан окремих регіонів, зокрема приустьових ділянок р. Тиса [13, 14].

Так, унаслідок неодноразового руйнування дамби в гірничодобувному підприємстві кольорових металів Бая-Борина (Румунія) у 2000 р. сотні тисяч кубічних метрів забрудненої солями важких металів і ціанідами води потрапили у водні артерії [14]. Обстеження ґрунтів у заплавах р. Тиса в Хустському районі показало перевищення гранично допустимої концентрації (ГДК) для ряду солей важких металів у 6–100 разів [1]. Дослідження вмісту солей міді та свинцю в траві й молоці корів, яких випасали на приустьових територіях у квітні-травні 2000 р. показали особливо високий вміст міді [1]. Заплавні території р. Тиса використовуються під посіви

сільськогосподарських культур, випасання худоби, збирання лікарських трав. З огляду на це подальше обстеження прируслових ділянок залишається актуальним. Протягом 2002–2003 рр. було досліджено ряд локалітетів верхнього басейну р. Тиса в рамках виконання українсько-угорського проекту "Вивчення мобілізації, акумуляції, поширення і біоремедіації важких металів у забруднених екосистемах верхнього басейну р. Тиса".

Метою даної роботи було виявити зв'язок між акумуляцією важких металів у рослинах, які домінують в досліджуваних екосистемах, і станом води в них.

Об'єкт і матеріали досліджень. Дослідження проводили на рослинах Золотушник звичайний (*Solidago virgaurea* L.) і Стенактис однорічний (*Stenactis annuus* Ness.), які широко розповсюджені вздовж р. Тиса [20, 21].

Зразки рослин відбирали на українській території на березі р. Тиса в околицях сіл Буштино, Крива та заплавах в околицях м. Виноградovo Закарпатської області. На угорській території роботу проводили на березі р. Тиса в околицях м. Домбрад. Вміст ВМ (Cu, Zn, Pb, Cd, Mn, Fe) у рослинах визначали із застосуванням сухої мінералізації в муфельній печі при температурі +450 °C з наступним розчиненням у суміші азотної кислоти й дистильованої води у співвідношенні 1 : 1 [8, 9]. Метали визначали атомно-абсорбційним методом на спектрофотометрі С115М1 у пропан-бутановому полум'ї з використанням дейтерієвого коректора неселективної абсорбції.

Для виявлення стану води в рослинах визначали відносний вміст води (BBV) і водний потенціал (ВП) в органах Золотушника звичайного та Стенактиса однорічного. Для визначення BBV частини рослини негайно після відділення зважували (маса сирої речовини) і поміщали в колби з водою ємністю 0,5 л для регідратації протягом 12 год до повного насичення при +4 °C, поверхнево висушували фільтрувальним папером і переважували (маса насичення). Після цього зразки висушували при +105 °C протягом 1 год та при +71 °C протягом наступних 48 год і знову зважували (маса сухої речовини) [17]. Масу сухої речовини визначали ваговим методом після висушування в сушильній шафі при температурі +105 °C. Відносний вміст води визначали за формулою: $BBV = (маса\ сирої\ речовини - маса\ сухої\ речовини) / (маса\ насичення - маса\ сухої\ речовини)$.

Водний потенціал визначали рефрактометричним методом [3]. Для цього готували у пробірках по 2 мл розчинів сахарози різних концентрацій (0,1–0,7 моль/л), в які поміщали по 10 висічок з листків, витримували протягом 90–120 хв періодично струшуючи. Для визначення концентрації розчину сахарози після перебування в ньому рослинного матеріалу використовували рефрактометр УРЛ-1. На призму рефрактометра наносили дві краплі вихідного, а потім відповідного дослідного розчину. Знаходили розчин, концентрація якого не змінювалась після перебування в ньому дослідних об'єктів. Величину ВП розраховували за формулою:

$$ВП = \psi_w = -RT \cdot c \cdot i.$$

Отримані результати досліджень статистично опрацьовували з використанням пакета комп'ютерних програм Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Геоботанічний аналіз рослин, які росли на досліджуваних заплавах ділянках і березі р. Тиса виявив домінуючі види трав'яника Золотушник звичайний (*Solidago virgaurea* L.) і Стенактис однорічний (*Stenactis annuus* Nees.).

Відомо, що в різних шарах ґрунтового розрізу міститься неоднакова кількість доступних для поглинання рослинами ВМ [9, 10]. Той горизонт, де зосереджена основна частина кореневих волосків, здатних до активної адсорбції речовин, зокрема ВМ, відіграє найбільшу роль у їхньому накопиченні. Разом з тим відомо, що в ґрунтах механізми трансформації техногенних потоків у малорухомі й недоступні для рослин форми діють лише в певних межах. Тому екологічна ситуація, що зумовлена техногенним впливом на ґрунти, може змінюватися від благополучної до катастрофічної [6].

Більша частина кореневої системи в обох видах рослин зосереджена на глибині 0–12 см від поверхні ґрунту [5].

Результати дослідження вмісту ВМ у рослинах показали, що відбувається накопичення ними значно більших кількостей Cu, Pb, Zn, Cd, Fe (табл. 1) порівняно з ГДК, прийнятих в Україні [6], та тих, які наводять як середні в рослинності суші [4, 7, 11]. В усіх локалітетах виявлено значне перевищення рівнів ГДК для кадмію та свинцю. У локалітетах м. Домбрад та м. Виноградovo виявлено також значне перевищення ГДК для цинку в рослин. Тому дані види рослин можна вважати концентраторами кадмію, свинцю та цинку.

Таблиця 1. Вміст солей важких металів у біомасі рослин, мкг · г маси сухої речовини

Вид рослин	Cu	Pb	Zn	Cd	Mn	Fe	Локалітет
<i>Solidago virgaurea</i> L.	8,5	≤ 2	46,3	0,27	16	74,7	м. Домбрад
	8,8	1,2	25,6	0,07	26,7	117,3	с. Крива
	9,2	3,9	32,7	0,20	16,9	129,8	Околиці м. Виноградovo
<i>Stenactis annuus</i> Nees	11,7	< 2	61,3	0,67	6,5	149,4	м. Домбрад
	5,5	1,2	24,1	0,18	30,1	100,5	с. Буштино
	6,9	< 5	39,6	0,14	12,8	267,9	Околиці м. Виноградovo

Необхідно зазначити, що вміст елементів у рослинності суші за даними різних авторів досить відрізняється [4, 6, 7, 11], особливо щодо свинцю та кадмію. ГДК для досліджуваних елементів у їстівних частинах рослин також відрізняється від вмісту їх у рослинності суші.

Серед ВМ, котрі були досліджені, кадмій і свинець належать до тих, необхідності яких для живих організмів не виявлено [19]; мідь, цинк, марганець і залізо – до необхідних, якщо вміст їх не перевищує певних значень [10]. Отже, рослини в досліджених локалітетах мають підвищений вміст ряду ВМ. Незважаючи на це, рослина даного виду домінувала в усіх досліджених локалітетах. Це свідчить про їхню стійкість не лише до одного, але й до групи металів. За дії на рослини надмірних кількостей ВМ у них виникає стрес. Очевидно,

існують механізми, які дають можливість рослинам здійснювати повний фізіологічний цикл розвитку в зазначених умовах. Адаптація до стресу – метаболічно активний процес, значною мірою зумовлений ступенем обмінюваності й перерозподілу різних пулів води в клітині [16]. Відомо, що рослини промислових районів характеризуються меншою обводненістю тканин [12], а особливості перебування в спокої, здатність регулювати швидкість росту, значення водного потенціалу листка та водний потенціал кореня є показниками, які варіюють залежно від інших обставин разом з концентрацією ВМ [18]. Відомо також, що водний дефіцит може спостерігатись у рослин, які ростуть з достатньою кількістю води в ґрунті [18]. Тому нами було вивчено стан води в досліджуваній рослині. BBV у надземних і підзе-

мних органах значно відрізнявся залежно від місця збирання (табл. 2). У листках і коренях *Solidago virgaurea* L., які зростали у відносно чистих ділянках сіл Велятино

та Груково [14, 15] відносний вміст води у 3–8 разів вищий, ніж у тих, що зростали в забрудненій ділянці (м. Домбрад).

Таблиця 2. Відносний вміст води в органах рослин з приуслових ділянок р. Тиси, %

Місце збирання	<i>Solidago virgaurea</i> L.	
	Листки	Корені
м. Домбрад	61,28	24,84
с. Велятино	7,38	9,86
с. Груково	8,75	9,20

У іншого досліджуваного виду – *Stenactis annuus* Nees відмінностей у ВВВ було значно менше. Водний потенціал рослин також значно відрізнявся в досліджуваних видів, а також залежно від місця зростання (табл. 3). Так, у коренів, стебел і листків *Solidago virgaurea* L. водний потенціал був однаковим, якщо вони були з одного місця зростання. Однак значення ВП із забруднених

ділянок було суттєво нижчим, ніж з відносно чистих. ВП *Стенактиса* однорічного відрізнявся значно менше щодо місця зростання, однак його значення були нижчими, ніж у *Золотушника* звичайного.

Крім того, у рослин з околиць сіл Велятино та Груково корені мали вищий водний потенціал порівняно щодо стебел і листків.

Таблиця 3. Водний потенціал в органах рослин з приуслових ділянок р. Тиси, МПа

Місце збору	<i>Solidago virgaurea</i> L.		
	Листки	Корені	Стебла
с. Велятино	– 1,007	– 1,007	– 1,007
с. Груково	– 0,991	– 0,991	– 0,991
м. Домбрад	– 1,343	– 1,343	1,343

Вважають, що ВП в межах – 0,2 ...–1,3 МПа відповідають достатньому або оптимальному рівню вологозабезпечення рослин. При жорсткому дефіциті вологи ВП може знижуватись до –1,4 і нижче. ВП досліджуваних видів не виходив за ці межі.

Одержані результати свідчать, що домінуючі види на забруднених ґрунтах зберігають високий ВП, високий ВВВ і тому зберігають здатність до активного розвитку й розмноження. Отже, рослини *Solidago virgaurea* L. та *Stenactis annuus* Nees стійкі до одночасної дії різних солей важких металів: кадмію, свинцю, цинку. Їх можна також вважати концентраторами кадмію, свинцю та цинку. Поглинання і накопичення даним видом важких металів залежить від рівня забруднення ґрунту, його типу та рН.

1. Бойко Н.В., Чонка І.І., Чонка І.А. та ін. // Наук. вісн. УжНУ. Сер. Біологія. – 2000. – № 8. – С. 151–154. 2. Глазовская М.А. // Почвоведение. – 1994. – № 4. – С. 110–120. 3. Григорюк І.А., Ткачев В.І., Савинський С.В. і др. Методы исследования и способы оценки устойчивости растений к засухе и высокой температуре. – К., 1999. 4. Добровольский В.В. Свинец в окружающей среде. – М., 1987. 5. Добровичева Д.Н., Котов М.Н., Прокудин Ю.Н.

и др. Определитель высших растений Украины. – К., 1987. 6. Земельні ресурси України / За ред. В.В. Медведєва, Т.М. Лактіонової. – К., 1998. 7. Ильин В.Б. Элементарный химический состав растений. – Новосибирск, 1985. 8. Костишин С.С., Руденко С.С., Дмитрук Ю.М., Курек С.І. // Физиология и биохимия культур. растений. – 1995. – Т. 28, № 4. – С. 115–123. 9. Методические рекомендации по проведению полевых и лабораторных исследований почв и растений при контроле загрязнения окружающей среды металлами. – М., 1981. 10. Мур Д.В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. – М., 1987. 11. Перельман А.И. Геохимия ландшафта. – М., 1989. 12. Тарабрин В.П. Физиология устойчивости древесных растений в условиях загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами // Микроэлементы в окружающей среде. – К., 1990. – С. 17–19. 13. Торохтин М.О., Добей В.О. // Наук. вісн. УжНУ. Сер. Біологія. – 2000. № 9. – С. 349–350. 14. Торохтин М.О., Рошко В.Г. // Наук. вісн. УжНУ. Сер. Біологія. – 2003. – № 13. – С. 96–97. 15. Чонка І.І., Бойко Н.В. // Наук. вісн. УжНУ. Сер. Біологія. – 2002. – № 11. – С. 101–104. 16. Шматько І.Г., Григорюк І.А., Шведова О.Е. Устойчивость растений к водному и температурному стрессам. – К., 1989. 17. Barrs H.D., Weatherley P.E. // Austr. J. Biol. Sci. – 1962. – Vol. 15. – P. 413–428. 18. Barcelo J., Poschenrieder Ch. // J. of Plant Nutrition. – 1990. – Vol. 13, № 1. – P. 1–37. 19. Olendzysky K., Anderberg S., Bartrick J. et al. // Environ. Rev. – 1996. – Vol. 4, № 3. – P. 300–320. 20. Plohmman B., Bader G., Hiller K., Franz G. // Pharmazie. 1997. – Vol. 52, № 13. – P. 953–957. 21. Thiem B., Goslinska O. // Fitoterapia. – 2002. – Vol. 73, № 6. – P. 514–516.

Надійшла до редколегії 12.09.04

Наукове видання



ВІСНИК

КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

БІОЛОГІЯ

Випуски 45-46

Редактор В. Філь
Верстка Г. Пластуненко

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"

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: 01033, Київ, 6-р Тараса Шевченка, 14, кімн. 43. ☎ (38044) 239 3172, 239 3222; факс 239 3128



Підписано до друку 20.12.10.05. 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. № 25-3066.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01033, Київ, 6-р. Т. Шевченка, 14, кімн. 43,
☎ (38044) 239-3222; (38044) 239-3172; факс (38044) 239-3128.
e-mail: vydav_poligraph@univ.kiev.ua
<http://vpc.univ.kiev.ua>

Kyiv National Taras Shevchenko University