

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДІНА

УКРАЇНСЬКИЙ БІОХІМІЧНИЙ ЖУРНАЛ

Науково-теоретичний журнал
Засновано акад. О. В. Палладіним 1926 р.
Виходить один раз у два місяці

УКРАИНСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
THE UKRAINIAN BIOCHEMICAL JOURNAL

Том № 82, № 4 (додаток 1), 2010

Київ

Матеріали X Українського біохімічного з'їзду 13-17 вересня 2010 р., м.Одеса

Зміст

Пленарні доповіді	4
I. Структура, властивості та функції біологічних макромолекул і надмолекулярних комплексів	
Доповіді	16
Стенові повідомлення	48
II. Регуляція метаболічних та клітинних функцій	
Доповіді	119
Стенові повідомлення	151
Алфавітний покажчик	260

За організаційну та фінансову підтримку в підготовці і проведенні X Українського біохімічного з'їзду та за публікацію матеріалів з'їзду Українське біохімічне товариство висловлює щирю подяку:

- Національній академії наук України (НАНУ),
- Міністерству освіти і науки України,
- Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
- Одеському національному університету ім. І. І. Мечникова,
- Національному університету природних ресурсів і природокористування України,
- Федерації європейських біохімічних товариств (FEBS),

- ЗАТ «МАКРОХІМ», Україна
- Компанії BIO-RAD лабораторії, США-Україна
- Тов. ALSI Chrom ЛТД, Україна
- Тов. ALSI ЛТД, Україна
- Компанії HVD - Life Sciences, Україна
- ООО Baltic Bio Trade, Литва-Україна
- Директору ПП СП «Біла акація», д.м.н., проф. Колоденку В. О.

Шановні колеги!

Сердечно вітаю учасників X з'їзду Українського біохімічного товариства! Наш з'їзд проходить в Одеському національному університеті ім. І. І. Мечникова – одному із найстаріших і найкращих університетів нашої країни. Цей навчальний і науковий заклад славний ще й тим, що в його історію багато яскравих сторінок вписали всесвітньо відомі вчені – природознавці, серед яких неможливо не згадати імена лауреата Нобелівської премії, мікробіолога Іллі Ілліча Мечникова; засновника вітчизняної фізіології Івана Михайловича Сеченова; біолога Олександра Онуфрійовича Ковалевського, аж трьох президентів нашої Академії наук (ВУАН – АН УРСР): ботаніка Володимира Іполитовича Липського, мікробіолога Данила Кириловича Заболотного, патофізіолога Олександра Олександровича Богомольця та багатьох інших, які свого часу працювали у цьому університеті і заклали підвалини аби Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова став загально визнаним культурним надбанням України. Щиро дякуємо керівництву цього провідного навчального і наукового центру із наданою можливістю провести наш з'їзд в Одесі, а співробітників Університету за допомогу в організаційних питаннях.

X Український біохімічний з'їзд знаменний тим, що він проводиться у ті дні, коли наукова громадськість України відзначає 125-і роковини від дня народження всесвітньо відомого українського вченого, засновника функціональної біохімії і нейрохімії, фундатора і незмінного впродовж майже півсторіччя директора Інституту біохімії НАН України, Президента Академії наук УРСР у важкі повоєнні часи, нарешті, – засновника Українського біохімічного товариства - академіка Олександра Володимировича Палладіна, пам'яті якого і присвячується це високе наукове зібрання.

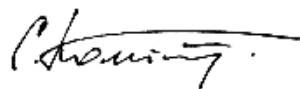
Безперечно, у час бурхливого прогресу біохімії та молекулярної біології X Український біохімічний з'їзд має стати значною подією в науковому житті України і не тільки України. В роботі з'їзду беруть участь науковці із Росії, Польщі, Франції, Німеччини, Фінляндії, інших країн. Тобто Українські біохімічні з'їзди набувають міжнародний статус. Знаменним є той факт, що серед вітчизняних науковців, які виявили бажання брати участь у з'їзді, понад 50% – молоді вчені. Це свідчить про поступове відродження у молоді інтересу до науки і особливо до наук про інтимні механізми живого. Програма з'їзду охоплює широкий спектр фундаментальних і прикладних аспектів біохімії, молекулярної і клітинної біології. У Програмі з'їзду – 4 пленарних і 12 симпозіальних засідань (5 секцій), на яких будуть розглянуті проблеми дослідження структури і функції білків, нуклеїнових кислот, експресії генів, регуляції метаболічних шляхів тощо. Особливу увагу буде приділено сучасним проблемам нанобіотехнології, біобезпеки і біозахисту. Сучасні аспекти проникнення біохімії у молекулярну медицину будуть розглянуті на секції «Медична біохімія». Значну увагу буде приділено питанням вдосконалення фахової підготовки вітчизняних наукових кадрів всіх рівнів кваліфікації.

Завдання українських біохіміків полягає в тому, щоб зробити свій достойний внесок до сучасної біологічної науки, а також використати здобутки світової науки на благо народу України.

Від імені Президії Українського біохімічного товариства бажаю вам успіхів у вашій роботі і хай вам всім щастить!

Зі щирою повагою

Президент Українського біохімічного товариства
Директор Інституту біохімії
ім. О. В. Палладіна НАНУ
академік НАН та АМН України



Сергій Комісаренко

ПЛЕНАРНІ ДОПОВІДІ

ВІДКРИТТЯ, ВИВЧЕННЯ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ N-АЦИЛЕТАНОЛАМІНІВ – НОВОГО КЛАСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ЛІПІДІВ

ГУЛА Н. М.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua*

У 1980–1990-х роках у відділі біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна було розроблено та запроваджено системний підхід щодо вивчення хімії та функціональної ролі ліпідів, а також створено передумови для системного дослідження ліпідому ссавців та людини.

Відкрито та охарактеризовано в культурі клітин нейробластоми C1300 N18 малополярні ліпіди – N-ацилфосфатидилетаноламін (NAPE) та N-ацилетаноламін (NAE), встановлено позарецепторний механізм дії та біологічна роль цих сполук. Виявлено мембраностабілізуючі, антиоксидантні властивості NAE. Відкрито їхню кардіопротекторну дію та створено на основі їх кардіопротекторний фармакологічний препарат, який зараз впроваджується у виробництво на ВАТ «Фармак». Встановлено гепатопротекторні властивості NAE. Показана можливість застосування їх у розчинах-консервантах для зменшення деструктивних змін та підвищення життєздатності ізольованих органів. Відкрито нейропротекторну дію NAE та знайдено зменшення споживання наркотику у щурів-морфіністів, що отримували NAE.

Вперше показана взаємодія N-стеароїлетаноламіну (NSE) із сигнальною системою оксиду азоту. Одержано дані про здатність насиченого NAE модулювати утворення оксиду азоту за різних патологічних станів організму, зокрема здійснювати різноспрямований вплив на активність конститутивної та індукційної ізоформ NO-синтази. Встановлено здатність N-пальмітоїлетаноламіну спрямовано та вибірково моделювати активність мембранозв'язаних Ca²⁺-транспортувальних систем клітин.

З'ясовано, що NAE беруть участь у регуляції функції кори надниркових залоз. Встановлено, що NSE модулює рівень 11-оксикортикостероїдів і, тим самим, впливає на перебіг стресової реакції організму. Виявлено протизапальний вплив NSE за реакцій гіперчутливості уповільненого та негайного типу та за неспецифічного запалення.

Відкриття нової ендоканабіноїдної сигнальної системи, до складу якої належать N-ацилетаноламіни, дозволило глибше зрозуміти механізми регуляції життєво важливих процесів і створило передумови для розробки нових засобів впливу на низку патологічних станів та створення нових лікарських препаратів.

**SH3-CONTAINING ADAPTOR PROTEINS:
THE ROLE IN CARCINOGENESIS***DROBOT L.*

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: drobot@biochem.kiev.ua*

Adaptors are proteins of multi-modular structure without enzymatic activity. Their capacity to organize large, temporary protein complexes by linking proteins together in a regulated and selective fashion makes them of outstanding importance in the establishment and maintenance of specificity and efficiency in all known signal transduction pathways. Given the important role of adaptor proteins in propagating cellular signals, it is quite likely that their dysfunction may be involved in carcinogenesis. The protooncogenic or tumor-suppressor activities of a set of adaptor proteins have been already demonstrated.

The adaptor/scaffold protein Ruk/CIN85, containing multiple SH3 domains, was implicated in carcinogenesis by influencing a number of processes such as cell adhesion, motility and apoptosis. Although Ruk/CIN85 appears to modulate tyrosine kinase receptors and PI3 kinase signalling, the exact molecular mechanisms by which Ruk/CIN85 affects carcinogenesis are largely unknown. Using Western-blot analysis, the statistically significant increase in the expression level of Ruk/CIN85 full-length form was detected in human invasive ductal breast adenocarcinoma samples in comparison with surrounding conditionally normal tissues. Therefore, we decided to investigate the oncogenic potential of Ruk/CIN85 by overexpressing the full-length isoform in weakly invasive MCF-7 breast adenocarcinoma cells. The Ruk1/CIN85 overexpressing cells showed a slower growth rate, decreased cell adhesion, and an enhanced anchorage-independent growth in soft agar. Further, overexpression of Ruk1/CIN85 also affected EGF-dependent signalling: activation of both Akt and ERK1/2 was faster than in the control cells and both kinases remained in their active state for up to 30 min after EGF treatment. Transwell migration and wound healing assays revealed that Ruk1/CIN85 overexpressing cells possessed increased motility. The EGF-induced motility was attenuated in Ruk1/CIN85-overexpressing cells but could be restored upon knock-down of Ruk1/CIN85 with specific shRNA. Together, these findings suggest that high levels of Ruk1/CIN85 can modulate EGF-dependent signalling and contribute to the conversion of breast adenocarcinoma cells into a more malignant phenotype.

СТРАТЕГІЯ ВИКОРИСТАННЯ МУТАНТНИХ ГЕНІВ ТУБУЛІНУ ЯК СЕЛЕКТИВНИХ МАРКЕРІВ У ГЕНЕТИЧНІЙ ІНЖЕНЕРІЇ РОСЛИН

ЄМЕЦЬ А. І., БЛЮМ Я. Б.

*Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ;
e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net; alyemets@univ.kiev.ua*

Запропоновані шляхи використання нових маркерних генів для селекції трансформованих клітин рослин, що базуються на використанні мутантних генів тубуліну із природних біотипів та індукованих мутантів рослин, а, в перспективі, і вкорочених генів тубуліну, здатних забезпечувати у разі трансформації рослин синтез молекул тубуліну зі стійкістю до тих чи інших сполук з антимікротрубочковою активністю. Узагальнені результати власних досліджень, пов'язаних із вивченням перенесення та експресії генів мутантного β -тубуліну, що забезпечують стійкість до фосфоротіоамідних та динітроанілінових гербіцидів, від відповідних мутантів *Nicotiana plumbaginifolia* до близькоспоріднених та віддалених видів рослин шляхом соматичної гібридизації. Саме ці роботи, продемонструвавши можливість використання мутантних генів тубуліну в селекції соматичних гібридів, стали відправною точкою для подальшої розробки стратегії використання таких генів як селективні маркери в генетичній інженерії рослин. У подальшому ця технологія була нами розвинута з використанням гена мутантного α -тубуліну гусячої трави (*Eleusine indica* L.), котрий визначає стійкість до динітроанілінів. Внаслідок розробки схем агробактеріальної і біолістичної трансформації низки однодольних та дводольних рослин векторними конструкціями, що містять вищезгаданий ген α -тубуліну, була продемонструвана можливість його використання як маркерного гена. Одержані результати дозволяють також дійти висновку, що використання вже відомих мутантних генів тубуліну зі стійкістю до динітроанілінів та фосфоротіоамідів може паралельно вирішити проблему одержання нових ліній трансгенних рослин, резистентних до цих класів гербіцидів. Останнє і було продемонстровано на прикладі льону, сої, тютюну та пальчастого проса.

МОЛЕКУЛЯРНА ДИНАМІКА І ФУНКЦІЯ ПРОТЕЇНІВ

КОРНЕЛЮК О. І.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: kornelyuk@imbg.org.ua*

Молекулярна динаміка протеїнів спричинює специфічні конформаційні зміни їхньої просторової структури, які обумовлюють їхні функції. Для дослідження конформаційної рухливості протеїнів широко використовуються експериментальні методи дослідження, в першу чергу флюоресцентна спектроскопія та мультимірна ЯМР-спектроскопія. В останні роки інтенсивно розвиваються методи комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки (МД), які дають унікальну інформацію про динамічну поведінку протеїнів. Застосування потужних

суперкомп'ютерів для розрахунків МД біологічних макромолекул суттєво розширює можливості комп'ютерної структурної біології. Нові перспективи для моделювання динаміки протеїнів відкривають комп'ютерні ґрид-технології.

Створено віртуальну лабораторію MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>) як складову частину української академічної ґрид-інфраструктури для проведення моделювання структури протеїнів та розрахунків МД. Впроваджено інтегроване середовище для автоматизації комп'ютерних розрахунків та створено веб-портал, який складається з розрахункового, аналітичного і навчального блоків та бази даних траєкторій молекулярної динаміки. У віртуальній лабораторії MolDynGrid проводиться моделювання молекулярної динаміки таких протеїнів, як тирозил-тРНК-синтетаза, цитокін ЕМАР II, ВІЛ-протеаза та їхніх комплексів із лігандами. Вивчено структурно-динамічні характеристики тирозил-тРНК-синтетази в наносекундному часовому інтервалі та проведено кореляцію з експериментальними даними. Аналіз конформаційної рухливості цитокіну ЕМАР II в розчині на основі даних молекулярної динаміки виявив значні конформаційні флуктуації α -спіралі (Ile124-Gln129) та сусідньої петлі (Lys116-Lys123) з утворенням додаткового витка спіралі в РНК-зв'язуючому центрі. Вперше розшифровано просторову структуру цитокіну ЕМАР II в розчині методами мультимірної ЯМР-спектроскопії та проведено аналіз динаміки протеїну. Виявлено високу конформаційну рухливість цитокінового мотиву Arg8-Thr18 та його значна експонованість у розчин порівняно з кристалографічною структурою ЕМАР II.

Функціональна динаміка протеїнів характеризується наявністю корельованих конформаційних рухів. Для аналізу корельованих рухів розроблено алгоритми порівняння карт різниць динамічних крос-кореляційних матриць, побудованих на основі комп'ютерних розрахунків МД. Встановлено існування динамічних структурних сіток у протеїнах, які забезпечують передачу конформаційних сигналів.

Проведено комп'ютерне моделювання просторової структури та динаміки мутантних форм тирозил-тРНК-синтетази, пов'язаних з нейропатією Шарко–Марі–Тус. Для мутантної форми протеїну з мутацією Glu196Lys безпосередньо поблизу інтерфейса димеру ензиму встановлено формування нової антипаралельної β -структури в неструктурованій ділянці між α -спіралями Н9 і Н10, що може призводити до неспецифічної агрегації мутантної тирозил-тРНК-синтетази.

АТР-ГІДРОЛАЗИ ТА КАЛІКСАРЕНИ

КОСТЕРІН С. О.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua*

Одна з нагальних задач сучасної біофізичної та супрамолекулярної хімії – створення ефекторів нового покоління, які б мали здатність оборотно, високоафінно та селективно модифікувати функціональну активність ензиматичних, транспортних, рецепторних та регуляторних протеїнів. У цьому аспекті в останні роки значну увагу дослідників привертають циклічні олігомери фенолів – каліксарени, для яких продемонстровано широкий спектр біологічної активності. У комплексних

дослідженнях, проведених відділом біохімії м'язів ІБХ спільно з відділом хімії фосфоранів (зав. — чл.-кор. НАНУ В.І.Кальченко) ІОХ НАНУ, було вивчено закономірності впливу низки калікс[4]аренів на Mg^{2+} -залежні АТР-гідролазні системи міометрія. Виявилося, що каліксарен С-91 (тут і далі наведено шифр) стимулює протонифорчутливе накопичення іонів Са в мітохондріях, але практично не впливає на активність тапсигаргінчутливої кальцієвої помпи саркоплазматичного ретикулуму та кальцієвої помпи плазматичної мембрани. Каліксарени С-97, С-99 та С-107 значно ефективніше, ніж убаїн, інгібують активність Na^+, K^+ -АТР-ази, практично не впливаючи на активність «базальної» Mg^{2+} -АТР-ази плазматичної мембрани. Ці каліксарени також стимулюють інгібувальний ефект убаїну на Na^+, K^+ -АТР-азу. Каліксарен С-150 (суто калікс[4]аренова «чаша») практично не впливає на активність Na^+, K^+ -АТР-ази. Було доведено, що інгібуючий вплив каліксарену С-107 на Na^+, K^+ -АТР-азу (константа інгібування $K_i < 100$ нМ) визначається взаємним дистальним розташуванням амінофосфонових груп у положеннях 5,17 на верхньому вінці калікс[4]аренової «чаші», на відміну від каліксарену С-160, який не інгібує АТР-гідролазну активність і для якого є властивою локалізація цих груп у положеннях 5,11. Продемонстровано, що однією з причин інгібуючої дії зазначених каліксаренів на Na^+, K^+ -АТР-азу є зменшення спорідненості іонів Na до неї. Результати, що були одержані у порівняльних експериментах із каталітичного титрування каліксаренами С-97 та С-99 АТР-ази субфрагмента-1 міозину та Na^+, K^+ -АТР-ази, вказують на значно більшу (на 3 порядки) чутливість Na^+ -помпи до цих ефекторів порівняно з АТР-азою скоротливого комплексу. Інгібуючий ефект каліксарену С-99 на АТР-азну активність субфрагмента 1 корелює із впливом зазначеного ефектора на спорідненість іонів Mg^{2+} до субфрагмента. Із використанням методології молекулярного докінгу було вивчено взаємний вплив АТР та каліксарену С-99 на орієнтацію даних лігандів у лігандзв'язуючому центрі високоочищеного субфрагмента-1. Продемонстровано, що за використання методології молекулярного докінгу можлива ідентифікація ліганд-рецепторних комплексів, геометрія яких узгоджена з експериментальними даними.

Було також доведено, що каліксарен С-107 є комплексоутворювачем для АТР і як такий здатний до гідролізу цього нуклеозидтрифосфату. Ми дослідили властивості реакції каліксарен-індукованого гідролізу АТР (кінетика та енергетика, катіонна та субстратна специфічність, чутливість до дії фізико-хімічних факторів — іонної сили, в'язкості, рН тощо).

Обговорюються механізми дії калікс[4]аренів на процеси ензиматичного та неензиматичного гідролізу АТР. Зроблено висновок щодо перспективності використання вищезазначених калікс[4]аренів як «молекулярних платформ» для створення високоефективних селективних інгібіторів транспортних та нетранспортних АТР-гідролаз, подальшого вивчення молекулярних механізмів ензиматичного гідролізу АТР.

ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ В РОСЛИННИЦТВІ УКРАЇНИ

СИВОЛАП Ю. М.

Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України, Одеса;
e-mail: genome 2006@mail.ru

Сучасні біотехнології сприяли значному підвищенню ефективності рослинництва в багатьох країнах світу. Генномодифіковані рослини у 2009 році займали площу в 134 мільйони гектарів, а використання молекулярних (геномних) маркерів за даними A. Binder (2003) дає прибуток біля 15 мільярдів доларів щорічно.

Проблема розробки генно-інженерних технологій, створення і використання ГМО в Україні чекає на вирішення. Проте завдяки впровадженню технології визначення молекулярно-генетичного поліморфізму за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) набули поширення ДНК-маркери. Генеровані внаслідок ПЛР маркери поділяються на дві групи: полілокусні, біалельні, домінантні (RAPD, ISSR, IRAP, REMAP та ін.) і монолокусні, поліалельні, кодомінантні (SSR). В залежності від поставленої задачі використовується той чи інший варіант ПЛР аналізу.

Для визначення філогенетичних взаємовідносин між видами культурних рослин і їхніми дикими сородичами, які є донорами агрономічно важливих ознак, переважно використовуються багатолокусні маркерні системи. Так, в ПБЦ уточнена систематика родів *Hordeum*, *Helianthus*, *Triticum*, *Sorghum*, *Vitis*, *Humulus* та ін., що дало змогу цілеспрямованіше використовувати віддалену гібридизацію. За допомогою багатолокусних маркерів марковано гени стійкості соняшника до вовчка, кукурудзи до фузаріозу, одержано ДНК-маркери для продуктів інтрогресії у генотипах м'якої пшениці, які несуть ген (гени, алелі) стійкості до фітопатогенів, перенесених від егілопсу до пшениці. Визначено ДНК-маркер гена стійкості пшениці до твердої сажки. Марковані гени типу і темпу розвитку та ін. Значний інтерес має визначення алелів генів, що пов'язані з біохімічними показниками зерна. В ПБЦ досліджено поліморфізм генів *Wx* у селекційних форм пшениці із блокованим синтезом амілопектину, визначений алельний стан гена.

Аналізований алельний стан гена *β -amy1* у пивоварних і зернових сортів ячменю, встановлено алельну характеристику пуроіндолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* для сортів м'якої пшениці. Досліджено гени короткостебловості *Rht8*, *Rht-B1* і *Rht-D1*, оцінено ефекти алелів гена *Rht8* за агрономічними ознаками для низки українських сортів м'якої пшениці. Встановлено, що сорти м'якої пшениці СГІ досить часто містять комплекс або, так звану, піраміду генів карликовості — *Rht8c*, *Rht-B1b*, *Rht-D1b*.

Створення молекулярних маркерів відкрило перспективи для розробки ефективних методів диференціації й ідентифікації генотипів, встановлення генетичної чистоти ліній, віднесення рослин до того або іншого гібрида, визначення рівня гібридності партій насіння першого покоління та ін.

Методи типування генотипів, які базуються на профілюванні ДНК — це нові підходи до сортової ідентифікації, що мають значні переваги порівняно із традиційним морфологічним аналізом. Визначення сортів за допомогою ДНК-технології незрівнянно продуктивні, дають можливість об'єктивної оцінки даних, тестування

на всіх етапах онтогенезу і мають інші переваги порівняно із традиційними методами, заснованими на фенотиповому аналізі. В ПБЦ розроблено оригінальну технологію ідентифікації і реєстрації сортів рослин у вигляді генетичних формул, які відбивають алельний стан високо варіабельних мікросателітних локусів. Формула надає інформацію про генетичну структуру сорту, наявність алелів агрономічно важливих генів.

Завдяки сучасним біотехнологіям і, зокрема, ДНК-технологіям теорія і практика поліпшення корисних властивостей рослин вийшли на новий рівень.

РОЛЬ СИГНАЛЬНИХ КАСКАДІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ЛІМФОЦИТІВ

СИДОРЕНКО С. П.

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: svitasyd@yahoo.com*

Механізми диференціювання клітин базуються на передачі сигналів у клітинах. Сигнальні каскади, що беруть участь у регуляції диференціювання клітин можуть бути індуковані ростовими факторами, міжклітинними контактами та взаємодією з міжклітинним матриксом. Крім того, в реалізації диференціювання клітин важлива роль належить асиметричному поділу клітин. Сигнальні каскади здійснюють передачу інформації від поверхневих рецепторів клітин до ядра шляхом каскадів посттрансляційних модифікацій протеїнів. Ключова роль сигнальних каскадів клітин полягає у контролі транскрипційних програм в ядрі. Координовані зміни транскрипційних регулонів забезпечують диференціювання клітин та їхню функціональну активність.

Регуляція процесів диференціювання, проліферації, анергії та апоптозу лімфоцитів здійснюється завдяки інтеграції сигналів від ендогенних факторів та рецепторів, що забезпечують природний та адаптивний імунітет. Антигенрозпізнаючий рецептор В-клітин (BCR) є ключовим регулятором диференціювання В-клітин. Кооперація BCR з CD40, BAFFR, TACI та BCMA, що належать до родини TNF-рецепторів забезпечує регуляцію диференціювання В-клітин при адаптивній імунній відповіді. Більше того, вони координують утворення зародкових центрів та переключення класів імуноглобулінів. Нами було з'ясовано особливості активації ERK1, JNK, p38 MAPK, Akt/PKB та PKD2 сигнальних каскадів через BCR, CD40 та CD150 у первинних В-клітинах людини. Особливе місце в регуляції процесів диференціювання В-клітин займають фактори транскрипції родини IRF та NF-каппаВ. Було показано, що в нормальних та злоякісно трансформованих В-лімфоцитах сигнали через BCR, CD40 та CD150 регулюють рівень експресії, активності та внутрішньоклітинної локалізації факторів транскрипції IRF4 та NF-каппаВ.

Визначення нових молекулярних маркерів, які можуть бути використані для оцінки рівня диференціювання нормальних та злоякісно трансформованих лімфоцитів, і розробка нових підходів до регуляції диференціювання, проліферації та апоптозу нормальних та злоякісно трансформованих лімфоїдних клітин сприя-

тиме вдосконаленню методів діагностики лімфоїдних форм лейкозів та лімфом, визначенню прогнозу перебігу захворювання, що у свою чергу слугуватиме підвищенню ефективності індивідуалізованої терапії і оптимізації економічних аспектів лікування хворих.

БІОСЕНСОРИ – АНАЛІТИЧНІ ПРИЛАДИ НОВОГО ПОКОЛІННЯ

СОЛДАТКІН О. П.

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
e-mail: a_soldatkin@yahoo.com*

Впродовж двох останніх десятиліть спостерігається посилений інтерес до розвитку біоаналітичних пристроїв для кількісного та якісного визначення і моніторингу різноманітних біологічних і хімічних сполук. Ця презентація є підсумком наших 20-річних досліджень у галузі розробки біосенсорів на основі іммобілізованих ферментів та електрохімічних перетворювачів для аналізу субстратів і інгібіторів. У розроблених біосенсорах застосовуються такі електрохімічні перетворювачі, як іон-селективні польові транзистори (ІСПТ), планарні кондуктометричні гребінчасті електроди та амперометричні мікроелектроди. Висока специфічність, чутливість, проста конструкція, швидка і дешева процедура вимірювання речовин, притаманні створеним приладам, зумовлюють перспективність їхнього застосування в медицині, біотехнології, сільському господарстві, а також для контролю довкілля і якості харчових продуктів.

Розроблено низку біосенсорів для кількісного визначення таких субстратів, як лактат, глутамат, ацетилхолін, холін, D-серин, АТФ, сечовина, пеніцилін, формальдегід, креатинін і т. ін., виготовлено їхні лабораторні прототипи. На одному із конкретних біосенсорів буде продемонстровано весь шлях розробки приладу.

Покращання аналітичних характеристик розроблених біосенсорів досягли завдяки використанню диференціального режиму вимірювань, застосуванню розчинів із різними буферними ємностями і специфічними хімічними агентами, негативно або позитивно зарядженими додатковими мембранами та генетично модифікованими ензимами. Такі підходи уможливили зменшення впливу буферної ємності на відгук біосенсорів, підвищення їхніх чутливості й стабільності, розширення динамічного діапазону.

На основі зворотніх та/або незворотніх реакцій інгібування ензимів було сконструйовано біосенсори для аналізу різних токсичних речовин, таких як орґанофосфорні пестициди, іони важких металів, гіпохлорити, глікоалкалоїди тощо. Розроблено потенціометричний мультибіосенсор для визначення токсинів на основі інгібування ензимів.

Розглядаються переваги й недоліки розроблених біосенсорів, а також перспективи практичного використання їх.

**«SMART» MEDICINES: APPROACHES
AND ACHIEVEMENTS**

¹STOIKA R., ²ZAICHENKO A., ²MITINA N., ²SKOROKHODA T.,
²MOSKVIN M., ¹BILYY R., ¹KIT Yu., ¹BOIKO N., ¹PANCHUK R.,
¹FILYAK Ye., ¹SENKIV Ju., ¹SKOROKHYD N.

¹*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;*

²*Lviv National Polytechnic University, Ukraine;*

e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

The urgent problem of pharmacology is not in low bioactivity of the existing drugs, it is rather in low efficiency of drug delivery and its non-addressed action in the organism. Modern market needs efficient drug carriers rather than more active new drugs. Thus, specific bio-targeting drug carriers, carriers for delivery of water-insoluble drugs, for DNA and siRNA delivery (for biotechnology and gene therapy), remedies for visualization of drug delivery, action and clearance are currently most required. To address these requirements, novel functionalized nanocomposites (NC) were developed as a result of tight collaboration between the Department of Organic Chemistry at LNPU and the Department of Regulation of Cell Proliferation and Apoptosis at the ICB. The platforms for these NC were designed and synthesized on the basis of the polymeric surface-active oligoelectrolytes. The developed technology for the NC synthesis permits to control: 1) quality and quantity of structural blocks of the NC, and the unimodality of their size (1.5-6.0 kDa); 2) branching of the NC polymer chain at specific sites (if necessary); 3) providing the NC with active chemical groups (hydroxyl, carboxyl, amino, aldehyde, epoxy, others) for further functionalization; 4) covalent conjugation of specific bio-targeting molecules via these chemical groups. We used following bioactive elements: a) specific anticancer drugs, antibiotics, alkaloids; b) DNA of different size and siRNA; c) immunoglobulins and lectins; d) low molecular compounds (lipids, amino acids); e) polyethylene glycol. To make these NC detectable and measurable, fluorescent or luminescent, as well as super-paramagnetic or X-ray detectable compounds were also incorporated in the NC. Biocompatible NC possessing low toxicity towards mammalian cells *in vitro* and *in vivo* (mice) were created. They were applied in the form of micelle polymers or nanoparticles and used for delivery of: 1) drugs (ex. doxorubicine and levomycetin) at chemotherapy *in vitro* and *in vivo*; 2) DNA (transfection of mammalian, yeast and bacterial cells) and antisense oligodeoxynucleotides (blocking gene expression *in vitro* and *in vivo*); 3) protein antigens at animal immunization. Novel technologies were also developed for detecting and measuring apoptotic (dying) mammalian cells via recognizing specific cell surface glycoprotein(s) by means of specific lectin conjugated with the NC used in the form of nanoparticles. Lectin-functionalized super-paramagnetic nanoparticles were applied for targeted action towards human apoptotic cells (cell isolation and destruction). These and other ways of application of the developed NC and nanobiotechnologies are discussed.

These studies were partly supported by the STCU grants #1930, #4140, #4953.

МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ ТОЧНОСТІ ТРАНСЛЯЦІЇ ГЕНЕТИЧНОГО КОДУ

¹ТУКАЛО М. А., ¹ЯРЕМЧУК Г. Д., ¹КОВАЛЕНКО О. П., ¹БОЯРШИН К. С.,
¹КРИКЛИВИЙ І. А., ¹ГУДЗЕРА О. Й., ²КУСАК С. А.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
²Європейська молекулярно-біологічна лабораторія, Гренобль, Франція;
e-mail: mtukalo@imbg.org.ua

Точність трансляції генетичного коду забезпечується специфічним приєднанням аміноацил-тРНК синтетазами (АРС-азами) амінокислоти до гомологічної тРНК. Висока специфічність реакції аміноацилювання контролюється певними структурними елементами як тРНК так і АРС-ази, які забезпечують вірне впізнавання гомологічних субстратів (амінокислоти і тРНК) та дискримінацію проти зв'язування з негомологічними аналогами. Але в деяких випадках АРС-аза нездатна надійно дискримінувати амінокислоти з подібними структурами. Для забезпечення точності трансляції у цих АРС-аз були вироблені спеціальні механізми редагування помилок. У даній роботі ми вивчали молекулярні механізми впізнавання тРНК і механізми тРНК-залежного редагування помилок лейцил- та проліл-тРНК синтетазами, які належать до двох різних структурних класів, з використанням біохімічних, генно-інженерних методів та методу рентгеноструктурного аналізу. Лейцил-тРНК синтетаза із *Thermus thermophilus* (ЛейРСТТ) переважно впізнає елементи просторової структури тРНК^{Leu}. Порівняння кристалічних структур комплексів ЛейРСТТ-тРНК^{Leu} з різними субстратами і в різних конформаціях, дозволило прослідкувати динаміку участі тРНК^{Leu} в низці послідовних процесів, починаючи з приєднання її до ензиму, аміноацилювання, редагування та вивільнення лейцил-тРНК^{Leu} із комплексу. Спираючись на дані мутагенезу в редагувальному центрі ми припустили можливу участь у процесі корегування гідроксильних груп 3'-кінцевої рибози тРНК. Для перевірки цієї гіпотези було одержано деривати тРНК^{Leu}, що містили на 3'-кінці 2'dA76 або 3'dA76. Використання одержаних дериватів тРНК у реакціях аміноацилювання і редагування виявило важливу роль 3'-ОН групи залишка A76 тРНК^{Leu} в гідролізі лейцил-тРНК синтетазою помилково синтезованих продуктів. У разі проліл-тРНК синтетази (ПроРС) структура редагувального домену ПроРС *Enterococcus faecalis* слугувала платформою для інтенсивного мутагенезу з метою пошуку ключових елементів деацилювальної активності цього типу ензимів. На основі одержаних біохімічних і структурних даних запропоновано тРНК-залежний механізм гідролізу помилково синтезованих аміноацил-тРНК^{Pro}.

ІНТЕРСЕКТИНИ В РЕГУЛЯЦІЇ КЛІТИННИХ ПРОЦЕСІВ

ЦИБА Л. О., СКРИПКІНА І. Я., НІКОЛАЄНКО О. В.,
КРОПИВКО С. В., НОВОХАЦЬКА О. В., ДЕРГАЙ М. В.,
ДЕРГАЙ О. В., ГРЯЗНОВА Т. А., МОРДЕРЕР Д. Є., РИНДИЧ А. В.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: rynditch@imbg.org.ua

Адаптерні протеїни відіграють ключову роль у формуванні та регуляції сигнальних мереж клітини. Вони здатні одночасно взаємодіяти з багатьма протеїнами та координувати різні клітинні процеси, включаючи проліферацію, клітинну адгезію, міграцію, клітинний цикл та ін. Адаптерні протеїни родини інтерсектинів (ITSNs) формують комплекси з регуляторними протеїнами, задіяними у клатрин-опосередкованому ендоцитозі, передачі сигналу від рецепторних тирозин-кіназ, перебудовах актинового цитоскелета та апоптозі. Порушення експресії гена *ITSN1* асоційовані з виникненням ендоцитозних аномалій при синдромі Дауна та на ранніх стадіях хвороби Альцгеймера. Ген *ITSN2* розглядається як один з прогностичних маркерів при раку молочної залози.

Структурне та функціональне різноманіття родини інтерсектинів формується у хребетних за рахунок альтернативного сплайсингу, альтернативних промоторів та паралогічних генів (*ITSN1* та *ITSN2*). Нами виявлено 17 подій альтернативного сплайсингу пре-мРНК гена *ITSN1*, які впливають на доменну організацію відповідних білкових ізоформ *ITSN1*. Певні ізоформи *ITSN1* мають тканиноспецифічний характер, відрізняються за рівнем експресії під час ембріогенезу та за специфічністю взаємодії з білками-партнерами, що може вплинути на організацію комплексів *ITSN1* з протеїнами.

Використовуючи методи комп'ютерного передбачення та мас-спектрометричний аналіз, нами виявлено 11 нових протеїнів-партнерів *ITSN1* та *ITSN2*, а саме c-Cbl, Cbl-b, SHB, Ruk/CIN85, Sprouty 2, Reps1, SGIP1, WIP, MAP6, Sema6A та LMP2A. Виявлені протеїни беруть участь у передачі клітинного сигналу, формуванні актинового та тубулінового цитоскелета, ендоцитозі, клітинній адгезії та міграції, що вказує на можливу роль адаптерних протеїнів родини інтерсектинів у регуляції цих процесів. На моделі ембріонів *Xenopus laevis* показано участь *ITSN2* у регуляції координованих змін актинового цитоскелета під час раннього ембріонального розвитку хребетних. Розглядається також можливість участі *ITSN* в інвазії злоякісних клітин.

**I. СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ
ТА ФУНКЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ
МАКРОМОЛЕКУЛ
І НАДМОЛЕКУЛЯРНИХ
КОМПЛЕКСІВ**

ДОПОВІДІ

IRE1 IN GLIOMA ANGIOGENESIS AND INVASIVENESS

^{1,2}AUF GREGOR, ¹JABOUILLE ARNAUD, ¹GUÉRIT SYLVAINÉ, ¹PINEAU RAPHAËL,
³FAVEREAUX ALEXANDRE, ³MAITRE MARLÈNE, ⁴GAISER TIMO, ⁴VON DEIMLING
ANDREAS, ⁵MINCHENKO OLEKSANDR H., ³CHEVET ERIC, BIKFALVI ANDREAS,
¹MOENNER MICHEL

¹Talence, France;

²Charité, Virchow Medical Center, Humboldt University Berlin, Germany;

³Bordeaux, France;

⁴Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany;

⁵Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: m.moenner@angio.u-bordeaux1.fr

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary brain tumor (35-45%). Despite recent advances in brain research to develop new therapies, prognosis for affected patients is low and around 13 months. The rapid growth of these solid tumors generates micro-environmental changes in association to hypoxia, nutrient deprivation and acidosis. Under those ischemic conditions, tumor cells trigger an adaptive response and modulate the pro/anti-angiogenic balance to initiate the formation and attraction of new blood vessels to the tumor. The endoplasmic reticulum, a key organelle in the cellular response to ischemia, activates a complex set of signalling pathways named the Unfolded Protein Response (UPR).

Inositol Requiring Enzyme-1 (IRE1), one of it's a major sensor, is an endoplasmic reticulum resident integral membrane proteins that possess both intrinsic protein kinase and endoribonuclease activities in its cytosolic domain. To analyze the potential role of IRE1 in the angiogenic switch, we expressed in U87 glioma cells a total cytoplasmic IRE1 dominant negative (dn) transgene (U87dn cells) and an IRE1 endoribonuclease dominant negative transgene (U87 DRNase cells).

After brain implantation in immunodeficient mice, U87dn cells developed highly invasive and avascular tumors, whereas U87 control cells produced massive and highly vascularized tumors. This phenotypic change consistently links to striking overall survival (median survival of U87dn > 85 days vs. 26 days for controls; $P < 0.0001$). Laser capture microdissection analyses showed that the invasive/avascular phenotype correlated with the down-regulation of the pro-angiogenic factors interleukin-6, interleukin-8 and vascular endothelial growth factor-A and with the up-regulation of the anti-angiogenic factors SPARC (secreted protein, acidic, cysteine-rich; osteonectin) and decorin. Similar results were obtained using the chorio allantoic membrane model.

Our results suggest a major role of IRE-1 in the regulation of glioma angiogenesis and invasiveness and identify this protein as a potential therapeutic target for glioma treatment.

**GENE ONTOLOGY ANALYSIS OF PROTEIN-CODING
mRNAs WITH EXONIZED ALU REPEATS AND POTENTIAL
TARGETS OF ALU-DERIVED microRNAs**

BARANNIK T. V.

*V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine;
e-mail: tbarannik@univer.kharkov.ua*

ALU elements are the most abundant repeats in the human genome and are considered now to have the pronounced effect on gene expression and genome stability. ALUs that are exonized in UTRs may significantly influence on the translation regulation and mRNA stability by RNA editing, alternative splicing and sense-antisense interaction with small non-coding RNAs such as microRNA (miRNAs). The analysis of gene ontology (GO) terms for over- or under-representation in different gene sets is widely used for revealing their functional and structural links. So the bioinformatic resources were used in this study for analysis of GO enrichment and co-occurrence between gene sets. GO analysis was performed by modern on-line tools (GOStat, GOrilla, GOToolBox, GO Tree machine, DAVID, GeneCoDis). The gene list of mRNAs with exonized ALUs (mostly inserted in opposite direction in 3'UTR) was obtained by BLAST search through human Refseq mRNA database against ALU consensus sequence and the alignments with total score > 200 and E value < 10^{-50} were selected for analysis. The other set of genes included the potential targets of 3 types of miRNAs (hsa-mir-566; hsa-mir-619; hsa-mir-649) structurally derived from ALU-sequences as followed from microTranspoGene database. The list of genes targeted by selected miRNAs was obtained on miRWalk server that provided the sum of target predictions by 6 tools including PITA, TargetScan, miRDB, miRanda, RNAhybrid and miRWalk (gene targets predicted by at least 3 tools were chosen).

The overlap between targets of different miRNAs was found to be about 10% of full gene list and GO-enriched by 'regulation of transcription' and 'protein phosphatase activity'. The fraction of the genes revealed in both gene lists (about 15% of each gene set) was GO-enriched for 'G-coupled signaling' and 'membrane location' that might be linked to direct interaction with ALU-derived miRNAs. Both the targets of selected miRNAs and the genes with exonized ALU region were found to be GO-enriched for 'ATP synthesis' and 'catalytic activity' (mostly hydrolase). GO comparison between two gene sets revealed miRNA-targets to be involved in cell communication, morphogenesis and nervous system development while the representatives of ALU-embedded mRNAs were linked with metal ion (mostly zinc) binding and transcription regulation. Further analysis could elucidate the role of ALU-derived regions in the regulation of cellular functions.

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРОЛИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКОГО ТИПА

*БОЯРШИН К. С., КОВАЛЕНКО О. П., КРИКЛИВЫЙ И. А.,
ЯРЕМЧУК А. Д., ТУКАЛО М. А.*

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: kboyarshin@mail.ru*

Для обеспечения высокого уровня аминокислотной специфичности аминоацилирования тРНК ряд аминоацил-тРНК синтетаз (АРСа_з) нуждается в механизмах узнавания и гидролиза характерных ошибочно синтезированных продуктов. Специфический гидролиз ошибочно синтезированных аминоацил-аденилатов, синтезированной их АРСазой, называется претрансферным редактированием, а гидролиз готовых ошибочно синтезированных аминоацил-тРНК – посттрансферным редактированием. Пролил-тРНК синтетаза (ПроРС) прокариотического типа ошибочно узнаёт аланин и цистеин, а затем гидролизует содержащие остаток аланина продукты по претрансферному и посттрансферному механизмам. Претрансферное редактирование у этого энзима осуществляется непосредственно в аминоацилирующем активном центре, а посттрансферное – в активном центре специального редактирующего домена. Целью нашей работы было изучение структурных основ редактирующей активности ПроРС.

На основании существующей компьютерной модели комплекса ПроРС бактерии *Enterococcus faecalis* с аланил-тРНК^{Pro} в конформации посттрансферного редактирования был сделан ряд предположений о структуре активного центра редактирующего домена ПроРС. Для их проверки использовали сайт-направленный мутагенез (аланиновое сканирование) участка гена ПроРС, кодирующего редактирующий домен. Так, была показана существенная роль аминокислотных остатков K279, G331, I333 и N366 для деацилирования аланил-тРНК^{Pro}, находящаяся в соответствии с компьютерной моделью.

Мутантная форма ПроРС K279A практически лишена посттрансферной редактирующей активности. В то же время, в тесте на аланин-зависимый гидролиз АТР ПроРС было показано наличие у этой мутантной формы высокого уровня суммарного редактирования, что может свидетельствовать о тРНК-зависимом претрансферном редактировании. Эксперименты с 2'- и 3'-дезоксидеокси А76 тРНК^{Pro} показали критическую важность обеих гидроксильных групп 3'-концевого аденозина тРНК^{Pro} как для посттрансферного, так и для предполагаемого тРНК-зависимого претрансферного редактирования.

ПроРС аминоацилирует тРНК остатком пролина по 3'-, но не по 2'-гидроксильной группе. В то же время, отсутствие 2'-гидроксильной группы А76 приводит к полной потере тРНК-зависимой редактирующей активности ПроРС. Сопоставив полученные экспериментальные данные с компьютерной моделью, можно выдвинуть предположение об участии 2'-гидроксильной группы в переносе протона при гидролизе аланил-тРНК^{Pro} в редактирующем домене, либо в координировании, осуществляющей гидролиз, молекулы воды.

**ВПЛИВ МЕХАНІЧНОГО НАПРУЖЕННЯ
У СПОЛУЧНІЙ ТКАНИНІ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ
СИНТЕЗУ ТА КОНЦЕНТРАЦІЮ БІОПОЛІМЕРІВ
МІЖКЛІТИННОГО МАТРИКСУ**

*БУЛАНКИНА Н. І., КОСТИНА Т. В., ПОНОМАРЕНКО О. М.,
ЭЛЬ-ТА'АЛУ А. Б.*

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: A.N.Ponomarenko@mail.ru*

Регуляція властивостей сполучної тканини – еластичності, міцності, жорсткості та ін. – зумовлена постійною взаємодією між її клітинами та компонентами міжклітинного матриксу (МКМ), найважливішими з яких є протеїни (колаген, еластин) та конструкційні полісахариди – глікозаміноглікани (ГАГ). В свою чергу ця взаємодія відіграє важливу роль в адаптації тканин організму до дії зовнішніх чинників, в тому числі механічних напружень у сполучній тканині.

Дослідження дії механічного навантаження, що вивчалось *in vitro* у дермі шкіри 3-місячних щурів, показало інтенсифікацію синтезу і, як наслідок, зростання концентрації колагену та еластину при значеннях механічних навантаженнях до 0,12 МН/м² (фізіологічний рівень). Концентрація колагену досягає максимуму при 0,075 МН/м² і залишається незмінною до 0,12 МН/м²; у разі навантаження концентрація еластину також досягає максимуму. Такі зміни забезпечують, очевидно, адаптивне збільшення міцності сполучної тканини. Внаслідок більших напружень концентрація обох протеїнів зменшується, що може бути пов'язано з розвитком у МКМ процесів деградації.

Механічне навантаження інтенсифікує синтез конструкційних ГАГ. Збільшення загальної кількості всіх типів ГАГ у шкірі за рахунок інтенсифікації їхнього синтезу спостерігається при напруженнях до 0,025 МН/м². Більш високе напруження викликає зменшення активності синтезу та падіння концентрації навіть нижче початкового рівня.

Співвідношення колаген/еластин зростає в області фізіологічних значень зовнішнього чинника і повертається до початкового рівня у разі подальшого зростання навантаження. Співвідношення колаген/сумарні ГАГ при всіх напруженнях, що вивчалися, продовжує зростати.

Таким чином, на відміну від синтезу ГАГ, підвищений рівень синтезу колагену та еластину залишається активним у більш широкому діапазоні зростання механічної напруги. Це може бути важливим для забезпечення оптимальної структури та функцій МКМ в умовах дії механічної напруги.

Обговорюється значення змін окремих компонентів МКМ для функціонального стану сполучної тканини.

СТРУКТУРА І БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ НОВИХ ВИДІВ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ

ВАРБАНЕЦЬ Л. Д., БРОВАРСЬКА О. С.,
ШУБЧИНСЬКИЙ В. В., СКОКЛЮК Л. Б.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua*

Rahnella aquatilis, *Budvicia aquatica* і *Pragia fontium* – представники нових видів *Enterobacteriaceae*, які були відкриті і ідентифіковані в 1976–1979 рр., є дуже гетерогенним. Відомо, що склад і структура ліпополісахаридів (ЛПС), основних поверхневих антигенів клітин грамнегативних бактерій, є визнаним хемотаксономічним критерієм, який використовується для їхньої систематики. Тому метою роботи було виділити ЛПС та їхні структурні компоненти: ліпід А, олігосахарид кору, О-специфічний полісахарид (ОПС) з трьох штамів бактерій, ізольованих з різних джерел (питна вода, практично здорова людина, річна вода), хімічно їх охарактеризувати, встановити структуру ОПС та вивчити наявність між ними серологічної спорідненості. Аналіз жирнокислотного складу показав, що домінуючою в ліпідах А всіх досліджуваних штамів є 3-гідрокситетрадеканова кислота, водночас основними нейтральними моносахаридами олігосахаридів кору – галактоза і глюкоза. Встановлення структур ОПС з використанням ЯМР-спектроскопії, а також методів хімічного і біохімічного аналізів показало, що ОПС *R. aquatilis* 95U003 побудований з розгалужених гексасахаридних ланцюгів, які включають 2 залишки галактопіранози, два залишки манопіранози і по одному залишку глюкопіранози і глюкуронової кислоти. Вперше описана структура ОПС *P. fontium* 97U116, яка представлена лінійним пентасахаридом, що включає 2 залишки рамнопіранози, 1 залишок галактофуранози і 2 залишки N-ацетилглюкозаміна. Унікальною виявилася структура ОПС *B. aquatica* 97U124, яка містить в своєму складі тільки глюкозу і гліцерин. Подібні структури є характерними для тейхоевих кислот грампозитивних бактерій і надзвичайно рідко виявляються у представників грамнегативних бактерій. ЛПС всіх досліджуваних штамів у гомологічній системі проявляють активність антигену, але не взаємодіють у гетерологічній. Це свідчить про відсутність у них загальних антигенних детермінант, тобто про належність досліджуваних штамів до різних серогруп. Вивчення таких ендотоксичних властивостей, як токсичність і пірогенність свідчить, що ЛПС досліджуваних штамів є мало токсичними і мало пірогенними.

ВПЛИВ КАЛІКСАРЕНІВ НА АТР-ГІДРОЛАЗНІ СИСТЕМИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ МІОМЕТРІЯ

ВЕКЛІЧ Т. О., ШКРАБАК О. А.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua*

В останній час все більше уваги приділяється каліксаренам – макроциклічним сполукам, які отримують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду. Каліксарени вивчаються як молекулярні платформи для дизайну сполук, здатних впливати на протікання біохімічних реакцій. Na^+, K^+ -АТР-аза – транспортна система плазматичних мембран (ПМ), яка створює градієнт концентрації іонів Na і K , залучена в різних тканинах до виконання різноманітних фізіологічних функцій. Для ПМ також властива наявність Mg^{2+} -АТР-ази, ферментативна активність якої значно перевищує активність інших АТР-аз, локалізованих в ПМ. Дана АТР-гідролазна активність виявляється у присутності мілімолярних концентрацій іонів Mg та АТР і притаманна клітинам різного типу тканин. Приймаючи до уваги, що каліксарени здатні впливати на перебіг біохімічних процесів, ми поставили перед собою за мету вивчити вплив деяких каліксаренів на Na^+, K^+ -АТР-азну та Mg^{2+} -АТР-азну активність у фракції ПМ.

Каліксарени були синтезовані член-кор. НАНУ В. І. Кальченком та його колегами (ІОХ НАНУ).

В експериментах, виконаних на суспензії ПМ клітин міометрія, оброблених 0,1% розчином дигітоніну, досліджували інгібуючу дію каліксарену С-107 на Na^+, K^+ -АТР-азну активність. Як виявилось, каліксарен С-107 (10^{-8} – 10^{-4} М) дозозалежно пригнічує активність Na^+, K^+ -АТР-ази, практично не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТР-ази. Величина уявної константи інгібування $I_{0,5}$ становить 33 ± 4 нМ, значення коефіцієнта Хілла n_H складає $0,38 \pm 0,06$. Крім цього каліксарен С-107, використаний у концентрації, яка відповідає значенню $I_{0,5}$, істотно стимулює гальмівну дію убаїну на питому активність Na^+, K^+ -АТР-ази. Адже даний каліксарен в зазначених концентраціях інгібує АТР-азну активність приблизно на 50%, а за умов сукупного використання убаїну в концентрації, що також відповідає $I_{0,5}$, з каліксареном Na^+, K^+ -АТР-азна активність становить близько 20% контрольної величини. Модельні сполуки – незаміщений по верхньому вінцю 25,27-дипропоксикаліксарен (каліксарен С-150, суто каліксаренова “платформа”) (10^{-8} – 10^{-4} М) та сполука М-3 (амінофосфонова група разом з фенольним фрагментом) (10^{-6} – $4 \cdot 10^{-3}$ М) практично не впливають на досліджувані ферментативні системи. Каліксарен С-160, регіоізомер каліксарену С-107, (10^{-8} – 10^{-4} М) не впливає як на Na^+, K^+ -АТР-азну, так і на Mg^{2+} -АТР-азну активності у фракції сарколеми міометрія. Інгібувальний вплив каліксарену С-107 на Na^+, K^+ -АТР-азну активність визначається взаємним розташуванням амінофосфонових груп саме у положеннях 5,17 на протилежних фенольних фрагментах верхнього вінця молекули каліксарену, на відміну від каліксарену С-160, для якого є властивою локалізація цих груп у положеннях 5,11. Отже, просторова будова каліксарен-амінофосфонових кислот є суттєвою для прояву їхньої інгібувальної дії на Na^+, K^+ -АТР-азну активність у ПМ гладеньком’язових клітин.

Вищенаведені експериментальні дані можуть бути корисними у подальшому з'ясуванні мембранних механізмів іонного обміну у гладеньких м'язах, зокрема, під час вивчення ролі ПМ у забезпеченні електромеханічного спряження в них та контролю іонного гомеостазу в міоцитах.

Автори висловлюють подяку член-кор. НАНУ С. О. Костеріну (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ) та член-кор. НАНУ В. І. Кальченку (ІОХ НАНУ) за обговорення експериментальних результатів.

ХАРАКТЕРНІ РИСИ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ мікроРНК

ГАЛИЦЬКИЙ В. А.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: volha@biochem.kiev.ua

Недавно було виявлено, що динуклеотиди 5'-CG-3' та тринуклеотиди 5'-CNG-3' у послідовностях інтерферуючих РНК, зокрема miRNA (мікроРНК), зустрічаються достовірно значно частіше, ніж у середньому в геномі [Halytskiy, 2007]. Це дало підстави запропонувати механізм miRNA-залежного метилювання ДНК, який передбачає, що miRNA гібридизуються з ДНК-мішенями і викликають метилювання *de novo* залишків цитозину у тих сайтах мішеней, котрі виявились комплементарно зв'язаними з динуклеотидами 5'-CG-3' та тринуклеотидами 5'-CNG-3', що перебувають у складі miRNA [Halytskiy, 2008]. Оскільки при посттранскрипційному сайленсингу має місце неповна взаємодія miRNA з РНК-мішенню, постало питання, чи також неповною є гібридизація miRNA з ДНК. Відповідь на нього могло б дати, зокрема, встановлення характеру розподілу сайтів 5'-C(N)G-3' у послідовності miRNA та відстаней між останніми. Виявлення характерних рис будови miRNA також необхідне для створення ефективних штучних інтерферуючих РНК.

Нуклеотидні послідовності зрілих miRNA людини, миші, пацюка – загалом 1639 послідовностей – були отримані з бази даних miRBase, <http://www.mirbase.org/>. Аналіз послідовностей проводили за допомогою програм для аналізу нуклеотидних текстів.

Для більшості позицій нуклеотидів у послідовності miRNA виявився характерним достовірно значно вищий вміст гуаніну і значно нижчий – аденіну, ніж для геному загалом. У цілому для miRNA властивий відносно рівномірний розподіл аденіну, урацилу, гуаніну та цитозину від 5'- до 3'-кінця послідовності, за винятком різко підвищеної концентрації урацилу та різко зниженої концентрації гуаніну, а також цитозину у положенні 1-го нуклеотиду з 5'-кінця miRNA. Дана особливість пояснюється тим, що урацил, розташований у даній позиції, входить до складу seed-ділянок типу 7mer-1A та 8mer. Ще один еволюційно консервативний пік концентрації урацилу припадає на 9-ий нуклеотид.

Розподіл динуклеотидів 5'-CG-3' демонструє наявність еволюційно консервативних піків їхньої концентрації, що припадають на 10-ий, 16-ий та 21-ий нуклеотид. Окрім них, спостерігаються неконсервативні піки концентрації даних сайтів у ділянці нуклеотидів 2-3, 5-6, та 12-14. Розподіл тринуклеотидів 5'-CNG-3' харак-

теризується еволюційно консервативними піками концентрації, які припадають на 4-ий та 8-ий нуклеотид; також мають місце неконсервативні піки концентрації даних сайтів у ділянці нуклеотидів 6, 11-13 та 17-19. Таким чином, не всі піки розподілу сайтів 5'-C(N)G-3' локалізуються у межах якоїсь одної області miRNA, зокрема seed-ділянки, і це означає, що при miRNA-залежному метилуванні ДНК з послідовністю-мішенню гібридується уся молекула miRNA, а не якась окрема її частина.

Картина локалізації динуклеотидів 5'-GC-3' характеризується наявністю кількох еволюційно консервативних піків, особливо вираженим з яких є пік, що припадає на нуклеотиди 5-7 – концентрація сайтів 5'-GC-3' в його межах у кілька разів перевищує середній рівень у геномі. Даний пік, а також пік у ділянці 3-го нуклеотиду розташовуються у межах seed-ділянки, що, найімовірніше, вказує на роль динуклеотидів 5'-GC-3' у забезпеченні стійкості взаємодії seed-ділянки miRNA з РНК-мішенню при посттранскрипційному сайленсингу. Інші піки концентрації сайту 5'-GC-3' локалізуються на 3'-кінці послідовності miRNA і не є високими; можливо, вони відіграють певну роль у забезпеченні вищої термодинамічної стабільності 3'-кінця молекул miRNA у порівнянні з 5'-кінцем, що є важливою для правильного розплітання дволанцюгового попередника miRNA у комплексі RISC.

Близько половини miRNA містять у своєму складі 2 або більше сайтів 5'-C(N)G-3'. Відстань між ними в більшості випадків становила 1 або 3-9 нуклеотидів. Це означає, що сусідні сайти 5'-C(N)G-3', як правило, розташовуються в межах 1 витка подвійної спіралі.

МЕХАНІЗМ РЕГУЛЯЦІЇ ШВИДКОСТІ РУЙНУВАННЯ ФІБРИНОВИХ ЗГУСТКІВ

ГРИНЕНКО Т. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: grinenko@biochem.kiev.ua*

Мета роботи – з'ясувати механізм регуляції швидкості гідролізу полімерного фібрину плазміном за участі різних доменів молекули ензиму.

На основі великого експериментального матеріалу, отриманого автором, стосовно взаємодій Глу- та Ліз-форм плазміногену, що мають різну конформацію, та фрагментів молекули плазміногену, що містять різні кринглові домени, з фібриногеном, мономерним та полімерним фібрином, частково деградованим фібрином, фрагментами X, У, Д та Е фібриногену; активації плазміногену тканинним активатором; визначення швидкості гідролізу полімерного фібрину на модельних системах було встановлено участь певних доменів некаталітичної частини молекул плазміногену/плазміну на різних етапах фібринолітичного процесу, доменну локалізацію та відповідність центрів комплексоутворення молекул ензиму та субстрату і перебіг подій, що мають місце під час утворення та руйнування фібринових згустків. Під час полімеризації на поверхні фібрил експонуються центри взаємодії з плазміногеном, комплементарні ліганд-зв'язувальним ділянкам крингла п'ятого (один центр на 10–20 фібрин-мономерних одиниць). Глу-плазміноген на фібрині переходить у

частково відкриту конформацію, що обумовлює його активацію тканинним активатором і початок гідролізу. На стадії утворення X-полімеру в α C-доменах фібрину формуються нові центри взаємодії з Глу-плазміногеном. Проензим, зв'язуючись з ними кринглом четвертим, переходить у повністю відкриту витягнуту у просторі конформацію, що забезпечує його взаємодію кринглом 1–3 з відповідними центрами E або D доменів молекул фібрину тієї самої або суміжних протофібрил. Перехід на них вивільняє новоутворені центри для наступних молекул. У такий спосіб відбувається підвищення локальної концентрації плазміногену.

Запропоновано механізм регуляції швидкості руйнування фібринового згустку, згідно якому зміна конформації плазміногену у разі взаємодії з новими плазміноген-зв'язувальними центрами, що утворюються на початкових етапах гідролізу, приводить до збільшення локальної концентрації проензиму та швидкості його активації, внаслідок чого згусток швидко руйнується плазміном.

ЛИПИДНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНОВ ЦИНКА И СВИНЦА

ГРУБИНКО В. В., КОСТЮК К. В.

*Тернопольский национальный педагогический университет, Украина;
e-mail: v.grubinko2@yahoo.com*

Исследовали индуцируемые ионами металлов (Zn^{2+} – 1,0 и 5,0 мг/дм³; Pb^{2+} – 0,1 и 0,5 мг/дм³, соответственно 1 и 5 ПДК; 1-14 суток) изменения липидного состава мембран водорослей: *Chlorella vulgaris* Beijer., *Elodea canadensis* и *Lemna minor* L. Клеточные мембраны выделяли по Финдлею и Эвансу. Липиды после экстрагирования разделяли хроматографически.

Общее содержание липидов в мембранах у всех водорослей возрастает как по мере увеличения концентрации металлов до 5 ПДК, так и с увеличением времени действия до 7 сут. У хлореллы накопление липидов максимально при действии свинца (в 2 раза выше контроля на 3–7 сут.). Доминирующими являются триацилглицеролы (ТАГ) и фосфолипиды (ФЛ). Содержание ТАГ у водорослей по сравнению с другими липидами выше в 1,5-2 раза. Действие ионов цинка увеличивает их накопление в клетках хлореллы более чем в 2 раза, элодеи – 3 раза, ряски – 1,5 раза. Максимальное увеличение выявлено на 7 сут. У хлореллы ионы цинка и свинца в обеих концентрациях увеличивают содержание ДАГ практически в 2 раза. Максимальное накопление ДАГ при действии ионов цинка наблюдается на 7-е сут., а свинца – на 3-и.

Уровень диацилглицеролов (ДАГ) и неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) также возрастает. Динамика накопления НЭЖК у хлореллы при действии обеих металлов близка к таковой других классов липидов. Ионы цинка стимулируют накопление кислот в 2 раза на 7-е сут. Действие свинца стрессовое, поскольку содержание НЭЖК относительно контроля возрастает на 80% (0,5 мг/дм³) уже в течение первых суток. В отличие от хлореллы, у ряски и элодеи содержание НЭЖК возрастает как по мере увеличения концентрации металлов, так и от време-

ни действия. Чем агрессивнее токсикант, тем больше масса накапливаемых липидов. Поскольку между классами липидов существует метаболическая взаимосвязь, то соотношение ТАГ : ДАГ : ФЛ : НЕЖК также изменяется линейно. Соотношение липидов при интоксикации изменяется в сторону ТАГ и ФЛ, которые при повреждении клеток тяжелыми металлами являются основными адаптивными формами.

Полученные результаты согласуются с наблюдаемым в мембранах водорослей феноменом восстановления их структурно-функциональной целостности со временем после первичного повреждения токсикантами, вследствие уникального явления, индуцируемого токсикантами, — образованием в клетках «вторичных концентрических мембран».

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СИГНАЛ В ГЕНЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *Zygaenidae*

ЕФЕТОВ К. А., КИРСАНОВА А. В., ЛАЗАРЕВА З. С.,
ПАРШКОВА Е. В.

Крымский государственный медицинский университет, Симферополь, Украина;
e-mail: konst@efetov.crimea.ua

Ранее было установлено, что фрагмент митохондриального гена цитохромоксидазы I длиной 658 нуклеотидных пар позволяет различить до 95% видов во многих группах живых организмов. Цель нашей работы — определение нуклеотидной последовательности этого участка гена у представителей семейства *Zygaenidae*, а также оценка возможности использования этих данных для идентификации биологических видов и выяснения их филогенетических взаимоотношений.

Нуклеотидные последовательности определены у 178 особей пятидесяти трех биологических видов, из которых 144 экземпляра (41 вид) относятся к подсемейству *Procrinae*, а 34 экземпляра (12 видов) — к подсемейству *Zygaeninae*.

В подавляющем большинстве случаев продемонстрирована высокая видовая специфичность изученных нуклеотидных последовательностей. Так, подтверждена обособленность видов *Zygaenoprocris efetovi*, *Z. hofmanni* и *Z. chalcoclora*. В то же время, у некоторых видов, хорошо отличающихся морфологически, например *Jordanita graeca*, *J. chloros* и *J. globulariae*, не обнаружены фиксированные различия по гену цитохромоксидазы I.

Почти все исследованные виды образуют изолированные генетические кластеры с низкой степенью внутривидовых вариаций и высоким уровнем межвидовой дивергенции, что свидетельствует о наличии филогенетического сигнала в гене цитохромоксидазы I.

Исследованием ДНК подтверждена монофилия рода *Rhagades*, а также подродов *Molletia* (род *Zygaenoprocris*), *Procriterna* и *Tarmannita* (род *Adscita*), *Tremewanina* и *Roccia* (род *Jordanita*), что согласуется с ранее выдвинутой гипотезой (Efetov, 2004), основанной на изучении протеинов гемолимфы, морфологических и биологических признаков.

Полученные молекулярные данные также служат дополнительным доказательством идеи, выдвинутой одним из авторов (Efetov, 2005), о филогенетической близости родов *Illiberis*, *Rhagades* и *Theresimima*.

Таким образом, впервые для многих представителей семейства *Zygaenidae* показана видоспецифичность нуклеотидных последовательностей митохондриального гена цитохромоксидазы I, а также обнаружен филогенетический сигнал, характеризующий взаимоотношения таксонов родового ранга.

ADHESIVE ORGANELLES OF GRAM-NEGATIVE PATHOGENS ASSEMBLED WITH THE CHAPERONE/USHER MACHINERY: STRUCTURE AND FUNCTION FROM A CLINICAL STANDPOINT

ZAV'YALOV V. P.

*University of Turku, Finland;
Kherson State University, Ukraine;
e-mail: vlazav@utu.fi*

This report summarizes the current knowledge on the structure, function, assembly and biomedical applications of the fibrillar adhesive organelles assembled on the surface of Gram-negative pathogens via the chaperone/usHER pathway.

X-ray crystallography and scanning calorimetry is used.

High-resolution structures of the capsular minifibers of *Yersinia pestis*, the causative agent of bubonic and pneumonic plague, demonstrated at the first time that *Yersinia pestis* capsule is made of linearly polymerized subunits and exploit the principle of donor strand complementation for polymerization (Zavialov A. et al., 2003). A comparison of the chaperone bound and fiber conformation of Caf1 subunits (Zavialov A. et al., 2003) together with calorimetric studies (Zavialov A. et al., 2005) allowed discovering that fiber formation is driven by the chaperone-preserved folding energy of subunits. The three-dimensional structure of adhesin subunits bound to host-cell receptors and the final architecture of adhesive organelles revealed two functional families of the organelles, respectively, possessing polyadhesive and monoadhesive binding (Zavialov A. et al., 2007; Zav'yalov V. et al. 2010). Polyadhesins are encoded exclusively by the gene clusters of the gamma3- and kappa-monophyletic groups, respectively, while gene clusters belonging to the gamma1-, gamma2-, gamma4-, and pi-fimbrial clades exclusively encode monoadhesins (Zav'yalov V. et al. 2010).

Polyadhesive binding possesses an advantage over monoadhesive binding because it would result in formation of more powerful and tight contact between the pathogen and the host cell and it may lead to a massive aggregation of the receptors. This subsequently would trigger subversive signals directed to mislead functions of host cells, in particular, the cells of immune system. The adhesive organelles that are represented by the linear polymers of hundreds to thousands of subunits have a huge potential for cross-linking of B cell receptors and stimulation of antibody production. They are specific and very powerful surface antigens typical only of pathogenic strains. Therefore, they are promising candidates for the development of vaccines against Gram-negative infections and their medical

diagnosis. The recently solved structure of the usher translocator pore of the twinned-pore translocation machinery creates a ground for a rational design of a new generation of antimicrobials.

Acknowledgements: This work was supported by grants from the European Commission/Research Executive Agency under a Marie Curie International Incoming Fellowship (235538) and a grant from the Academy of Finland (112900).

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСНОГО ПОЛИ(А)-СИГНАЛА про-мРНК ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА

*ЗАРУДНАЯ М. И., ПОТЯГАЙЛО А. Л., КОЛОМИЕЦ И. Н.,
ГОВОРУН Д. Н.*

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: m.i.zarudna@imbg.org.ua*

Вторичная структура поли(А)-сигнала про-мРНК эукариот и их вирусов критична для узнавания протеиновыми факторами аппарата полиаденилирования. Известно, что гексамер AAUAAA в про-мРНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) расположен в верхней части шпильки polyA длиной 45 нт и частично вовлечен в двойную спираль. Вторичные структуры «нижнего» элемента (DSE, downstream sequence element) поли(А)-сигнала про-мРНК ВИЧ-1 и вспомогательного «верхнего» элемента (USE, upstream sequence element), существенных для эффективного полиаденилирования, не определены.

Цель настоящей работы состояла в исследовании структуры комплексного поли(А)-сигнала про-мРНК ВИЧ-1 с помощью моделирования вторичной структуры РНК и филогенетического анализа. Первичные последовательности про-мРНК ВИЧ-1, включающие поли(А)-сигнал, выбирались из ГенБанка. Вторичную структуру предсказывали с помощью программы mfold Дзукера.

Впервые показано, что «нижний» элемент поли(А)-сигнала про-мРНК ВИЧ-1 расположен в апикальной петле шпильки длиной 26 нт, которую мы назвали шпилькой DSE, а вспомогательный «верхний» элемент расположен в апикальной петле шпильки длиной 19 нт, которую мы назвали шпилькой USE. Представлена модель вторичной структуры комплексного поли(А)-сигнала про-мРНК ВИЧ-1, включающая 4 шпильки — USE, TAR, polyA и DSE. Шпилька TAR (trans-acting responsive), необходимая для стимулирования элонгации транскрипции провирусной ДНК, непосредственно не участвует в процессе полиаденилирования, но она является важным структурным элементом сигнала.

Модель подтверждена предсказанием вторичной структуры соответствующей области для более чем 400 изолятов ВИЧ-1 разных субтипов. Найдены наиболее часто встречающиеся мутации в каждой шпильке комплексного поли(А)-сигнала для изолятов разных субтипов.

Кроме того, впервые представлена модель вторичной структуры 3'-конца 3'-нетранслируемой области про-мРНК ВИЧ-1. Сделан вывод о том, что «нижний» элемент поли(А)-сигнала доступен для протеиновых факторов аппарата полиаде-

нилювання не тільки сразу после транскрипции шпильки DSE, но и до конца транскрипции провирусной ДНК.

МОЛЕКУЛЯРНА ДИНАМІКА МІОЗИНУ II

КАНІБОЛОЦЬКИЙ Д. С.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: kanibolotsky@univ.kiev.ua*

Методом моделювання молекулярної динаміки з використанням пакету програм Gromacs 4.0.5. досліджені конформаційні перетворення голівки міозину II слизовика *Dictyostelium discoideum* за умов переходу з ригорної у пост-ригорну конформацію. В якості вихідної структури протеїну взятий файл з банку даних 1q5g. В активний центр моделі протеїну розміщені молекула АТР та іон магнію. Модель протеїну розміщували у віртуальний бокс у формі зрізаного октаедру так, щоб відстань від протеїну до стінок боксу не перевищувала 1 нм. Бокс заповнювали молекулами молекул води SPC. Мінімізацію енергії системи здійснювали почерговим застосуванням алгоритмів «скоріший спуск» та «кон'югований градієнт». Врівноваження молекул розчинника проводили 500 пс, у цьому разі атоми протеїну були прив'язані до своїх вихідних координат. Інтегрування рівняння руху здійснювали з кроком $2 \cdot 10^{-15}$ с. Для електростатичних взаємодій встановлена границя 0,9 нм, тоді як для ван-дер-ваальсових взаємодій встановлена подвійна границя: взаємодії на відстані до 0,9 нм враховувалися на кожному кроці інтегрування, а на відстані від 0,9 до 1 нм – на кожному десятому кроці. Електростатичні взаємодії за межами встановленої границі враховували згідно алгоритму PME. Температуру та тиск підтримували рівними 293 К та 1 атм. Після врівноваження молекул розчинника проводили додаткову мінімізацію енергії системи. Основне моделювання молекулярної динаміки здійснювали з тими ж параметрами, що і врівноваження розчинника, за винятком обмеження координат атомів протеїну та контролю тиску. Координати записували у вихідний файл траєкторії через кожну пікосекунду. Під час динаміки спостерігається відкривання щілини зв'язування актину, вирівнювання центрального β -складчастого шару, збільшення відстані між «перемикачем 1» (амінокислотні залишки Lys229-Asn235) та «перемикачем 2» (Phe455-Ser465), що супроводжується розривом сольового містка між Arg238 та Glu459, а також зменшення відстані між «перемикачем 1» та петлею P (Gly179-Gly184). Таким чином, мають місце часткові закривання «перемикача 1» і петлі P та відкривання «перемикача 2», що свідчить про рухи у бік конформаційного переходу від ригорної до пост-ригорної структури міозину. Також виявлено значну конформаційну рухливість релейної петлі (Lys498-Phe506), конвертерного субдомену (Asn694-Gly749) та «хвоста» міозину (α -спіраль після Gln750). Висока рухливість цих частин протеїну важлива для подальшого переходу від пост-ригорної конформації до конформації перед силовим ходом.

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ГОМОЛОГИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ MAST2, АССОЦИИРОВАННОЙ С МИКРОТРУБОЧКАМИ

¹КАРПОВ П. А., ¹ЕМЕЦ А. И., ^{2,3}НАДЕЖДИНА Е. С.,
³БРЯНЦЕВА С. А., ¹БЛЮМ Я. Б.

¹Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев;

²Институт белка РАН, Москва, Россия;

³Московский государственный университет

им. М. В. Ломоносова, Россия;

e-mail: karpov.p.a@gmail.com

Ассоциированные с микротрубочками серин-треониновые протеинкиназы группы MAST (MAST1, MAST2, MAST3, MAST4, MASTL) играют важную роль в регуляции микротрубочек и клеточного цикла у животных. Несмотря на это, их растительные гомологи оставались неизвестными до недавнего времени, поэтому целью настоящего исследования являлся поиск растительных гомологов животных протеинкиназ MAST2.

BLASTp-сканирование базы данных UniProt против последовательности каталитического комплекса (каталитический - S_TKc и вспомогательный - S_TK_x домены) выявило 34 потенциальных растительных гомолога протенкиназы MAST2: 5 из *Vitis vinifera*, 7 из *Arabidopsis thaliana*, 6 из *Oriza sativa* ssp. *japonica*, 2 из *O. sativa* ssp. *indica*, 1 из *Medicago truncatula*, 4 из *Physcomitrella patens* ssp. *patens*, 5 из *Populus trichocarpa*, 1 из *Zea mays*, 3 из *Ricinus communis*. Анализ доменной архитектуры подтвердил наличие в их структуре характерного для MAST-киназ дополнительного S_TK_x домена. Результаты профильного выравнивания и данные клади-стического анализа показали, что ближайшими растительными гомологами MAST2 человека являются протеины с неизвестной функцией из *V. vinifera* (NCBI Reference Sequence: XP_002282958.1 и GenBank: CAN61876.1) и из *P. balsamifera* ssp. *trichocarpa* (NCBI Reference Sequences: XP_002311675.1 и XP_002302036.1). С помощью метода гомологичного моделирования была реконструирована пространственная структура и построена трехмерная модель каталитического домена XP_002282958.1 из *V. vinifera*, названного нами GMLK (Grape MAST2-Like Kinase). Фитинг структур подтвердил высокое сходство каталитических доменов MAST2 человека и GMLK, а также консервативность их функционально важных остатков и мотивов.

На основании результатов биоинформационного поиска была клонирована соответствующая кДНК из листьев винограда сорта Пино Нуар, и было показано практически полное соответствие аминокислотной последовательности предсказанного продукта и GMLK. В кДНК было обнаружено 7 точечных замен нуклеотидов, приводящих к 4 точечным заменам аминокислот, не входящих в состав функционально важных положений каталитического домена. Продукт экспрессии, меченый GFP, достаточно равномерно распределялся по цитоплазме и ядру клеток линии Vero, которые в своем большинстве не утрачивали жизнеспособности и способности к делению, сохраняя при этом, как правило, систему микротрубочек, идентичную контролю. Известно, что гетерологичная экспрессия MAST205 в клетках животных приводит к полноценному функционированию этой киназы (PMID: 16159897), однако при условии наличия киназного домена. Делеция же ки-

назного домена или доминант-негативная мутация в гене, кодирующем MAST205, нарушает ее функциональную активность. Соответственно, в гетерологичных клеточных системах функции протеина из *V. vinifera* могут реализовываться посредством механизма зависящего от фосфорилирования.

Таким образом, нами впервые было доказано существование у высших растений ортологов животных протеинкиназ MAST2, а также представлены биоинформационные, структурно- и молекулярно-биологические доказательства возможной гомологии их функции.

СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ИНГИБИТОРОВ ФУРИНА

КИБИРЕВ В. К., ОСАДЧУК Т. В.

*Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua*

Фурин (КФ 3.4.21.75) – наиболее изученная и охарактеризованная кальций-зависимая внутриклеточная сериновая эндопротеиназа животных, относящаяся к семейству пропротеинконвертаз (ПК) – гомологична с субтилизином бактерий. Благодаря ограниченному расщеплению своих субстратов по пептидной связи, находящейся после пары положительно заряженных остатков аминокислот (-Arg-Arg- или -Lys-Arg-) на участке -Arg-X-Lys/Arg-Arg-↓, энзим играет первостепенную роль в эмбриогенезе, гомеостазе и других физиологических процессах. Он также участвует в развитии ряда патологических состояний, например, вирусных и бактериальных заболеваний и таких патологий, как метастазирование, рак, болезнь Альцгеймера и т.д. Поэтому энзим рассматривается как важнейшая мишень для синтеза соответствующих ингибиторов и создания на их основе новых лекарственных препаратов.

Для фурина идентифицировано несколько эндогенных протеиновых ингибиторов и созданы биоинженерные аналоги на основе третьего домена овомукоида индюка, α_2 -макроглобулина, α_1 -антитрипсина и элгина С.

Синтетическими необратимыми ингибиторами фурина являются пептидилхлорметилкетоны. Например, Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CO-CH₂-Cl – весьма активный, но неспецифический ингибитор фурина, блокирует расщепление энзимом ВИЧ gp160. Синтезированы также обратимые ингибиторы пептидной и псевдопептидной природы аналоги пропептида фурина и других ПК с модификацией расщепляемой -CO-NH-связи на кетометиленовую или аминометиленовую связь. Созданы пептиды, на С-конце которых присутствуют непротеиногенные аминокислоты (например, Phenylacetyl-Arg-Val-Arg-4-amidinobenzylamide), содержащий в P₁ миметик аргинина. Обратимыми ингибиторами фурина являются полиаргинины, среди которых наиболее эффективным оказался нона-D-аргининамид, защищающий клетки RAW 264.7 от сибирской язвы. Известны также непептидные ингибиторы: незаряженный андрографолид, выделенный из *Andrographis paniculata*, и его производные; ряд производных пиридина, способных давать комплексы с ионами меди или цинка, а также производные 2,5-дидезоксистрептамина или ди-

кумарола. По нашим даним інгібіторами фурина являються також гликозилированні производні флавоноидів, котрі не містять в молекулі груп з позитивним зарядом, але інгібують ензим конкурентно.

ЯК МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНИЙ ЦИТОХРОМ P-450 2E1 СТАЄ ДОСТУПНИМ ДЛЯ ЦИТОЗОЛЬНОЇ ПРОТЕОСОМИ?

*КІТАМ В. О., МАКСИМЧУК О. В., РОСОХАЦЬКА І. В.,
ЧАЩИН М. О.*

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
e-mail: v.o.kitam@gmail.com*

Цитохром P-450 2E1 (CYP2E1) належить до надродини геммісних цитохром P-450-монооксигеназ, які здійснюють окислення ендогенних та екзогенних сполук в клітинах. Молекула цього ензиму має форму піраміди, яка своєю основою завдяки гідрофобному N-кінцю асоційована з мембраною ендоплазматичного ретикулуму. Показано, що низькомолекулярні гідрофобні сполуки – субстрати CYP2E1 потрапляють до активного центру ензиму через канал, вхід до якого розташований біля мембрано-асоційованого домену протеїну. Одним з головних механізмів регуляції внутрішньоклітинного вмісту CYP2E1 є посттрансляційна стабілізація його молекули субстратами та лігандами. Вважається, що останні, зв'язуючись з ензимом, дещо змінюють та стабілізують його структуру і таким чином захищають від впізнавання та розщеплення протеазами. Разом з цим шляхи, за якими здійснюється протеосомна деградація CYP2E1, залишаються нерозкритими. Вважають, що у цих процесах задіяні протеїни теплового шоку, зокрема Hsp90. Але як відбувається взаємодія мікросомного цитохрому P-450 2E1 із цитозольним шапероном Hsp90 залишається невідомим. Не з'ясовано також, як мембранозв'язаний цитохром P-450 2E1 стає доступним для цитозольної протеосоми. Для моделювання процесів взаємодії цитохрому P-450 2E1 з Hsp90 нами було використано комп'ютерні методи докінгу та молекулярної динаміки. Серед декількох отриманих в результаті докінгу комплексів "CYP2E1/ Hsp90" було відібрано один з максимальною енергією зв'язування ($\Delta G_{зв.} = -800$ кДж/моль) та найбільшою площею контакту ($S = 1928 \text{ \AA}^2$) між досліджуваними протеїнами. В ході молекулярної динаміки цього комплексу спостерігалось збільшення площі контакту між протеїнами (до $S = 2536 \text{ \AA}^2$). У цьому разі показано, що Hsp90 може екранувати гідрофобну частину молекули CYP2E1 та закривати розташований поруч вхід до каналу активного центру. Як наслідок це може, по-перше, запобігати зв'язуванню субстратів з ензимом, а по-друге – зменшувати гідрофобність останнього.

Таким чином запропоновано модель взаємодії CYP2E1 з Hsp90, згідно з якою останній перешкоджає субстратній стабілізації цитохрому та сприяє його протеосомній деградації. Показано, що комплекс Hsp90 з CYP2E1 є менш гідрофобним, ніж вільний цитохром P-450 2E1, що дозволяє йому дисоціювати від мембрани та переміщуватись до цитоплазми. Завдяки цьому CYP2E1 може ставати доступним для дії цитозольних протеаз.

РОЛЬ ПОХІДНИХ ПРОТРОМБІНУ В ФОРМУВАННІ ТРОМБОЦИТАРНОГО ТА ФІБРИНОВОГО ТРОМБУ

КОРОЛЬОВА Д. С., ГОРНИЦЬКА О. В., ПЛАТОНОВА Т. М.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: d.korolova@gmail.com

Домінуючий шлях утворення тромбіну протікає через стадію мезотромбіну. Мезотромбін містить активний центр і водночас зберігає доменну будову протромбіну, що забезпечує його зв'язування з мембранами клітин. За механізмом негативного зворотного зв'язку протромбін гідролізується тромбіном до претромбіну-1, що є функціонально неактивною формою протромбіну, але взаємодіє з лігандами тромбіну за рахунок нативного екзосайту I. Як мезотромбін так і претромбін-1 можуть існувати у кровотоці *in vivo*, проте їхня роль у гемостазі залишається нез'ясованою. Тому метою нашої роботи було вивчення впливу мезотромбіну та претромбіну 1 на судинно-тромбоцитарну ланку гемостазу, зокрема, їх ролі в формуванні тромбоцитарного та фібринового тромбів.

Нами вперше розроблено метод отримання мезотромбіну, придатного для використання в модельних системах *in vitro*, який полягає в активації протромбіну іммобілізованим екамуліном – активатором протромбіну з отрути *Echis multisquamatis* – за присутності бензамідину.

У модельних системах *in vitro* показано, що мезотромбін здатен ініціювати фібриноутворення, тоді як претромбін 1 не викликає формування фібринового згустку.

Вперше показано, що мезотромбін підвищує ступінь агрегації сенсibilізованих тромбоцитів, позбавлених компонентів плазми крові. Мезотромбін також здатен викликати агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини. З'ясовано, що мезотромбін стимулює, а претромбін 1 дозозалежно пригнічує ADP-, колаген- та адреналін-індуковану агрегацію тромбоцитів.

Отже, ефект мезотромбіну та претромбіну-1 на коагуляційну ланку гемостазу є різноспрямованим: мезотромбін сприяє залученню тромбоцитів до процесу тромбоутворення та сприяє формуванню фібрино-тромбоцитарного тромбу, а претромбін-1 пригнічує вторинну агрегацію тромбоцитів. Таким чином, похідні протромбіну можуть забезпечувати додаткові механізми регуляції системи гемостазу.

АНАЛІЗ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОТЕНЦІЙНИХ ПУХЛИНОАСОЦІЙОВАНИХ АНТИГЕНІВ МЕДУЛЯРНОЇ КАРЦИНОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

^{1,2}КОСТЯНЕЦЬ О. І., ¹МАЛЮЧИК С. С., ²ДЕМІДОВ С. В.,
¹ФІЛОНЕНКО В. В., ³ГУТ І. Т., ¹КІЯМОВА Р. Г.

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
³University College London, UK
e-mail: kostjanez@ukr.net

У разі неопластичної трансформації у клітині відбувається ряд значних змін, які проявляються у появі нових антигенних властивостей малігнізованих клітин, що значною мірою визначаються антигенами клітинної поверхні, які можуть індукувати гуморальну та клітинну імунну відповідь в організмі господаря. Імунна система продукує аутоантитіла до протеїнів, які мутовані, мають неправильну укладку, надекспресовані і аберантно локалізовані в пухлинних клітинах. Ці аутоантитіла та їхні аберантні мішені можуть виступати як молекулярні сигнатури пухлин, тому вони можуть бути використані для імунотерапії та діагностики раку.

Метою нашого дослідження було ідентифікувати і охарактеризувати за допомогою SEREX-підходу (Serological expression of recombinantly expressed clones) нові пухлинні антигени медулярної карциноми молочної залози (МКМЗ), яка сильно інфільтрована лімфоцитами, що може говорити про присутність специфічних антигенів на поверхні пухлинних клітин.

Для ідентифікації пухлиноасоційованих антигенів медулярної карциноми молочної залози нами було модифіковано SEREX-метод для створення кДНК бібліотеки виснаженої проти генів імуноглобулінів, оскільки сильна інфільтрація цієї пухлини лімфоцитами унеможлиблює використання стандартної SEREX-методології для пошуку пухлинних антигенів, через дуже високий відсоток IgG позитивних клонів у генерованій бібліотеці. За допомогою первинного скринінгу бібліотеки аутологічною сироваткою було ідентифіковано 89 позитивних клонів, 59 з яких було підтверджено у разі вторинного скринінгу. Секвенування та біоінформатичний аналіз ідентифікованих клонів виявив, що вони відповідають 41 гену, 9 з яких були представлені кількома клонами.

За залученням протеїнових продуктів ідентифікованих нами генів у різні біологічні процеси ми розділили їх умовно на кілька груп, серед них протеїни, що беруть участь у процесах транскрипції, трансляції, репарації, трансдукції сигналу у клітині, клітинній адгезії, фолдингу протеїнів та ін. Слід зазначити, що 14 з виявлених нами генів раніше вже було ідентифіковано і заявлено іншими дослідниками, які працюють з SEREX-методикою, при скринінгу кДНК з різних типів пухлин, у тому числі з карциноми молочної залози. Аналіз літературних джерел дозволив нам виявити, що протеїни 5-ти генів мають імуномодулюючі властивості, зокрема впливають на функціональну активність макрофагів, експресію цитокінів та активацію Т-клітин. Ми не виключаємо, що можливо, їхня експресія зумовлює таку високу лімфоцитарну інфільтрацію МКМЗ, яка зумовлює хороший прогноз для пацієнтів, у порівнянні з іншими типами пухлин молочної залози.

Гетерологічний скринінг ідентифікованих сироватками хворих клонів на медулярну карциному молочної залози та здорових донорів дозволив виявити 8 потенційних пухлинних антигенів, які у подальшому будуть проаналізовані у широкомасштабному алогенному скринінгу сироватками хворих з різними гістологічними типами раку молочної залози. Це дозволить відібрати антигени, що можуть бути використані для імунотерапії та діагностики раку молочної залози.

ДЕФОРМОВАНА КЛІТИНА СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ – ЛАНКА ПЕРЕДАЧІ СИГНАЛУ І СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МОЛЕКУЛ, ЩО СИНТЕЗУЮТЬСЯ

КОТ Ю. Г., ПЕРСЬКИЙ Є. Е., ФАЛЬЧЕНКО К. В.

Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: epersky@list.ru

Зміна форми клітин сполучної тканини – важлива сторона їхньої життєдіяльності. Це викликає перерозподіл механічних напружень у клітинній стінці та внутрішньоклітинних структурах і призводить до зміни метаболічних процесів, у тому числі, синтезу головних конструкційних біополімерів сполучної тканини – колагену, еластину та глікозаміногліканів.

In vitro на дермі шкіри шурів та моношарах фібробластів показано, що розтягуюче напруження дерми, або підложжя моношару фібробластів підсилює синтез колагену типу I, еластину, гіалуронової кислоти, хондроїтин-, дерматан- та гепарансульфатів і впливає на процесинг цих молекул, що призводить до зміни їхньої кінцевої структури.

Показано, що рівень гідроксилування пролілу і окислювального дезамінування ϵ -NH₂-груп лізилу та гідроксилізилу у протеїнах зменшується, глікозилування OH-груп гідроксилізилу в колагені збільшується, і паралельно зменшується ступінь їхньої гідратації. Це призводить до гальмування утворення ковалентних міжмолекулярних зшивок – шифових основ у колагені. Внаслідок цього, мікрофібрили, утворені *in vitro* з колагену, який синтезувався в умовах деформації клітин, мають меншу довжину і більший діаметр, ніж ті, що синтезувалися у її відсутності. Зменшується і термостабільність таких мікрофібрил. Аналогічні зміни морфології і термостабільності виявляються і у фібрил, які формуються у дермі в умовах її деформації під дією напруження.

Шляхом інгібування активності різних клітинних структур, визначені окремі ланки ланцюга передачі сигналу щодо деформації клітини. Величина сигналу про механічне напруження прямопропорційна ступеню ковалентного міжмолекулярного зшивання колагену, N-глікозилування N-гліканів клітинної поверхні і ступеня полімеризації актинових фібрил цитоскелета. Рівень сигналу напруження зворотнoproпорційний кількості активних комплексів Ca²⁺/кальмодулін.

Таким чином, деформація сполучнотканинних клітин є складним, багато параметричним фактором регуляції будови і функціональних властивостей сполучної тканини у цілому. Ці результати дозволяють спрямовано задавати структурні властивості конструкційних біополімерів, які синтезуються у моношарах фібробластів.

ИНТЕРФЕРОНЫ КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *MGMT*

КОЦАРЕНКО Е. В., ШАПОШНИК Л. А., ЛЫЛО В. В.,
МАЦЕВИЧ Л. Л., ЛУКАШ Л. Л.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: kotsarenko_k@mail.ru

Как известно, на экспрессию гена *MGMT*, который кодирует репаративный фермент O⁶-алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазу (*MGMT*), могут влиять различные факторы, такие как одноцепочечные разрывы ДНК, алкилирующие соединения, состояние гиперметилирования промотора, различные системы внутриклеточной регуляции, например, опосредованные протеином p53 и др. В литературе все чаще появляются данные о влиянии на экспрессию гена *MGMT* различных цитокинов. Так, к примеру, есть сведения, что IF- β может снижать уровень экспрессии этого гена в клетках глиомы и нейробластомы человека. Авторы исследования связывают такое действие IF- β с опосредованным ингибированием транскрипции гена *MGMT* через индукцию протеина p53. Подобные результаты получены при изучении цитокина IL-24. В противоположность этому, комбинация цитокинов IL-1 β + IF- γ при кратковременном влиянии на панкреатические β -клетки крыс повышала уровень экспрессии гена *MGMT*. Это объяснялось, в частности, как ответ репаративной системы на повреждение ДНК, вызванное совместным действием двух цитокинов.

Цель нашей работы – изучить влияние препарата «Лаферон», т. е. рекомбинантного $\alpha 2b$ интерферона, на экспрессию гена *MGMT* на уровне протеина в клетках млекопитающих *in vitro*.

Проведена серия экспериментов по определению уровней экспрессии гена *MGMT* методом Вестерн-блот анализа в популяциях клеток человека с обработкой и без обработки интерфероном $\alpha 2b$.

В работе получены такие результаты: действующий препарат в низкой концентрации (20 ЕД/мл) увеличивает экспрессию гена *MGMT* по отношению к контролю, а в высокой концентрации (200 ЕД/мл), наоборот, приводит к снижению экспрессии этого гена относительно контроля.

На основании анализа литературных и полученных нами данных, можно сделать вывод о том, что β , γ и $\alpha 2b$ интерфероны являются модуляторами экспрессии гена *MGMT*.

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПОХІДНОГО СУБОДИНИЦІ В ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ З ЧУТЛИВИМИ ТА НЕЧУТЛИВИМИ ДО ТОКСИНУ КЛІТИНАМИ ССАВЦІВ

ЛАБИНЦЕВ А. Ю., КАБЕРНЮК А. А., КОРОТКЕВИЧ Н. В., КОЛИБО Д. В., КОМІСАРЕНКО С. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: lab.andrey@gmail.com*

Дифтерійний токсин (ДТ) – основний фактор патогенності *Corynebacterium diphtheriae*. Токсин складається з двох субодиниць: субодиниця А (SbA) є специфічною АDP-рибозилтрансферазою, яка інактивує фактор елонгації трансляції двох евкаріот; субодиниця В (SbB) відповідає за специфічне зв'язування з рецептором на поверхні клітин та транспорт SbA до цитозолю крізь їхню мембрану. Більшість ссавців чутливі до дії ДТ, але миші та щурі виявляють резистентність до дії токсину. Відомо, що на поверхні як чутливих, так і нечутливих до токсину клітин наявний функціонально-активний рецептор до ДТ; токсичність SbA, введеної в такі клітини неспецифічним шляхом, однакова. На сьогодні немає чіткого пояснення відсутності токсичного впливу ДТ на клітини вищезгаданих видів, резистентність цих клітин може бути пов'язана з особливостями функціонування SbB токсину. З метою дослідження цього питання нами було використано рекомбінантну субодиницю В дифтерійного токсину, злиту з підсиленим зеленим флуоресцентним протеїном (EGFP-SbB). Взаємодію EGFP-SbB досліджували на клітинах чутливих та нечутливих до токсину лінії *Vero* та лінії 3Т3 відповідно.

Методом проточної цитофлуориметрії показано, що протеїн EGFP-SbB специфічно взаємодіє з поверхнею клітин лінії *Vero* та лінії 3Т3. За цими даними розраховано константи афінності EGFP-SbB до клітин лінії *Vero* та лінії 3Т3, які склали $1,2 \cdot 10^7$ та $4,5 \cdot 10^6$ M⁻¹ відповідно. Хоча спорідненість EGFP-SbB до клітин лінії 3Т3 втричі нижча за спорідненість до клітин лінії *Vero*, після 20 хв інкубації, згідно даних конфокальної мікроскопії, відбувається проникнення EGFP-SbB у клітини обох ліній, незалежно від їх чутливості до ДТ. Одержані результати вказують на те, що ДТ здатен зв'язуватись з поверхнею та проникати всередину фібробластів миші (3Т3), а тому причини їх нечутливості до дії токсину можуть бути пов'язані із подальшими процесами, які відбуваються в ендосомі.

Автори висловлюють подяку пров.н.с., к.ф.-м.н. В. Ф. Горчеву та ст.н.с., к.т.н. О. Ю. Чуніхіну за допомогу у проведенні досліджень з використанням конфокального мікроскопа та проточного цитофлуориметра.

**EFFECT OF ANTICANCER ANTIBIOTIC
KIGAMICIN D ON THE EXPRESSION OF APOPTOSIS
RELATED GENES IN PANCREATIC CANCER CELLS**

*MINCHENKO D. O., HUBENYA O. V., MOENNER M.,
KATSUYA T., ESUMI H., MINCHENKO O. H.*

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
INSERM U920 Molecular Mechanisms of Angiogenesis
Laboratory, University Bordeaux 1, France;
Research Center for Innovative Oncology, National
Cancer Center Hospital, Japan;
e-mail: ominchenko@yahoo.com*

Pancreatic cancers are known to be among the most aggressive malignancies despite their poor blood supply. A novel anticancer antibiotic kigamicin D was discovered from the culture broth of *Amycolatopsis* by its selective killing activity against pancreatic cancer cell line Panc-1 using a new screening strategy that targets the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. Apoptosis related genes play a significant role in control of cell death both in normal tissues and malignant tumors as well as in the mechanism of action many anti cancer drugs. The main goal of this investigation was to examine the possible molecular mechanisms of cell death caused by kigamicin D using pancreatic cancer cell line PSN-1 and KP-3. Cells were cultured in regular DMEM media or in glucose-deprived media with or without kigamicin D (0.1 $\mu\text{g/ml}$ during 4 or 6 hours). Kigamicin D was added to the cell cultures in one hour after pre growing cells with glucose-deprived media. The expression of apoptosis related genes was studied by RT-PCR ("MasterCycler Personal", Eppendorf), quantitative PCR "Stratagene Mx 3000P cycler" and Western blot analysis.

A result of this investigation shown that kigamicin D suppresses the expression of mRNA Bax induced by glucose starvation but induces the accumulation of BAX protein in mitochondria of PSN-1 cancer cells. Moreover, kigamicin D initiates cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol. Because circadian factor Clock and activating transcription factor 4 (ATF4) transcription systems regulates drug resistance in human cancer cell lines we have also studied effect of glucose-deprivation and kigamicin D on the expression of Clock and ATF4 mRNA in pancreatic cancer cell line PSN-1. It was shown that glucose starvation significantly induces expression of Clock mRNA and slightly – ATF4. Kigamicin D was observed to block completely the expression of both Clock and ATF4 induced by glucose starvation in these cancer cells.

Moreover, we have shown that the expression of p53-induced apoptosis effector protein (PERP) was significantly increased in glucose starvation conditions and that kigamicin D was also induced PERP mRNA expression in glucose-deprived conditions. GADD45 mRNA expression was significantly increased in PSN-1 cancer cells in glucose-deprived conditions, but strongly decreased in cells treated with kigamicin D. We have also shown that human glioma cancer cell line U87 is sensitive to kigamicin D without glucose starvation. Moreover, subline of these cancer cells without IRE-1 α signaling are more sensitive to killing by kigamicin D. Blockade of IRE-1 α signaling in U87 glioma cells leads to

significant increase in Clock and especially death receptor 6 mRNA expression as well as suppress ATF4 and clusterin mRNA expression.

Thus, our results showed that kigamicin D selective killing activity is also mediated by induction of BAX translocation to the mitochondria and cytochrome c release from the mitochondria to the cytosol in two different pancreatic cancer cell lines as well as also by induction of p53-induced apoptosis effector protein PERP and decreased of GADD45 mRNA expression in PSN-1 cells.

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ТА ДИСРЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ У НОРМІ ТА ЗА РІЗНИХ ФОРМ ПАТОЛОГІЇ

¹МІНЧЕНКО О. Г., ²МОНЕ М., ¹МІНЧЕНКО Д. О., ¹БОЖКО І. В.,
¹КАРБОВСЬКИЙ Л. Л., ¹ЛИПОВА Н. М.

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

²Лабораторія молекулярних механізмів ангіогенезу,

Університет Бордо 1, Франція;

e-mail: ominchenko@yahoo.com

Дослідження останнього десятиліття переконливо свідчать про надзвичайно важливе значення експресії великої групи генів при різних фізіологічних станах організму та у разі різноманітних форм патологічних процесів і розкривають молекулярні механізми регуляції та дисрегуляції експресії генів. Так, при гіпоксії, що спостерігається як у фізіологічних умовах, так і при численних захворюваннях різної етіології, змінюється експресія генів, протеїнові продукти яких необхідні для компенсації ефектів дефіциту кисню як на рівні клітини, так і на рівні організму: активація транспорту глюкози та гліколізу, еритропоезу та ангіогенезу, посилення біосинтезу певної групи протеїнів та загальне пригнічення процесів біосинтезу протеїнів. Разом з тим, спектр генів, що активуються в умовах гіпоксії, суттєвим чином визначається факторами ініціації гіпоксичних станів, оскільки при травмах активується експресія генів, які відповідають за регенерацію ушкоджених тканин, у злоякісних пухлинах активуються гени факторів росту і пригнічується експресія тих генів, що протидіють росту пухлин; за умов інтенсивної фізичної роботи у скелетних м'язах індукується експресія генів, відповідальних за збільшення маси м'язової тканини.

У разі ішемії, компонентами якої є не лише дефіцит глюкози та інших поживних речовин, а і гіпоксія, активується експресія генів, які відповідають, перш за все, за регенеративні процеси та відновлення кровообігу, а також за компенсацію ефектів дефіциту кисню. Внаслідок цукрового діабету порушується експресія генів, залежних від сигнального каскаду, опосередкованого рецептором інсуліну: транспорту та метаболізму глюкози, біосинтезу нуклеїнових кислот та протеїнів. Разом з тим, як в умовах гіпоксії, ішемії, цукровому діабеті, у клітинах злоякісних пухлин, так і при дії багатьох інших чинників змінюється експресія цілого ряду генів, що не мають безпосереднього відношення до протидії ефектам гіпоксії, ішемії чи злоякісного росту, а є реакцією клітин на порушення функціонального стану клітин чи метаболічних процесів в них. Недавно було встановлено, що у клітинах при дії

різноманітних чинників суттєво порушується формування правильної конформації протеїнів та їх накопичення у ендоплазматичному ретикулумі і що існують системи з підпорядкованими сигнальними шляхами, які досить швидко відчують їх появу та збільшення кількості. У цьому випадку в клітинах активується адаптивна реакція для їхнього виживання, яка представляє собою комплекс внутрішньоклітинних сигнальних подій на порушення згортання протеїнів та їх накопичення у ендоплазматичному ретикулумі, які сприймаються рядом сенсорних сигнальних систем: активуючого транскрипційного фактора б, специфічної кінази ендоплазматичного ретикулуму та система, що пов'язана із сигнальним ензимом ендоплазматичний ретикулум–ядро-1, які опосередковують реакцію клітин на так званій “стрес ендоплазматичного ретикулуму”. Всі вони є мембранними протеїнами, сенсорна частина яких знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму і взаємодіє з неправильно сформованими протеїнами за участі шаперонів, а направлена у цитоплазму частина контролює опосередковані ними сигнальні шляхи, змінюючи експресію сотень генів для того, щоб вивести клітину зі стану “стресу”, щоб нормалізувати згортання протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі або знищити такі клітини шляхом індукції апоптозу. На клітинах з пригніченою експресією сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум–ядро-1 досліджено вплив гіпоксії та ішемії на експресію ряду генів, що контролюють проліферацію та апоптоз клітин.

ТРАНСЛЯЦІЙНІ МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯРНІ КОМПЛЕКСИ

*НЕГРУЦЬКИЙ Б. С., ФУТЕРНИК П. В., ВЕРЕМ'ЄВА М. В.,
ШАЛАК В. Ф., ЕЛЬСЬКА Г. В.*

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: negrutskii@imbg.org.ua*

Комплекси двох чи більше макромолекул, що виконують єдину загальну функцію, є явищем доволі розповсюдженим в еукаріотичних клітинах. У трансляції такі формування беруть участь в ініціації і елонгації поліпептидного ланцюга на рибосомі, забезпечують синтез і каналювання аміноацил-тРНК для протеїнового синтезу, виконують регуляторні функції шляхом вивільнення того чи іншого свого компонента у цитоплазму.

Лабільний комплекс $eEF1A \cdot GDP \cdot tRНК$ є одним із компонентів системи векторіального транспорту тРНК в еукаріотичному трансляційному циклі. Будуть наведені нові дані, на основі яких запропоновано, що $eEF1A \cdot GDP$ є платформою для елонгаторних і ініціаторних тРНК, що вивільнилися під час трансляції на рибосомі і очікують на чергове аміноацилювання відповідними аміноацил-тРНК-синтетазами.

Стабільний комплекс фактора елонгації трансляції $eEF1H$, що складається із $eEF1A$ та субкомплексу $eEF1B$ ($eEF1B\alpha$, $eEF1B\beta$ і $eEF1B\gamma$ субодиниці), забезпечує кодон-залежну взаємодію аміноацил-тРНК з А сайтом програмованої рибосоми. Оскільки нещодавно були відкриті важливі регуляторні функції індивідуальних субодиниць інших трансляційних комплексів, ми вважали за важливе дослідити,

чи є імовірним індивідуальне існування субодиниць eEF1B в тканинах пухлин різної локалізації людини. Встановлено, що кількість різних субодиниць цього комплексу в пухлинах людини у порівнянні з нормою змінюється некоординовано. Імуногістохімічні дослідження показали різний характер ядерно-цитоплазматичної локалізації субодиниць eEF1B. Це підтверджує можливість ізольованого від комплексу існування субодиниць eEF1B у пухлинній тканині та вказує на ймовірність індивідуального функціонування компонентів такого комплексу.

Для розкриття просторової організації і специфічних функцій компонентів комплексу eEF1B, всі його субодиниці були надекспресовані в *E. coli* і очищені у препаративній кількості. Проведено аналіз активності eEF1B α і eEF1B β субодиниць у GDP/³HGDP обміні в молекулі eEF1A, розпочато дослідження структури комплексу.

Дослідження виконувалися частково за рахунок коштів проекту Ф28/276 – 2009 і Програм співробітництва між НАНУ і CNRS.

КОМЕТНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СТАРОГО МЕТОДА

СИВОЛОБ А. В., АФАНАСЬЕВА К. С., ЗАЖИЦКАЯ М. О.

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: sivolob@univ.kiev.ua*

Гель-электрофорез изолированных клеток (кометный электрофорез) – популярный метод, широко используемый для оценки в ДНК уровня повреждений. ДНК нуклеоидов, приготовленных путем лизиса заплавленных в агарозу клеток – формирует во время электрофореза вытянутый трек, напоминающий хвост кометы. Две известные модификации метода предполагают проведение электрофореза при нейтральных и высокощелочных рН. Относительное содержание ДНК в хвосте кометы пропорционально частоте разрывов ДНК, однако физические механизмы выхода ДНК не до конца понятны. Существуют две точки зрения. Первая отводит главную роль фрагментам ДНК, возникающим в результате разрывов: при этом широко распространено мнение, что электрофорез в щелочных условиях позволяет детектировать одноцепочечные разрывы, а нейтральный электрофорез – двухцепочечные. Согласно второй точке зрения, при обоих типах электрофореза хвост кометы формируется за счет удлинения петель ДНК, прикрепленных к ядерному матриксу и релаксированных вследствие разрывов.

Мы впервые исследовали кинетику выхода ДНК при кометном электрофорезе. Наши результаты полностью доказывают, что в нейтральных условиях и при низких уровнях повреждений хвост кометы формируется релаксированными петлями. Проводя электрофорез клеток, не обработанных никакими повреждающими агентами, при разных концентрациях интеркалирующих красителей, мы продемонстрировали, что выход петель существенно ускоряется при условии релаксации торсионных напряжений в петле. Более того, в случае сохранения некоторого уровня напряжений при отключении электрического поля наблюдается исчезновение хвостов кометы – петли, подобно пружинам, восстанавливают свое компактное

состояние. Такой же механизм — облегчение выхода петли вследствие релаксации — срабатывает и в том случае, когда релаксация является результатом одноцепочечных разрывов, индуцированных малыми дозами ионизирующих излучений (достаточно одного разрыва на петлю). Кинетика формирования комет после облучения высокой дозой свидетельствует о том, что накопление одноцепочечных разрывов приводит к фрагментации ДНК: при длительном электрофорезе хвост отрывается от головы кометы.

Щелочной электрофорез, в отличие от нейтрального, не имеет никакого отношения к петлям ДНК. Наши результаты указывают, что щелочная обработка приводит к нарушению связи ДНК с матриксом, вследствие чего петли просто перестают существовать. Хвост кометы в этом случае, по-видимому, сформирован одноцепочечными фрагментами ДНК, которые вытягиваются из клубка за один конец силами электрического поля.

Наши результаты позволяют утверждать, что кинетический подход, в отличие от стандартно используемого фиксированного времени электрофореза, существенно увеличивает чувствительность и область применимости метода. Исследование кинетики выхода ДНК в присутствии интеркаляторов позволяет не только существенно увеличить разрешение и дискриминировать разные уровни повреждений, но и использовать кометный электрофорез для изучения связи петлевых доменов с ядерным матриксом, а также оценки уровня торсионных напряжений в ДНК клеток разных типов и при разных функциональных состояниях.

РІЗНОМАНІТНІСТЬ ФУНКЦІЙ ТА МЕХАНІЗМІВ СИГНАЛІНГУ НІКОТИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У РІЗНИХ ТИПАХ КЛІТИН

СКОК М. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: skok@biochem.kiev.ua*

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR) належать до ліганд-залежних іонних каналів, які опосередковують швидку синаптичну передачу в нервово-м'язових з'єднаннях та автономних гангліях. У нейронах центральної нервової системи вони здебільшого генерують локальну деполаризацію мембрани, необхідну для регуляції інших іонних каналів та вивільнення нейромедіаторів. У незбудливих клітинах функції nAChR часто полягають у модуляції дії рецепторів, характерних для цих клітин, причому в деяких випадках ці функції не пов'язані з діяльністю іонного каналу. Дослідженнями нашої групи було показано, що В-лімфоцити миші експресують два головних субтипи nAChR, $\alpha 4\beta 2$ та $\alpha 7$, які приймають участь в регуляції розвитку та активації цих клітин. Було знайдено, що субтип $\alpha 4\beta 2$ фізично зв'язаний з антигенспецифічним рецептором В-лімфоцитів, а $\alpha 7$ -вмісний — з ко-стимуляторною молекулою CD40. Відсутність цих рецепторів у нокаутних тварин або їх блокування у мишей дикого типу призводить до посилення мітогенної активації В-лімфоцитів і прискорення первинної імунної відповіді.

Потужним інструментом для вивчення функцій та механізму дії nAChR в незбудливих тканинах виявились антитіла, специфічні до позаклітинного домену

(1-208) $\alpha 7$ -субодиниці. За допомогою цих антитіл було з'ясовано, що $\alpha 7$ nAHR підтримують життєздатність В-лімфоцитів, регулюють ріст сполучної тканини і запальні процеси у селезінці мишей, а також накопичення загальної ваги тіла. Таким чином, зв'язування антитіл викликало в незбудливих клітинах сигнальні події, подібні до дії нікотину. З іншого боку, проникнення таких антитіл через гематоенцефалічний бар'єр за умов запалення призводило до зниження кількості nAHR у певних відділах мозку і порушення процесів пам'яті у імунізованих тварин.

Про різноманітність функцій nAHR свідчить їх наявність в мітохондріях мишей, вперше встановлена нашими дослідженнями. Виявилось, що $\alpha 7$ -вмісний nAHR фізично зв'язаний з потенціалзалежним аніонним каналом зовнішньої мембрани мітохондрій і, ймовірно, регулює його іонну селективність/провідність. У цьому разі зв'язування як агоністів, так і конкурентного антагоністу $\alpha 7$ nAHR чинить подібний ефект, тобто функціонування nAHR в мітохондріях не потребує відкриття іонного каналу.

Одержані дані свідчать про універсальну роль nAHR у клітинах вищих тварин. Цей еволюційно древній рецептор експресований в тканинах різного походження і пристосований до виконання тканиноспецифічних функцій. У збудливих клітинах він працює як іонний канал, змінюючи в тій чи іншій мірі мембранну провідність. У незбудливих клітинах (зокрема В-лімфоцитах) і у мітохондріях його функція полягає в модуляції активності сусідніх рецепторів, вірогідно, шляхом алостеричних впливів, які можуть бути ініційовані зв'язуванням класичних агоністів, конкурентних антагоністів або антитіл, специфічних до позаклітинної частини nAHR. Природа рецептора-партнера залежить від типу клітини та субтипу nAHR, який визначає його фармакологічну чутливість та приєднання до відповідних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів.

СТРУКТУРНІ ПЕРЕДУМОВИ АГРЕГАЦІЇ МУТАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ АМІЛОЇДОЗУ

СОКОЛІК В. В.

ДУ «Інститут неврології, психіатрії і наркології АМН України», Харків;
e-mail: Sokolik67@rambler.ru

Агрегація будь-яких протеїнів спостерігається у разі порушення їхньої нативної конформації у результаті генетичних мутацій або за дії фізичних і хімічних ушкоджуючих факторів. Проте, відомо досить невеликий перелік конформаційних захворювань, які завдячують агрегації індивідуальних протеїнів у разі порушення їхньої просторової структури.

Мета роботи полягала у моделюванні просторової структури нативної і мутантної форм β -амілоїдного пептиду 1-40/42, протеїнів синуклеїнів (α , β і γ), паркіну, хантингтону та узагальненні специфічних для них структурних передумов агрегації з утворенням амілоїдів.

Структурні шаблони протеїнів будували *in silico* розробленим нами методом за нуклеотидними послідовностями, що їх детермінують, користуючись інформаційним ресурсом бази даних EMBL (Y00264 mRNA. Translation: CAA68374.1., L08850 mRNA – AAA16117.1., S69965 mRNA – AAB30860.1., AF010126 mRNA – AAB64109.1.,

AB009973 mRNA – BAA25751.1, L12392 mRNA – AAB38240.1), уявленням про три ротамерних варіанти конфігурації (R, 0 і L) пептидного зв'язку і таблицею генетичного коду просторової структури протеїну. Візуалізували просторову структуру протеїнів у графічному редакторі Genedit. exe.

Аналіз моделей β -амілоїдного пептиду 1-40/42, протеїнів родини синуклеїнів (α , β і γ) та паркіну показав, що їхня агрегація відбувається унаслідок формування міжмолекулярного антипаралельного β -складчатого прошарку. Затравками амілоїдів слугують β -амілоїдний пептид 1-42 та мутантна форма α -синуклеїну. β і γ -Синуклеїни мають компакту глобулярну конформацію з щільно упакованими спіральними фрагментами, на відміну від проагрегантного α -синуклеїну, тому не мають структурних підстав для агрегації. β -Амілоїдний пептид 1-40, паркін або нативний α -синуклеїн рекрутуються до гетероагрегатів завдяки наявності у їхній структурі чималої кількості β -тяжів.

Встановили, що на структурному шаблоні хантінгтону поліглутамінова зона представлена лівою спіраллю з гвинтовою орієнтацією бокових радикалів глутамінових залишків. У просторовій структурі мутантного хантінгтону подовження поліглутамінового фрагменту у 1,5–2 рази призводить до його експонування за межі глобули і слугує місцем взаємодії з подібними поліглутаміновими ділянками інших протеїнів за принципом застібки-блискавки. Затравкою у формуванні гетероагрегатів у разі цього конформаційного захворювання виступає саме мутантний хантінгтон.

Таким чином, окремі специфічні протеїни, що мають структурні передумови до агрегації, у мутантній формі спричинюють ініціацію конформаційної патології з подальшим розвитком амілоїдозу.

COMPLETE MOLECULAR CONFIDENCE: FROM MOLECULAR FORMULA DETERMINATION TO AUTOMATED STRUCTURE VERIFICATION

¹THIELE HERBERT, ²EICHHOFF UWE

¹*Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany;*

²*Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany;*

e-mail: Uwe.Eichhoff@bruker-biospin.de

Mass spectroscopy and NMR spectroscopy together with intelligent software can provide a complete solution for the determination of molecular structures. The starting point is a highly precise mass spectrum. At mass 500 m/z with a mass accuracy of 5ppm about 7500 sum formulae are possible, at 2 ppm about 3000 hits and at 1ppm about 1500 hits.

Even with a mass accuracy of 2 ppm at mass 300 m/z, 100 sum formulae are possible based on mass accuracy only. The True Isotope Pattern (TIP) is an additional valuable parameter, but only, if the TIP can be measured with at least 2% accuracy. This became possible after the introduction of a highly precise analog-to-digital-converter (ADC) instead of a time-to-digital-converter (TDC). After comparing the calculated TIP with the experimental spectrum only a small number of possible sum formulae remain. Then additionally MS/MS data are acquired the sum formulae for fragment ions can again be

generated based on the exact mass and the isotopic pattern. These sum formulae list can be used for the reduction of possible precursor sum formulae list by using the following logic: every “true” fragment formula must be a sub-set of the “true” parent formula.

This task is done *automatically* also for the MS/MS information. Taking Erythromycin as an example by combining the fragment ion sum formulae information SmartFormula3D can reduce the list of 15 sum formulae hits to only 1 hit.

So far we have determined the sum formula and we know the type and number of the atoms in the compound under investigation. The next step is the determination of the molecular structure by NMR. Based on the structure supplied in the *MOL File* an NMR spectrum is *predicted* and compared and adapted to the experimental spectrum in an iterative process. The result is analysed with regard to chemical shifts, coupling constants and intensities. The similarity for each signal is evaluated and the probability that the structure correlates with the experimental data is calculated for all signals. If 2D ¹H/¹³C HSQC data are available the analysis can be done for both dimensions and nuclei. NMR is quantitative, i.e. for any compound you can directly correlate the NMR intensity with the sample amount.

This approach comes close to the chemists dream of an automatic quantitative structure determination of unknown chemical compounds.

METALLOTHIONEINS OF AQUATIC ANIMALS: INTERACTION OF BUFFERING AND SCAVENGING FUNCTIONS

¹FALFUSHYNSKA H. I., ¹GNATYSHYNA L. L., ¹ROMANCHUK L. D.,
¹STOLIAR O. B., ²DALLINGER R., ³NAM Y. K.

¹Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine;
²Leopold-Franzens-Universität Innsbruck, Austria;
³Pukyong National University, Busan, Korea;
e-mail: Oksana.Stolyar@gmail.com

Metallothioneins (MTs) are stress-proteins with metal-keeping and antioxidant functions which parity in the hitting organism is unclear. The MTs are usually characterised by their concentration in the tissue and/or by the level of expression of their genes. None of these approaches can give a comprehensive evidence of the ability of MTs to bind metals, mainly Zn or Cu (in vertebrate or invertebrate correspondingly) and Cd, and also to realise radical scavenging function. The discrepancy of the levels of expression and protein for MTs (Hansen et al., 2006) as well as of results from the assays for MTs based on SH quantification and metal evaluation (Zorita et al., 2005) was shown for the aquatic animals in field conditions. Therefore, the aim of this study was to compare the reactivity of MTs and their separated domains in three animal species that represent different phyla. The MTs of fish *Carassius auratus gibelio* are utilised mostly for Zn storage that is typical of vertebrate, MTs of bivalve mollusc *Anodonta cygnea* are more successful in the binding of Cu, and MTs of frog *Rana ridibunda* are functioning in the conditions of high concentration of Cu unbound to MTs within the cells.

The animals were caught in the same unpolluted field area. MTs were separated from the liver/digestive gland. MTs and their Cd-saturated alpha-domain and Cu-saturated

beta-domain were isolated by the gel-permeation chromatography in a medium containing 2-mercaptoethanol to avoid their oxidation. For the partial hydrolyses of MTs the subtilisin was used. The concentration of SH-groups was measured by the Ellman's reagent (DTNB). The reactivity of SH groups in the MTs of frog were additionally examined after the effect of Cu^{2+} (0.01 mg/l) and Zn^{2+} (0.1 mg/l) ions on the organism. H_2O_2 was utilised as the oxidising agent.

MTs of each species were represented by the form with molecular mass about 7–9 kDa and, for mussel, also by oligomer (12 kDa) and low molecular weight form (4 kDa). The alpha- and beta-domains of MTs with molecular weights of about 4 kDa were separated by the size-exclusion chromatography on Sephadex G-50. For frog and mussel the elution of beta-domain was accompanied by 12 kDa form. The alpha-domain in frog's MTs created 16 kDa form, especially under the effect of Cu or Zn on the animal or of H_2O_2 on the MTs. For fish, only 16 kDa by-product was shown both for alpha- and beta-domains. The reaction with excess DTNB was biphasic and rate constants were clearly DTNB dependent. For the first phase, higher reactivity of beta-domain (and its by-product) than that of alpha-domain (and its by-product) was shown for fish that is typical of higher vertebrates. The opposite regularity was demonstrated for frog and mussel. In mussels, for all forms, a slow reaction phase was exhibited first, followed by Cu-saturated forms by a fast reaction phase. Due to the ability to create oligomers and reactivity with H_2O_2 , partial oxidation of MTs and their separated domains in mussels and especially in frogs was the reason for the lower reactivity of SH-groups with DTNB, whilst in fish it is correspondent to higher ... metal-thiolate clusters. The distorting of metal-buffering and antioxidant functions of MTs seems to be one of the peculiarities of the total injury provoked in molluscs and frogs by complex pollution. So it was revealed that fish possesses a higher activity of the beta-domain

This work has been granted by the Ministry of Education and Science of Ukraine (#M/256-2008, #M/13-2009) and West-Ukrainian Biomedical Research Centre.

INTERACTION BETWEEN SUBUNITS OF TRANSLATION ELONGATION FACTOR 1B: TWO APPROACHES TO STUDY THEIR COMPLEXES *IN VITRO*

¹SHALAK V., ¹LIUDKOVSKA V., ²TIMCHENKO A., ¹NEGRUTSKII B.

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Puschino;
e-mail: slavikshalak@yahoo.com*

Translation elongation step in higher eukaryotes is insured by three different elongation factors: eEF1A, eEF1B and eEF2. eEF1B consists of three subunits α , β and γ , forming tight complex. eEF1B α and eEF1B β catalyze the GDP/GTP exchange on eEF1A, whereas eEF1B γ is considered to be a structural component. Larger complex between eEF1A and three subunits of eEF1B is also called eEF1H – the heavy form of translation elongation factor 1. Although several models of its macromolecular organization have been proposed,

none was accepted as a correct one. They are contradictory to each other with respect to subunit stoichiometry and molecular weight of the complex.

Recombinant eEF1B α , eEF1B β and eEF1B γ subunits were produced in bacteria and purified to homogeneity. eEF1B α and eEF1B β were proved to catalyze [³H]GDP/GDP exchange on eEF1A *in vitro*. Molecular masses of all three subunits in solution were estimated by gel filtration on Superose 6 column and sedimentation velocity analysis using SEDFIT program. Gel filtration of individual subunits showed unusual molecular masses for all of them: eEF1B α was estimated to be 72 kDa, eEF1B β – 350 kDa and – 150 kDa. Sedimentation velocity showed a protein of 25 kDa with extended shape for eEF1B α , a protein of 75 kDa with extended shape for eEF1B β and nonglobular protein of 78 kDa for eEF1B γ . Theoretical molecular masses for these recombinant proteins were 27, 35 and 50 kDa, respectively. In this respect, we concluded that the most probably eEF1B α and eEF1B γ are monomers in solution, whereas eEF1B β is a dimer. All these proteins are nonglobular with extended shape.

To visualize the complex formation between different recombinant subunits, we used agarose gel electrophoresis in native conditions. The molecular weight of reconstituted complexes was also determined by gel filtration technique. By agarose gel electrophoresis we readily detected stable binary eEF1B $\alpha\gamma$, eEF1B $\beta\gamma$ and ternary eEF1B $\alpha\beta\gamma$ complexes, when mixing equimolar amounts of each component. Using Superose 6 column, complexes eEF1B $\alpha\gamma$ and eEF1B $\beta\gamma$ were determined to be about 400 and 900 kDa, respectively. Molecular mass of stable ternary eEF1B $\alpha\beta\gamma$ was estimated to be more than 1MDa.

From our studies we propose the model for eEF1B $\alpha\beta\gamma$ complex organization that will be discussed.

АКТИВАЦИЯ ПЛАЗМИНОГЕНА СТРЕПТОКИНАЗОЙ, МОНОКЛОНАЛЬНЫМ АНТИТЕЛОМ IV-1С, Е-ФРАГМЕНТОМ ФИБРИНОГЕНА

ЮСОВА Е. И., ГРИНЕНКО Т. В.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: yusova07@mail.ru*

Ключевым этапом фибринолитического процесса является реакция активации плазминогена до плазмина. Известны энзиматический и неэнзиматический пути активации плазминогена. При физиологических условиях плазминоген активируется высокоспецифическими протеиназами – тканевым активатором и урокиназой, которые гидролизуют в проэнзиме активационную пептидную связь Arg561-Val562 с последующим формированием активного центра. Экзогенный активатор стрептокиназа активирует плазминоген неэнзиматическим путем. Она образует комплекс с проэнзимом, вызывая конформационные перестройки в протеиназном домене, что приводит к формированию активного центра без расщепления активационной пептидной связи. Моноклональное антитело IV-1с против Glu-плазминогена человека и Е-фрагмент фибриногена индуцируют появление каталитической активности при взаимодействии с плазминогеном.

Целью работы было сравнить активацию плазминогена стрептокиназой, моноклональным антителом IV-1с и E-фрагментом фибриногена и выявить общие закономерности неэнзиматической активации плазминогена.

Установлено, что во всех случаях необходимо образование эквимольного комплекса проэнзима и активатора. Взаимодействие должно быть двухцентровым с участием серинпротеиназного и одного из некаталитических доменов проэнзима. Обязательным условием является изменение конформации плазминогена в составе комплекса и способность комплексов проявлять активаторную активность по отношению к субстратному плазминогену, которая зависит от времени его существования.

Таким образом, определены характерные особенности неэнзиматической активации плазминогена экзогенными активаторами.

СТЕНДОВІ ПОВІДОМЛЕННЯ

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРКАЛЯТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫХОДА ДНК ПРИ НЕЙТРАЛЬНОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК (КОМЕТНОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗЕ)

АФАНАСЬЕВА К. С., НАДТОЧИЙ А. А., СИВОЛОБ А. В.

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: aphon@ukr.net*

Исследована кинетика выхода петельных доменов ДНК при нейтральном кометном электрофорезе в присутствии разных концентраций интеркалирующих красителей – бромистого этидия и хлорокина.

В интактных лимфоцитах в отсутствие интеркалирующих красителей доля комет сохраняется на низком уровне до 30 мин электрофореза, после чего начинает возрастать и составляет практически 100% через 80 минут. Таким образом, при достаточно длительном времени электрофореза внешняя электрическая сила заставляет ДНК сформировать хвост кометы даже в неповрежденных клетках. Данный результат указывает на то, что хвост кометы интактных клеток сформирован петлями ДНК, закрепленными на ядерном матриксе, которые после удаления в процессе лизиса белков хроматина приобретают отрицательную сверхспирализацию. Вытягивание такой петли к аноду под действием электрического поля затруднительно и требует длительного времени, однако снятие такого напряжения должно облегчить выход комет. Действительно, клетки, облученные небольшой дозой рентгеновских лучей, формируют 100% комет уже на 20-й минуте электрофореза, видимо, за счет релаксации петли одноцепочечными разрывами, индуцированными радиацией.

Одним из способов снятия отрицательного напряжения в ДНК является локальное раскручивание двойной спирали за счет взаимодействия ДНК с интеркалирующими красителями (бромистым этидием или хлорокином). При добавлении в электрофоретический буфер бромистого этидия в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл наблюдается существенное ускорение выхода комет. Аналогичная картина наблюдается и для другого интеркалятора – хлорокина, однако при более высоких концентрациях (10–50 мг/мл), что объясняется разницей в константах связывания этих двух веществ с ДНК. Доля клеток с кометами в данных условиях достигает плато на уровне 100% уже на 30-й минуте электрофореза. Увеличение концентраций этидия и хлорокина (и соответственно плотности их связывания с ДНК), видимо, приводит к накоплению торсионных напряжений уже положительного знака, которые снова тормозят выход комет – даже в сравнении с кинетикой выхода ДНК в отсутствие красителей. Максимально высокие концентрации красителей ($35 \cdot 10^{-5}$ мг/мл для этидия и 1 мг/мл для хлорокина) делают выход петель ДНК невозможным – доля клеток с кометами составляет 0,07–0,1 и не возрастает по мере длительности электрофореза.

Описанный подход, с одной стороны, открывает возможность оценки топологического состояния ДНК в ядрах различных клеток при различных функцио-

нальних состояниях – путем определения концентрации интеркаляторов, наиболее ускоряющих образование комет. С другой стороны, обнаруженные эффекты позволяют предложить ряд усовершенствований методики кометного электрофореза.

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ ДІЇ ЦИТОКІНУ ЕМАР ІІ НА КСЕНОТРАНСПЛАНТАТИ АДЕНОКАРЦИНОМИ ПРОСТАТИ ЛЮДИНИ У МИШЕЙ ЛІНІЇ СВА

¹БАБЕНКО Л. А., ²ЧАЙКОВСЬКА Л. В., ²РЕЗНИКОВ О. Г., ¹КОРНЕЛЮК О. І.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

²ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин

ім. В. П. Комісаренка АМН України», Київ;

e-mail: babenko_lesia@ukr.net

Дослідження процесів, які лежать в основі взаємодії злоякісних новоутворень з організмом-хазяїном, мають теоретичні підстави для розробки нових антипухлинних препаратів і підходів до лікування онкологічних захворювань. ЕМАР ІІ – ендотеліальний та моноцитарноактивуючий поліпептид ІІ, попередником якого є протеїн р43 – компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК-синтетази вищих еукаріот. Після розщеплення протеїну р43 його С-кінцевий домен – ЕМАР ІІ проявляє неканонічну цитокінову активність. Встановлено, що ЕМАР ІІ має протизапальну активність, підсилює прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин людини, стимулює позитивний хемотаксис у моноцитів та лейкоцитів, бере участь у деяких патологічних процесах, є інгібітором ангиогенезу та здатен викликати апоптоз у культурі клітин. Для цього цитокіну показано здатність підвищувати експресію фактора некрозу пухлин α (TNF α) в ендотеліальних клітинах. Здатність ЕМАР ІІ інгібувати неоангиогенез та стимулювати апоптоз ракових клітин стала основою для його дослідження в якості протипухлинного лікарського засобу. Слід зазначити, що одним з багатообіцяючих напрямків таргетної терапії є використання антиангіогенних, прокоагулятивних та проапоптичних лікарських засобів.

Метою даної роботи було дослідження дії ЕМАР ІІ на ріст ксенографтів аденокарциноми простати людини, трансплантованих мишам лінії СВА. В експериментах використовували рекомбінантний ЕМАР ІІ, одержаний шляхом експресії у клітинах *E. coli* штаму BL21(DE3)pLysE з використанням вектора рЕТ30а-ЕМАР ІІ. Рекомбінантний протеїн був очищений методом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA агарозі та додатково очищений після розщеплення ентерокиназою. Для вивчення протипухлинної дії препаратів протеїну використовувався підкапсулярний тест Богдена. В експерименті були задіяні групи тварин, які отримували 5, 10 та 100 мкг/кг ЕМАР ІІ відповідно.

Внаслідок проведених досліджень експериментально показано здатність рекомбінантного протеїну ЕМАР ІІ інгібувати ріст ксенографтів аденокарциноми простати людини, трансплантованих мишам. Показано також залежність активності препарату від його концентрації. Протипухлинну активність ЕМАР ІІ підтверджено даними гістологічних досліджень.

Одержані результати свідчать про перспективність використання генно-інженерного ЕМАР ІІ як нового протипухлинного препарату в онкології.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРОЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ Ca^{2+} И Mg^{2+} С МЕТИЛИДЕН РОДАНИНОМ И ЕГО АНИОНОМ В РАМКАХ ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛА ПЛОТНОСТИ

БАРЫШНИКОВ Г. В., МИНАЕВ Б. Ф., МИНАЕВА В. А.

*Черкасский национальный университет
имени Богдана Хмельницкого, Украина;
e-mail: glebchem@rambler.ru*

Квантово-химическим методом теории функционала плотности с использованием гибридного функционала B3LYP в базисе атомных 6-31+G(d) рассчитаны равновесные геометрические и энергетические параметры различных конформаций комплексов Ca^{2+} и Mg^{2+} с 5-метилден-2-тиоксогидантоидин-4-оном (метилиден роданином) и его анионом в соотношении 1 : 1.

В ряде работ сообщается о возможности блокирования метилиден роданином кальцийзависимых энзимов, а именно кальцийсодержащей аспартил протеазы. Ионы Mg^{2+} , будучи изоморфными ионам Ca^{2+} , встречаются в организме человека в схожих сенсорных системах, а также входят в состав некоторых кофакторов и активаторов энзимов: репликации нуклеиновых кислот, биосинтеза белка, Mg^{2+} -зависимых АТФ-аз, ацетилхолинстеразы и др. Учитывая данный факт, нами также предсказана возможность блокирования метилиден роданином ионов Mg^{2+} , как изоморфных ионам Ca^{2+} . Для понимания механизма блокирующего действия метилиден роданина и его аниона нами рассмотрены возможные модели моно- и бидентатного связывания ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} .

На основании проведенных квантово-химических расчетов мы пришли к следующим выводам:

1. Связывание ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} нейтральной формой метилиден роданина может осуществляться по моно- и бидентатной схемам с образованием планарных и непланарных конформаций. Наиболее вероятной моделью связывания является бидентатная координация катиона металла через атом кислорода карбонильной группы и атом углерода метиленовой группы.

2. Связывание ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} анионной формой метилиден роданина может осуществляться исключительно по бидентатным схемам. Наиболее вероятной моделью связывания является бидентатная координация катиона металла через атом серы тиокетонной группы и атом азота роданинового цикла.

КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ВЗАЄМОДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНІВ С-97 ТА С-99 ІЗ СУБФРАГМЕНТОМ-1 МІОЗИНУ МІОМЕТРІЯ

БЕВЗА О. В., БЕВЗА А. А.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: sbevza@biochem.kiev.ua*

Хімічною платформою для конструювання потенційно біологічно активних сполук можуть слугувати циклічні олігомери фенолів, зокрема калікс[4]арени. Ре-

човини цього класу виявляють широкий спектр біологічної активності. Молекула міозину досить значних розмірів. Тому субфрагмент-1 (S-1) є зручною моделлю для досліджень завдяки його високій розчинності у водних розчинах із низькою іонною силою (на відміну від міозину) та його АТР-азній активності, яка близька до активності нативного міозину. В роботі було використано просторову структуру S-1 міозину, ідентифікатор 1B7T в RSCB Protein Data Bank. Було проведено комп'ютерне моделювання можливих міжмолекулярних взаємодій, характерних для комплексів каліксарен (ліганд) – субфрагмент-1 міозину (рецептор), і дослідження взаємного впливу АТР та калікс[4]аренів С-97 і С-99 на орієнтацію даних лігандів у ліганд-зв'язувальному центрі (ЛЗЦ) S-1 міозину міометрія, і вплив на результати докінгу присутності Mg^{2+} як кофактора в ЛЗЦ S-1 міозину.

Було відібрано низку комплексів із найменшою загальною енергією і розрахована оптимальна геометрія утворених комплексів. При цьому визначали енергетично найвигідніше розташування каліксаренів у просторі молекули міозину. Одержано результати комп'ютерного моделювання при здійсненні докінгу калікс[4]аренів та АТР як окремих лігандів, так і пар калікс[4]арен + АТР. При цьому присутність Mg^{2+} як кофактора у ЛЗЦ S-1 міозину впливає на результати докінгу. У зв'язуванні залишка α -гідроксифосфонової кислоти калікс[4]аренів задіяні такі амінокислотні залишки: Asn 237-239 і Asn 321 (аспарагін), Asp 320 (аспартат) і Ile 322 (ізолейцин) для С-97 та залишки Asn 481, Gly 463 (гліцин), Ser 178 (серин) і Ala 462 (аланін) для С-99. Фрагменти макроциклічного кістяка калікс[4]аренів інтегруються у простір ЛЗЦ S-1 міозину, утворений залишками Tyr 126 (тирозін), Arg 127 (аргінін), Lys 677 (лізин), Gln 678 (глутамін) і Pro 679 (пролін) для С-97 та Thr 175 (треонін), Gly 176, Glu 177 (глутамат), His 689 (гістидин), Gln 690, Cys 693 (цистеїн) і Asn 694 для С-99. За здійснення комп'ютерного моделювання одержані значення вільної енергії зв'язування та різних типів взаємодій, які характеризують взаємодію калікс[4]аренів (С-97 і С-99) та АТР з ЛЗЦ S-1 міозину міометрію як лігандів під час одночасного докінгу. Було ідентифіковано гідрофобні та електростатичні взаємодії, а також водневі зв'язки у комплексі С-97 (С-99) + АТР в ЛЗЦ S-1 міозину. Таким чином, показано, що С-97 та С-99 взаємодіють із функціонально-активною областю S-1 міозину – ділянкою зв'язування АТР. Передбачене *in silico* зв'язування калікс[4]аренів в ЛЗЦ S-1 міозину є підтвердженням раніше одержаних результатів щодо впливу калікс[4]аренів на каталітичну активність міозину (голівки міозину) *in vitro*. При цьому характер їхньої взаємодії з рецептором залежить від присутності в активному центрі міозину інших лігандів (АТР) та кофакторів (Mg^{2+}). На взаємодію каліксаренів із S-1 міозину також може впливати модифікація їх функціонально-активними групами (залишок α -гідроксифосфонової кислоти).

Автори висловлюють подяку член-кор. НАНУ В. І. Кальченку та його колегам (ІОХ НАНУ), якими було синтезовано каліксарени і член-кор. НАНУ С. О. Костеріну (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ) за обговорення результатів досліджень.

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ЕКСПРЕСІЮ ЦИРКАДІАЛЬНИХ ГЕНІВ У РІЗНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ

¹БОЖКО І. В., ²ЗІНЧЕНКО Т. Г., ¹МІНЧЕНКО Д. О.,
²ЯВОРОВСЬКИЙ О. П., ¹МІНЧЕНКО О. Г.

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

²Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Більшість як біохімічних, так і фізіологічних процесів, у різних організмів має циркадіальний характер, причому порушення механізмів регуляції їхнього перебігу є однією із причин виникнення низки патологічних процесів, у тому числі й утворення та росту злоякісних пухлин. Циркадіальний характер перебігу метаболічних процесів в організмі як у нормі, так і при патологічних станах, де термінується циркадіальним годинником, найважливішими молекулярними компонентами якого є циркадіальні фактори Per1, Per2, Per3, Clock, BMal1, Cry1 та Cry2, а також казеїнкіназа-1epsilon, що контролює експресію цих циркадіальних факторів. Циркадіальні ритми різноманітних фізіологічних та біохімічних процесів, як і поведінка організмів, є наслідком ритмічних щоденних змін в експресії самих циркадіальних генів. З розвитком біотехнології все більше застосування, в тому числі і у медицині, знаходять різноманітні наноматеріали, зокрема наночастинки срібла, які є досить токсичними і небезпечними для довкілля. Їх токсичність є значно більшою, порівняно з макроскопічними дисперсіями срібла, що пов'язано зі здатністю їх безперешкодно проникати через біологічні бар'єри організму. Специфічним і потенційно менш небезпечним чинником є аерозоль матричного натрію хлориду, який включає власне наночастинки срібла (до 30%).

Метою даного дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів антропогенного впливу наночастинок срібла у формі аерозолі матричного натрію хлориду, який включає до 30% наночастинок срібла розміром 28–30 нм, на щурів на рівні експресії циркадіальних генів Per1, Per2, Per3, Clock, BMal1 та казеїнкінази-1epsilon у печінці, легенях, міокарді, нирках та сім'яниках щурів-самців лінії Wistar. Наночастинки срібла вводили тваринам інтратрахеально у кількості 50 мкг/кг маси тіла одноразово і досліджували експресію генів у різних органах щурів через 1, 3 або 14 днів.

Одержані нами дані показали, що експресія мРНК казеїнкінази-1epsilon суттєво посилюється у головному мозку, легенях, печінці, міокарді та сім'яниках щурів уже через один день після введення шурам наночастинок срібла. Стимулювальний ефект наночастинок срібла на експресію мРНК казеїнкінази-1epsilon в усіх цих органах виявлявся також і через 3 та 14 днів. Встановлено, що експресія гена даної кінази посилюється і у нирках під впливом наночастинок срібла, але лише через три та 14 днів. В той самий час експресія гена Per2 суттєво не змінюється після введення шурам наночастинок срібла в усіх досліджуваних органах, за винятком нирок, де спостерігається пригнічення експресії цього циркадіального гена. Під впливом наночастинок срібла посилюється також рівень експресії мРНК Per1 у печінці та легенях і пригнічується у сім'яниках. Рівень експресії мРНК Clock у печінці та легенях під впливом наночастинок срібла посилюється, а у нирках пригнічується. У той самий час, у сім'яниках та серці пригнічення експресії мРНК

Clock було виявлено лише на пізніших термінах дії наночастинок срібла. Результати роботи свідчать про вплив наночастинок срібла на важливі механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах на рівні експресії гена казеїнкінази-1 ϵ та циркадіальних генів Perl і Clock, що може призводити до порушення сигнальних каскадів у клітинах та розвитку патологічних станів. Експресія цих генів може слугувати важливим чутливим показником впливу на організм наночастинок срібла. Ці принципово нові дані щодо впливу наночастинок срібла на організм на рівні експресії генів ключових регуляторних факторів є початком подальших наукових досліджень молекулярних механізмів токсичної дії наночастинок срібла та низки інших екологічно небезпечних сполук і будуть сприяти розробці принципово нових молекулярних підходів до їхнього виявлення і профілактики.

**RATE OF D-GLUCOSE Na⁺-DEPENDENT UPTAKE
BY BRUSH-BORDER VESICLES OF CHICKEN JEJUNAL
ABSORPTIVE CELLS UNDER ACTION OF LYCOPENE**

BUGAY A., TSVILIKHOVSKII M.

*National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: andbugay@ua.fm*

Lycopene is one of the most biologically active carotenoids because intensive investigations its action on human and animal organism now for further perspectives of practical employment. But the mechanisms of lycopene action especially to jejunal absorptive cells have not established. The results of our previous researches show the activation of digestive processes of broiler chicken on the background of lycopene consumption. So it is necessary to investigate the jejunal absorption rate of one of the most important nutrient - D-glucose, the first step of this is Na⁺-dependent transport across apical membrane bilayer of enterocytes.

For researches 14-42 days old broiler chicken of «Konkurent-3» cross were used. Chickens of experimental group were administered per os lycopene sunflower oil solution starting from the 5th day of life daily. The optimal dose was previously stated. The rate of D-glucose Na⁺-dependent uptake has been investigated by rapid filtration method using brush-border (BB) vesicles of chicken jejunal absorptive cells.

Ontogeny dynamics of D-glucose Na⁺-dependent uptake rate by brush-border vesicles of chicken jejunal absorptive cells is characterized by 1.7-fold decreasing ($P < 0.05$) from the 14th to the 42nd days of growth. The lycopene administration provide 2.8-fold increasing ($P < 0.05$) of this parameter in 14-days old chicken in comparison with control. Ontogeny dynamics of D-glucose Na⁺-dependent uptake rate by brush-border vesicles of jejunal absorptive cells of lycopene administered chicken is also characterized by 3.9-fold decreasing ($P < 0.05$). Remarkably that the rate of D-glucose Na⁺-dependent uptake by BB vesicles in experimental group chickens during 21-42 days of growth is higher by 20-36% ($P < 0.05$) in comparison with control.

Thus lycopene administration provides an increase of D-glucose Na⁺-dependent uptake rate by brush-border vesicles of chicken jejunal absorptive cells during all term of their growth. These data indicate to enhancement of carbohydrates digestion and organism needs supply by glucose.

**ЗМІНИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ
ТА ГІДРОДИНАМІЧНОГО ДІАМЕТРА МІТОХОНДРІЙ
МІОМЕТРІЯ В УМОВАХ АКТИВАЦІЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО
АТР-ЧУТЛИВОГО КАЛІЄВОГО КАНАЛУ**

ВАДЗЬЮК О. Б., ЧУНІХІН О. Ю., КОСТЕРІН С. О.

*Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: vadzyuk@biochem.kiev.ua*

Мітохондріальний АТР-чутливий К(+)-канал є головним чинником регуляції обміну іонів К в мітохондріях. Вагається, що активація цієї структури призводить до збільшення об'єму мітохондріальних частинок, внаслідок чого збільшується інтенсивність дихання та утворення АТР. Функціонування цього каналу у мітохондріях міометрія практично не досліджено. Тому метою роботи було дослідження впливу активації АТР-чутливого К(+)-каналу на функціонування мітохондрій міометрія шурів.

Методом фотонної кореляційної спектроскопії було виміряно гідродинамічний діаметр (ГД) мітохондрій. Показано, що середній ГД мітохондрій у КСІ-вмісному середовищі становить 470 ± 23 нм, тоді як додавання АТР призводить до його зменшення до значення 416 ± 21 нм. У присутності активатора АТР-чутливого К(+)-каналу діазоксиду значення ГД зростає до 459 ± 32 нм, що майже відповідає контрольному значенню. Селективний блокатор даного каналу, глібенкламід, усуває цей ефект, призводячи до зменшення ГД до 430 ± 28 нм.

Методом протокової цитометрії використанням потенціал-чутливого зонда — родаміну-123, було виявлено часткову деполяризацію внутрішньої мітохондріальної мембрани під дією діазоксиду. У присутності глібенкламіду спостерігається відновлення мембранного потенціалу до контрольних значень. Вищезгадані ефекти спостерігаються лише у середовищі, яке містить КСІ, і не спостерігаються у сахарозі або у NaCl. Для доказу специфічності дії глібенкламіду саме на АТР-чутливий К(+)-канал ми дослідили сумісну дію глібенкламіду та валіноміцину. У присутності валіноміцину (1 мкМ) разом із діазоксидом також спостерігається часткова деполяризація, але глібенкламід у цьому разі не викликає реполяризацію мітохондріальної мембрани.

Таким чином, використовуючи селективний активатор та блокатор АТР-чутливого каналу, ми показали збільшення ГД та деполяризацію мембрани мітохондрій міометрія під впливом активації АТР-чутливого К(+)-каналу.

**НЕЗБАЛАНСОВАНА ЕКСПРЕСІЯ СУБОДИНИЦЬ
КОМПЛЕКСУ ЕВКАРІОТНОГО ФАКТОРА ЕЛОНГАЦІЇ
ТРАНСЛЯЦІЇ eEF1H ПРИ КАРЦИНОМІ ЛЕГЕНІВ ЛЮДИНИ**

¹*ВЕРЕМ'ЄВА М. В.,* ¹*ХОРУЖЕНКО А. І.,* ²*ЗАХАРИЧЕВ В. Д.,*
¹*НЕГРУЦЬКИЙ Б. С.*

¹*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;*
²*Київська національна медична академія післядипломної
освіти ім. П. Шупика, Україна;*
e-mail: vermarina@list.ru

Нещодавно в деяких пухлинах людини виявлено підвищення рівня мРНК, які кодують компоненти мультипротеїнового комплексу факторів елонгації трансляції eEF1H (eEF1A, eEF1B α , eEF1B β , eEF1B γ). Підвищену експресію мРНК субодиноць eEF1H пояснювали як таку, що відображає високий рівень протеїнового синтезу в пухлинах. Але залишилося невідомим, як збільшення кількості мРНК у таких випадках впливає на кількість відповідних протеїнів.

Рівень експресії мРНК, що кодують всі компоненти комплексу eEF1H, та вміст відповідних протеїнів досліджували за допомогою Нозерн- та Вестерн-блот аналізу у 25 клінічних зразках раку легенів людини порівняно з умовною нормою. Загалом збільшення у ≥ 2 рази вмісту мРНК, що кодують субодиноць eEF1H, спостерігали в 72%, а вмісту відповідних протеїнів у 88% всіх досліджених випадків. Важливо, що як зростання рівня мРНК, так і підвищення вмісту того чи іншого компонента eEF1H для різних субодиноць було незбалансованим. Найбільшу кількість зразків із підвищеними рівнем експресії мРНК та вмісту протеїну відзначали для eEF1B β .

Локалізацію субодиноць eEF1H в пухлинних і умовно нормальних тканинах було досліджено імуногістохімічним аналізом. Цитоплазматичну локалізацію спостерігали для всіх субодиноць комплексу eEF1H як у нормі, так і при раку легенів. Також незмінною була перинуклеарна локалізація eEF1A та eEF1B α субодиноць. Однак цікавим виявилось спостереження зміни локалізації eEF1B β з перинуклеарної в нормі до ядерної в раковій тканині легенів. Ці дані є першим свідченням на користь того, що eEF1B β може відігравати певну роль у процесах, що відбуваються в ядрі ракових клітин. Іншим важливим спостереженням було те, що фарбування ядер eEF1B γ виявили як у нормальній, так і в раковій тканинах легенів.

Отже, незбалансоване збільшення вмісту складових частин комплексу eEF1B, а також поява деяких субодиноць цього комплексу у відмінних клітинних компартментах пухлинної тканини вказує на високу ймовірність індивідуального, окремого від комплексу і не пов'язаного із протеїновим синтезом функціонування його компонентів у ракових клітинах.

Дослідження частково виконано за рахунок коштів проекту $\Phi 28/276 - 2009$ і Програм співробітництва між НАНУ і CNRS.

**TRUNCATED FORM OF eEF 1A IS CHARACTERIZED
BY DECREASED SURFACE POSITIVE CHARGE
AND ABILITY TO INTERACT STRUCTURALLY BUT NOT
FUNCTIONALLY WITH THE GDP-EXCHANGE FACTORS**

VLASENKO D.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: dmitriyvs@yahoo.com*

Along with relatively well-studied function of delivery of aminoacyl-tRNA to the ribosomal A site during protein synthesis, translation elongation factor 1A (eEF1A) has a wide range of so-called non-canonical functions, one of them is carcinogenic. PTI-1, the major oncogene of prostate carcinoma, may encode a protein homologous to eEF1A. The specific mechanism by which PTI-1 mediates the development of prostate cancer is still unknown. To characterize the molecular properties of putative PTI-1 protein we have made its analog (Δ eEF1A) via limited trypsinolysis of eEF1A1. 67 residues were cleaved from N-terminal part of eEF1A1 molecule to produce Δ eEF1A. PTI-1 protein had 2 additional amino acids at the N-terminus comparing to Δ eEF1A; otherwise the proteins had identical amino acid sequences.

The rate of spontaneous [3 H]GDP/GDP exchange in the Δ eEF1A molecule *in vitro* was found to be much higher than in eEF1A. Importantly, neither eEF1B α nor eEF1B β were able to accelerate GDP/GTP exchange rate in the Δ eEF1A molecule as they did in case of eEF1A. The spontaneous exchange rate in Δ eEF1A was similar to the rate of GDP exchange in eEF1A catalyzed by eEF1B α and eEF1B β , so Δ eEF1A apparently does not need a guanine exchange factor *in vivo*.

Does truncated eEF1A still keep the ability to interact with eEF1B α and eEF1B β ? The eEF1B α complexes with eEF1A and Δ eEF1A were observable directly in Coomassie stained gels, while the Western blotting analysis was necessary to detect the analogous complexes with eEF1B β . Unexpectedly, we found that the surface charge of the eEF1A and Δ eEF1A molecules is rather different. This change could not be predicted since theoretical calculation gave comparable values both for the eEF1A and Δ eEF1A molecules. Nevertheless, Δ eEF1A was found to be much less positively charged than eEF1A.

We believe that the absence of the first 69 amino acids in the Δ eEF1A molecule caused the exposing of negatively charged residues in the domain II of the protein. Decrease of the surface charge in the case of Δ eEF1A being extrapolated on putative PTI-1 protein may result in specific subcellular distribution of the oncoprotein and provide its particular intracellular contacts in cancer cell. The lack of the need in the GDP-exchanging factors found here suggests possibility of independent from eEF1H, self-sufficient functioning of PTI-1 in cancer cells.

Investigations were supported by the funds of Φ 28/276 – 2009 project and collaboration programs of NASU and CNRS.

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОЙ
И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ ЭНДОМЕТРИЯ И ЯИЧНИКОВ**

ВОВЧУК И. Л., ПЕТРОВ С. А.

*Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: irvov@ ukr.net*

Цель исследования – изучение физико-химических и биохимических свойств карбоксипептидазы А немалигнизированной и опухолевых тканей эндометрия и яичников выделенных энзимов.

Из ткани немалигнизированного эндометрия (НЭ), немалигнизированного яичника (НЯ) и опухолевых тканей эндометрия (ОЭ) и яичников (ОЯ) методами поэтапного осаждения сульфатом аммония и гель-хроматографии на сефадексе G-75 выделена и очищена карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1) – Zn^{2+} -зависимая экзопептидаза, обеспечивающая отщепление аминокислот с С-конца рядом с ароматическими аминокислотами (ААК). Установлено, что ААК немалигнизированной и опухолевых тканей обоих органов близки между собой по молекулярной массе, температурному оптимуму (40 °С), содержанию углеводов и количеству дисульфидных связей.

ААК немалигнизированной и опухолевых тканей обоих органов не гидролизует нативные протеиновые субстраты: желатин, казеин, гемоглобин и синтетический субстрат БАПНА, а среди специфических синтетических субстратов с наибольшей скоростью – карбобензоксиглутамилфенилаланин, что свидетельствует об отсутствии у энзима эндопептидазной активности.

Более чувствительна к воздействию ионов тяжелых металлов и к воздействию металлов-активаторов и стабилизаторов ААК неизмененного и опухолевых тканей эндометрия и ААК злокачественной опухоли яичника.

Анализ влияния специфических ингибиторов и активаторов показал, что в гидролизе карбобензоксиглутамилфенилаланина ААК немалигнизированной и опухолевых тканей яичника и эндометрия принимают участие гистидин, гидроксильная группа серина, карбоксильная группа аспарагиновой кислоты и тиоловая группа цистеина. Для непораженной и опухолевых тканей яичника характерен смешанный тип ингибирования ААК фенилаланином. Для ААК НЭ и цисаденокарциномы эндометрия характерен конкурентный тип ингибирования, а для энзима доброкачественной опухоли эндометрия ингибирование происходит по смешанному типу.

Для ААК обоих органов характерна специфическая ответная реакция на усиление процесса малигнизации, которая сопровождается: снижением молекулярной массы, содержания углеводов, содержания -SH групп в молекуле энзима, возрастанием сродства энзима к карбобензоксиглутамилфенилаланину и повышением температурного оптимума.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании эффекта изменения в структуре ААК, что может быть связано с точечными изменениями структуры соответствующих генов.

СТРУКТУРНИЙ СТАН МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЗА ВЗАЄМОДІЇ З ЛІГАНДАМИ БЕТА1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРІВ

¹ВОЙЦИЦЬКИЙ В. М., ²ХИЖНЯК С. В., ³ЖИРНОВ В. В.,
¹ЛАПОША О. А., ²БАБЕНЮК Ю. Д., ³КУЛИК І. В.

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: vmv@biocss.univ.kiev.ua;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

³Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ

Як відомо, взаємодія лігандів із відповідними мембранними рецепторами змінює конформацію останніх, що впливає на структурний стан мембрани в цілому. У роботі досліджувався вплив взаємодії лігандів бета1-адренорецепторів (агоніста – добутаміну і антагоніста – атенололу) з мембранами еритроцитів (МЕ) людини на їхній фізичний стан.

Дзета–потенціал МЕ розраховували за значенням електрофоретичної рухомості еритроцитів, яка визначалась методом мікроелектрофорезу. На модельній системі «розчин електроліту – ліпід» оцінювали граничний потенціал, електричний опір і поверхневий натяг границі розподілу фаз. Структурний стан МЕ досліджували за допомогою флуоресцентних зондів – 1-анілінонафталін-8-сульфонат (АНС) і пірену.

Встановлено, що атенолол і добутамін (10^{-7} – 10^{-5} М) практично не впливають на дзета–потенціал МЕ, але здатні до асоціації з ліпідною компонентою мембран і модифікують ліпідний бішар. Добутамін більшою мірою знижує мікрров'язкість загальних, а атенолол – анулярних ліпідів МЕ. Ліганди бета1-адренорецепторів в концентраціях 10^{-8} – 10^{-6} М дозозалежно збільшують ефективність індуктивно-резонансного переносу енергії (ІРПЕ) в парі триптофан – пірен відносно контролю, що вказує на збільшення ступеня занурення протеїнів у гідрофобний бішар МЕ. Ефективність ІРПЕ в МЕ за дії добутаміну (10^{-7} – 10^{-5} М) в парі триптофан – АНС дозозалежно знижується, а за дії атенололу – збільшується, що свідчить про структурну модифікацію поверхневих ділянок МЕ. Ліганди бета1-адренорецепторів не впливають на ІРПЕ в парі пірен – АНС, тобто не змінюють ефективної товщини мембрани. Ліганди бета1-адренорецепторів не змінюють флуоресценцію триптофанових залишків протеїнових молекул у препаратах МЕ. Це означає, що структурні перебудови протеїнових молекул не супроводжуються переходом триптофанових залишків у більш гідрофобну зону, оскільки їхня флуоресценція чутлива до полярності оточення. Розраховано ефективну константу гасіння (K_{sv}), зміни якої відображають внутрішньомолекулярну динаміку протеїнових молекул. Встановлено, що значення K_{sv} для препаратів МЕ дозозалежно зменшуються за дії добутаміну в діапазоні концентрацій 10^{-6} – 10^{-4} М відносно контролю. Як відомо, повністю екрановані залишки триптофану мають значення $K_{sv} = 8$ – 9 М⁻¹, тоді як для екранованих або недоступних триптофанілів значення K_{sv} знижуються. Таким чином, агоніст добутамін у разі зв'язування з МЕ підвищує екранованість триптофанілів і, відповідно, знижує ефективність гасіння їх акриламідом, що вказує на стабілізацію протеїнової конформації за рахунок гідрофобних взаємодій. Однак при цьо-

му кількість доступних для акриламідів триптофанілів дозозалежно збільшується в тому самому діапазоні концентрацій добутаміну (з 45 до 77%). Але за взаємодії добутаміну в концентраціях 10^{-8} та 10^{-7} М з МЕ частка доступних для гасіння триптофанових залишків протеїнів зменшується відповідно в середньому на 24 та 17% відносно контролю, що, вірогідно, спричинено неспецифічним зв'язуванням добутаміну з протеїнами МЕ при високих його концентраціях. На відміну від добутаміну, атенолол дозозалежно знижує ефективність гасіння акриламідом у всьому діапазоні концентрацій і кількість доступних для гасника триптофанілів.

Наявність відмінностей в параметрах флуоресцентного зондування МЕ свідчить про специфічність відповідних змін їхньої просторової організації за взаємодії агоніста і антагоніста бета1-адренорецепторів з МЕ.

IDENTIFICATION OF 3H-NAPHTHO[1,2,3-DE]QUINOLINE-2,7-DIONES AS HUMAN PROTEIN KINASE ASK1 INHIBITORS

VOLYNETS G. P., BDZHOLA V. G., YARMOLUK S. M.

*Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: galina.volinetc@gmail.com*

The recent studies have revealed the involvement of protein kinase ASK1 in pathogenesis of various human diseases. ASK1 is the critical signaling molecule for Ang II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. ASK1 plays an essential role in oxidative-stress induced hepatocyte death and in ischemia-induced angiogenesis *in vivo*. Thus, ASK1 may be an attractive therapeutic target to overcome these pathologies.

The main aims of our work are to identify potent and selective inhibitors of ASK1 and to predict binding mode for these ligands.

The *in silico* approach is an important part of rational design of protein kinase inhibitors. In our work, for receptor-ligand flexible docking we have used the system based on DOCK 4.0 package. The virtual screening experiments were performed targeting the ATP binding site of ASK1 by browsing the database contained 164 840 compounds of diverse chemical classes. The best-scored candidates have been taken for the kinase assay analysis. *In vitro* testing revealed that derivatives of 3H-naphtho[1,2,3-de]quinoline-2,7-dione exhibited inhibitory activity against ASK1. The most active compound inhibited ASK1 in a dose-dependent manner with IC_{50} 3 μ M. Selectivity of compound was estimated in the reactions with ASK1, Aurora A, ROCK, FGFR1, c-Met, JNK3, CK2 and Tie2 human kinases.

The *in silico* analysis of the complexes of ASK1 with inhibitors indicated, that compounds with substituents providing hydrogen bonding capability with hinge region of ASK1 ATP-binding site, were more potent inhibitors. The core structure of this compounds can be used for further optimization and discovering more potent and selective inhibitors of ASK1.

ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ІНСУЛІНОВОГО РЕЦЕПТОРА ІЗ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КЛІТИН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

ГАЛЕНОВА Т. І., КОНОПЕЛЬНЮК В. В., ЦУДЗЕВИЧ Б. О.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: galenovatanya@rambler.ru*

Інсуліновий рецептор – складний трансмембранний глікопротеїн, основна функція якого є проведення гормонального сигналу, через який реалізуються основні біологічні ефекти інсуліну. Зниження активності інсулінового рецептора призводить до порушення сигнальної трансдукції і може бути причиною розвитку різноманітних патологічних станів. Пошук можливих причин порушення функціонування інсулінового рецептора є актуальною проблемою сучасної клінічної біохімії.

Метою даної роботи було виділення та характеристика інсулінового рецептора з плазматичних мембран клітин печінки щурів.

Очищення інсулінового рецептора проводили методом афінної хроматографії на колонці з інсулін-сефарозою. Інсулін-сефарозу синтезували, використовуючи комерційний препарат інсуліну (Sigma) і BrCN-сефарозу (Sigma). У роботі використовували білих нелінійних щурів масою 250–300 г. Плазматичні мембрани клітин печінки щурів одержували методом диференційного центрифугування, після чого проводили сольобілізацію у 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4, у присутності 1% тритону Х-100. Одержаний матеріал наносили на колонку з інсулін-сефарозою об'ємом 3 мл у 0,05 М трис-НСІ буфері, рН 7,4 зі швидкістю 0,3 мл/хв. Неспецифічно зв'язані протеїни відмивали тим самим буфером, який містив 1 М NaCl. Елюцію зв'язаного матеріалу проводили, використовуючи 0,05 М ацетатний буфер, рН 5,0, який містив 1 М NaCl. Вміст протеїну у фракціях визначали методом Бредфорд. Проби, які містили протеїн було перевірено на тирозинкіназну активність, яку оцінювали методом імунно-ензимного аналізу з використанням наборів реактивів фірми Sigma.

Одержаний інсуліновий рецептор за даними диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію був електрофоретично гомогенним. Питома активність інсулінового рецептора складала 144,6 пмоль P_n /хв на 1 мг протеїну. Зважаючи на те, що плазматичні мембрани у своєму складі містять різні ензими, які виявляють тирозинкіназну активність, одержаний препарат було перевірено на чутливість до інсуліну. Встановлено зростання тирозинкіназної активності матеріалу елюату у 3 рази у присутності інсуліну порівняно з базальним рівнем активності. Неспецифічно зв'язані протеїни також виявляли тирозинкіназну активність, яка у присутності інсуліну залишалася на базальному рівні, що може свідчити про відсутність інсулінового рецептора у складі незв'язаного матеріалу.

Одержання інсулінового рецептора дозволяє детальніше вивчити протеїн-протеїнові взаємодії в механізмах проведення інсулінового гормонального сигналу як за нормальних умов, так і при різних патологічних станах.

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ НІКОТИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ У ФУНКЦІОНУВАННІ МІТОХОНДРІЙ

ГЕРГАЛОВА Г. Л., ЛИХМУС О. Ю., СКОК М. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: fanik2000@yahoo.com*

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAChR) опосередковують швидку синаптичну передачу в автономних гангліях та нервово-м'язових з'єднаннях. У незбудливих клітинах вони регулюють базові життєві функції, такі як проліферація і виживання, в тому числі пов'язані з діяльністю мітохондрій. Мітохондрії забезпечують енергетичні потреби клітини, а також регулюють вміст внутрішньоклітинного Ca^{2+} та ініціюють процеси апоптозу. В деяких клітинних моделях нікотин має антиапоптотичний ефект, який зменшується антагоністами нікотинового ацетилхолінового рецептора. Такі дані свідчать про участь nAChR в діяльності мітохондрій. Методами протокової цитофлуориметрії, електронної мікроскопії та Сендвіч-імуноферментного аналізу з використанням ФІЦ-міченого альфа-кобратоксину та антитіл проти різних субодиниць nAChR ми показали, що зовнішня мембрана мітохондрій, виділених із печінки мишей, містить $\alpha 7$ -вмісні nAChR. Модифікований варіант Сендвіч-аналізу дозволив визначити, що nAChR знаходиться у тісному фізичному зв'язку з маркером зовнішньої мембрани мітохондрій, потенціалзалежним аніонним каналом (VDAC). Для з'ясування функцій $\alpha 7$ nAChR в мітохондріях було проведено серію досліджень із визначення транспортування Ca^{2+} та підтримання мембранного потенціалу мітохондрій у присутності агоністів та антагоністів цього субтипу nAChR.

Експерименти на фракції ізольованих мітохондрій печінки проводили з використанням проточного цитофлуориметра COULTER EPICS XL. За допомогою кальційчутливого флуоресцентного зонду Fluo 3AM встановлено зниження накопичення Ca^{2+} мітохондріями у присутності природних агоністів $\alpha 7$ nAChR холіну та ацетилхоліну, синтетичного агоніста PNU 282987 та конкурентного антагоніста метиллікаконітину. Аналогічно впливає на мітохондріальне транспортування Ca^{2+} DIDS – специфічний інгібітор VDAC. За допомогою потенціалчутливого флуоресцентного зонду TMRM було показано, що внесення в середовище інкубації Ca^{2+} зумовлює дисипацію мембранного потенціалу мітохондрій. Додавання як агоністів, так і антагоністів $\alpha 7$ nAChR не призводить до суттєвої модуляції падіння потенціалу, не зважаючи на зниження накопичення Ca^{2+} мітохондріями, визначене вище.

Потенціалзалежні аніонні канали (VDAC) регулюють транспортування іонів, заряджених як позитивно, так і негативно, в міжмембранний простір мітохондрій. Одержані нами дані свідчать про те, що $\alpha 7$ nAChR стерично і функціонально зв'язаний з VDAC у зовнішній мембрані мітохондрій. Зміни в конформації та/або іонній провідності $\alpha 7$ nAChR при зв'язуванні специфічних лігандів (як агоністів, так і антагоністів) пригнічують транспорт Ca^{2+} через зовнішню мембрану мітохондрій, можливо, впливаючи на іонну селективність VDAC.

ВПЛИВ КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ НА ВЗАЄМОДІЮ АНТИГЕН–АНТИТІЛО

*ГОРІЛА М. В., ЩЕРБИНА Т. В., ЯНЧЕНКО О. С.,
ФЕДОРИЦЬКА С. М., КЛЕНІНА І. В., ШТЕМЕНКО Н. І.*

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: gorelaya@ukr.net*

Кластерні сполуки ренію виявляють протипухлинну, антиоксидантну та антигемолітичну активність. Особливу увагу приділено нетоксичним і малотоксичним сполукам, серед яких є кластерні сполуки ренію. Важлива частина введення нових препаратів у медичну практику – вивчення їхніх імуномодулюючих властивостей. Дослідження взаємодії сполук ренію із протеїнами за допомогою сучасних імунохімічних методів надає можливість виявити особливості їхнього зв'язування з компонентами живого організму, механізм детоксикації та ін. Метою роботи було з'ясування закономірностей впливу групи комплексних сполук ренію на реакції антиген–антитіло за допомогою імунохімічних методів та порівняння даних щодо різних ксенобіотиків.

У всіх експериментах із застосуванням кластерних сполук ренію не спостерігалось відсутності або часткового розчинення імунопреципітатів порівняно з контрольними дослідженнями, що були проведені без кластерних сполук.

Досліджувані комплексні сполуки ренію можна умовно поділити на чотири групи згідно з характером їхнього впливу на імунохімічні реакції. Перша група складається з індиферентних сполук, що майже не впливають на імунохімічні взаємодії. До другої групи належать сполуки, що мають незначний пригнічуючий вплив на взаємодію антиген–антитіло (дихлортетра- μ -(і-бутират)диреніум(III) та тетрачлор- μ -(γ -амінобутират)диреніум(III)хлор та ін.). До третьої групи входять сполуки, що мають значну пригнічуючу дію, зокрема цезієвий комплекс диренію та цис-платин. До четвертої групи сполук, що активують імунохімічні взаємодії, включено адамантанові комплекси ренію. У кожній групі сполук ренію побудовано ряди активності. Остання четверта група стимулюючих сполук є найцікавішою та, на нашу думку перспективною, як у плані отримання в майбутньому нових лікарських препаратів, так і у плані використання речовин – підсилювачів імунохімічних взаємодій у фундаментальних дослідженнях. Адамантанові комплекси ренію активували імунохімічні взаємодії в середньому на 20% порівняно з контролем.

Вірогідно, що комплексні сполуки ренію координуються з молекулами протеїнів: через імідазольне кільце амінокислоти гістидину, через сірковмісні зв'язки амінокислот цистеїну і, можливо, метіоніну.

**ВІРОГІДНІ МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ
КЛАСТЕРІВ Re(III) ІЗ ДНК**

¹ДЕНИСОВ Е. М., ²ЄГОРОВА Д. Є., ¹КОНОНОВА Г. С.,
¹ПОЛОХІНА К. В., ¹ШТЕМЕНКО Н. І.

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
²Український державний хіміко-технологічний університет,
Дніпропетровськ, Україна;
e-mail: ernest.denisov@yandex.ua

У попередніх дослідженнях (Shtemenko N.I. et al., 2007–2008) встановлено, що кластери Re(III) виявляють протипухлинні та антиоксидантні властивості як індивідуально, так і в системі Re-Pt у вигляді наноліпосомних форм. Вважається, що почверний зв'язок ренієвих кластерів є пасткою для вільних радикалів, завдяки чому система має кращі показники, ніж застосування її складових окремо. Протипухлинний ефект кластерів Re(III) може пояснюватись їх взаємодією з молекулою ДНК. Метою роботи було дослідити можливі механізми взаємодії кластерів Re(III) з ДНК.

Вивчалися криві плавлення ДНК на основі змін оптичної щільності розчинів ДНК під час переходу від нативного стану до денатурованого. Досліджувалися похідні нуклеїнових основ, зразки ДНК, виділеної з тимусу теляти (Serva, Німеччина), з сім'я лосося (Serva, Німеччина) та ДНК з печінки щурів лінії Wistar. Щурів лікували препаратами кластерів Re(III) та системою Re-Pt на основі моделі гострого гепатозу та за його відсутності. Досліджували як зразки розчинів чистої ДНК, так і розчини ДНК, на які *in vitro* впливали кластерами Re(III), cPt, та системою Re-Pt. Одержані результати свідчать про можливість взаємодії кластерів Re(III) з молекулою ДНК як у разі додавання сполук ренію та системи Re-Pt в розчин нуклеїнової кислоти, так і за введення цих препаратів піддослідним щурам *in vivo*.

Припустимий характер утворення ДНК/ренієвих аддуктів заснований на детальному вивченні взаємодії аналогічних кластерів родію з азотистими основами, моно-, ди- та олігонуклеотидами (Chifotides H., Dunbar K., 2003, 2005). Характеристика одержаних нами кривих плавлення ДНК дає можливість припустити утворення як міжланцюгових, так і внутрішньоланцюгових аддуктів. Вірогідним є переважне формування аддуктів з пуриновими основами по екваторіальним положенням кластерів (Shtemenko A.V, Shtemenko N.I. et al, 2009). Показана бідентатна координація 9-MetA по екваторіальному положенню кластеру Re(III) через N1/N6 атоми. Для 9-MetG встановлено монодентатну координацію по аксіальному положенню кластеру Re(III) через N1 атом. Останнє положення потребує подальших досліджень.

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *IФНАR1* І *IФНАR2*,
ЯКІ КОДУЮТЬ СУБОДИНИЦІ РЕЦЕПТОРА
ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА, У КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ
ПІД ЧАС ЇЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ**

ДРАГУЩЕНКО О. О., СЛОНЧАК А. М., ОБОЛЕНСЬКА М. Ю.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: lenadraguschenko@mail.ru*

Роботу виконано в рамках дослідження ролі інтерферону альфа (*IФNa*) в запуску регенераційного процесу в печінці щурів після часткової гепатектомії (ЧГЕ). *IФNa* слушно вважається антипроліферативним агентом, і його участь в переході клітин від спокою до проліферації видавалася малоймовірною. Враховуючи те, що *IФNa* є компонентом неспецифічного вродженого імунітету, який першим відповідає на подразники різної природи, в нашій лабораторії було висунуто гіпотезу щодо участі *IФNa* в запуску відновлювального процесу і вперше доведено, що його експресія стрімко зростає після ЧГЕ і стрімко спадає після розтину черевної порожнини (лапаратомії, ЛАП), яка не супроводжувалась ушкодженням печінки.

Сигнал від *IФNa*, зв'язаного на поверхні клітини з рецептором – димером субодиниць *IФНАR1* і *IФНАR2*, передається через STAT-залежний шлях, STAT-незалежні CRK- і MAP-каскади і через PI3-кіназний шлях, зумовлюючи плейотропний характер дії цитокіна. Комплекс *IФNa*-рецептор інтерналізується, піддається деградації, і клітина синтезує або тимчасово не синтезує нові субодиниці рецептора.

Метою роботи було дослідити в гепатоцитах і клітинах Купфера, виділених із печінки щурів після ЧГЕ і ЛАП, експресію генів *IФНАR1* і *IФНАR2*, які кодують дві субодиниці рецептора *IФNa*. ЧГЕ і ЛАП моделюють, відповідно, перехід клітин від спокою до проліферації та тканинспецифічну реакцію гострої фази з боку печінки у відповідь на ушкодження будь-якої природи та локалізації, яке не зачіпає печінки. Реакція гострої фази не супроводжується проліферацією клітин.

Гепатоцити та клітини Купфера були виділені з печінки щурів через 1, 3, 6 та 12 год після класичних операцій ЧГЕ (видалення 2/3 печінки) і ЛАП. Тотальну РНК виділяли за методом Хомчинського. Вміст мРНК *IФНАR1* та *IФНАR2* визначали кількісною реакцією зворотної транскрипції – ланцюговою полімеразною реакцією в реальному часі (кЗТ–ПЛР).

Результати. *IФНАR1* мРНК і *IФНАR2* мРНК суттєво не відрізняються між собою за вмістом в тотальній РНК гепатоцитів і клітин Купфера, виділених з інтактною печінки. Виявлено однакову динаміку зміни кількості мРНК обох субодиниць *IФНАR* в одному типі клітин, що свідчить про узгоджену регуляцію експресії їхніх генів. Також виявлено клітинспецифічність експресії генів субодиниць рецептора *IФNa* у відповідь на проведені дві операції (ЧГЕ та ЛАП). Після ЧГЕ в гепатоцитах вміст мРНК *IФNa* та обох субодиниць його рецептора змінюється несуттєво порівняно з їхнім початковим вмістом. В клітинах Купфера рівень мРНК *IФNa*, *IФНАR1* та *IФНАR2* значно і короткочасно зростає, перевищуючи вихідний рівень більш ніж у 3 рази вже через 1 годину після операції, і знижується до вихідного рівня в інтервалі між 3 і 12 годинами. Після ЛАП в гепатоцитах послідовно

підвищується вміст ІФНАР2 мРНК у 2–3 рази протягом 3–6 год і з деяким відставанням вміст ІФНАР1 мРНК у 1,5 раза через 6 год після операції. Через 12 год після ЛАП рівень мРНК обох субодиниць знижується до і навіть нижче вихідного рівня. В клітинах Купфера, на відміну від гепатоцитів, вже через 1 год після ЛАП спостерігається значне збільшення рівня ІФНАР1 і ІФНАР2 мРНК – у 5 і 7 разів відповідно. А протягом наступних 11 год вміст мРНК обох субодиниць поступово знижується до вихідного рівня. В клітинах обох типів ЛАП призводить до стрімкого зниження вмісту ІФНа мРНК.

Таким чином, клітини Купфера, які є основними продуцентами ІФНа в печінці, реактивніші щодо експресії генів *ІФНАР1* і *ІФНАР2*, ніж гепатоцити у відповідь на ЧГЕ і ЛАП. Підвищена експресія генів *ІФНАР1* і *ІФНАР2* в клітинах обох типів вираженіша після ЛАП, ніж після ЧГЕ, і корелює із різким спадом експресії гена *ІФНа*. Короткочасне підвищення рівня експресії генів *ІФНАР1* і *ІФНАР2* у клітинах Купфера після ЧГЕ збігається з підвищенням експресії гена *ІФНа* і також передують стрімкому спаду в експресії останнього. Обговорюється питання щодо негативного взаємовідношення між експресією генів, які кодують ІФНа і його рецептор.

УМОВИ ОКИСНОЇ МОДИФІКАЦІЇ АКТОМІОЗИНУ

¹ЄВТУШЕНКО Н. В., ¹ОМЕЛЬЯНЮК В. С., ²БОГУЦЬКА К. І.

¹НДІ фізіології біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: nevtushenko@gmail.com.ua

Зважаючи на неспецифічне підвищення рівня вільнорадикального окислення при багатьох патологічних станах, останнім часом активно вивчається окисна модифікація протеїнів. Так, проведено окисну модифікацію альбумінів та імуноглобулінів і визначено структурно-функціональні зміни, спричинені впливом вільних радикалів. Карбонільні сполуки, які є результатом окислення, реагуючи з 2,4-динітрофенілгідразином (ДНФГ), утворюють похідні 2,4-ДНФГідрозони. Їх реєструють при різних довжинах хвиль – від 260 до 550 нм.

Окисна модифікація актоміозину, який є зручною моделлю для вивчення м'язового скорочення, не проводилась. Тому метою роботи було підібрати умови проведення окисної модифікації актоміозину скелетних м'язів кроля.

Для окислення актоміозину ми застосували метод метал-каталітичного окислення (МКО) в системі *in vitro*, запропонований О. Ю. Дубініною та співавторами, з використанням реактиву Фентона, який складався з двовалентного заліза та пероксиду водню.

Нами було вивчено вплив іонів заліза на швидкість процесів окислення при різних концентраціях актоміозину. Виявлено, що реакція МКО досягає максимуму при концентрації актоміозину 0,2–0,5 мг/мл. У подальшій роботі використовували 0,2 мг/мл актоміозину.

Було показано, що ступінь окислення актоміозину збільшується у разі підвищення концентрації іонів заліза з 0,001 до 0,1 мМ у пробі. Подальше збільшення концентрації Fe^{2+} значним чином не впливає на ступінь окислення актоміозину.

Це дозволяє припустити, що з метою прискорення процесів окисної модифікації актоміозину доцільно використовувати іони заліза в концентрації від 0,001 до 0,1 мМ. Реакцію проводили протягом 15 хв.

Отже, внаслідок проведених досліджень встановлено, що інкубаційна суміш об'ємом 3 мл, що містить 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, актоміозин, 2,1 мкМ FeSO₄ та 0,044 мкМ H₂O₂, є оптимальним середовищем для проведення окислювальної модифікації актоміозину скелетного м'яза кроля.

ПОШУК ВПЛИВУ ПЛАЗМІНОГЕНУ НА АГРЕГАЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ ТРОМБОЦИТІВ ЛЮДИНИ

ЖЕРНОСЕКОВ Д. Д., ЗОЛОТАРЬОВА Е. М., РОКА-МОЙЯ Я. М.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: dandetiger@ukr.net*

На модельних системах було експериментально показано, що плазміноген здатен зв'язуватися з поверхнею неактивованих тромбоцитів. Така здатність підсилюється під впливом агоністів тромбоцитарної агрегації, а саме ADP та тромбіну. Проведені експерименти дозволили визначити, що взаємодія тромбоцитів із плазміногеном відбувається завдяки адгезивному протеїну інтегринового сімейства GP IIb/IIIa. Цілком імовірно, що цей інтегриновий протеїн, який розташований на поверхні тромбоцитів, зв'яже плазміноген через фібриногенові містки, хоча деякі автори не виключають можливості безпосереднього контакту GP IIb/IIIa з молекулою плазміногену. Зв'язок фібриногену з інтегриновими молекулами здатен спричинити певні конформаційні зміни у структурі цього протеїну. Такі зміни відкривають можливості для експонування сайтів зв'язування плазміногену на поверхні фібриногенової молекули.

Фізіологічна роль зв'язування плазміногену з тромбоцитами може бути різноспрямованою. З одного боку, зв'язування плазміногену з тромбоцитами за допомогою фібринових містків може сприяти процесу агрегації. З іншого боку, як це відомо з джерел літератури, під час активації плазміногену утворюється плазмін, який руйнує рецептор GP I_b на поверхні тромбоцитів і не дає змоги фактору Віл-лебрандта утворити адгезивні контакти. У цьому разі можливий негативний вплив на процес агрегації. Який саме процес буде відбуватися *in vivo* залежить від концентрації компонентів фібринолітичної та коагуляційної систем.

Таким чином, дослідження впливу різних форм плазміногену на агрегацію тромбоцитів може бути перспективним напрямом досліджень, спрямованих на виявлення механізмів взаємодії фібринолітичної та адгезивної систем гемостазу.

**ВПЛИВ рН НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИХОДУ ДНК
ПІД ЧАС КОМЕТНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ**

ЗАЖИЦЬКА М. О., АФАНАСЬЄВА К. С., СИВОЛОБ А. В.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: marianna.knu@gmail.com*

Було досліджено ефективність виходу ДНК під час електрофорезу ізольованих клітин за лужних та нейтральних умов. Під час електрофорезу в денатуруючих умовах ефективність виходу ДНК залежить від попередньої інкубації в лужному буфері. Оскільки рекомендований час попередньої інкубації в лугу варіює, обробку лугом проводили 10, 20 і 40 хв. Так, ефективність виходу є пропорційною попередній інкубації: у разі інкубації 10 хв частка комет збільшується повільно на перших хвилинах електрофорезу, а потім різко зростає і сягає 100% на 60 хв. Кінетика виходу ДНК після інкубації клітин у лужному буфері протягом 20 і 40 хв є подібною: частка комет різко зростає вже на 40-й хвилині електрофоретичного пробігу.

На відміну від класичного лужного електрофорезу, у тому разі, коли клітини обробляються лугом, а потім піддаються електрофорезу за нейтральних умов, вихід ДНК взагалі не спостерігали навіть на пізніх хвилинах електрофорезу, незалежно від тривалості попередньої інкубації в лужному буфері. В той самий час, у разі нейтрального електрофорезу без попереднього оброблення клітин лугом спостерігається утворення комет.

Експерименти з виходу ДНК в нейтральних умовах дали можливість встановити, що хвіст комети в інтактних клітинах формується за рахунок релаксованих петель ДНК, які закріплені на ядерному матриксі – саме фіксація петлі на матриксі дозволяє ДНК формувати зону хвоста комети. Імовірно, оброблення клітин лугом призводить до порушення зв'язку петель із матриксом, після чого ДНК не здатна рухатися суцільним фронтом. Отже, під час електрофорезу в лужних умовах хвіст комети формується одноланцюговими лінійними фрагментами, які утворилися за рахунок розривів в апуринових/апиримідинових сайтах.

Таким чином, механізми виходу ДНК за нейтрального та лужного кометного електрофорезу істотно відмінні. Нейтральний варіант слід визнати чутливішим методом для оцінки незначної кількості розривів у ДНК: достатньо одного одноланцюгового розриву на петлю для полегшення її виходу за рахунок релаксації. Лужний електрофорез дозволяє виявити велику кількість денатурованих лінійних фрагментів, які з'являються як внаслідок власне розривів, так і індукції АП-сайтів.

ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОЛЕКУЛЯРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСУ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ БІС(ФОСФОНО-2-ПІРИДИЛМЕТИЛ)АМІНО-КАЛІКС[4]АРЕНУ З АДЕНОЗИНТРИФОСФАТОМ ТА АДЕНОЗИНДИФОСФАТОМ

¹КАЛЬЧЕНКО О. І., ¹РОДІК Р. В., ²ШКРАБАК О. А.,
²ВЕКЛІЧ Т. О., ¹КАЛЬЧЕНКО В. І.

¹Інститут органічної хімії НАН України, Київ;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: shkrabaks@biochem.kiev.ua

Макроциклічні сполуки калікс[4]арени широко використовуються як платформи для створення штучних рецепторів з метою розпізнавання та зв'язування в супрамолекулярні комплекси різноманітних субстратів, таких як амінокислоти, дипептиди, протеїни, холін, нуклеїнові основи, нуклеотиди та інші біомолекули. Субстрат-рецепторні взаємодії каліксаренів моделюють функції природних ензимів і лежать в основі фізіологічної активності каліксаренів.

Мета роботи – дослідження процесу комплексоутворення 5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропокси-калікс[4]арену С-107 з аденозинтрифосфатом (АТР) та аденозиндифосфатом (АДР) методами високоефективної рідинної хроматографії та комп'ютерного моделювання.

Встановлено, що K_A каліксаренових комплексів з АТР і АДР у водних розчинах становить 3000–6000 М⁻¹ відповідно. Молекулярне моделювання структури каліксарену С-107 і його комплексів з АТР і АДР здійснено методом молекулярної механіки (ММ+) та напівемпіричним квантово-хімічним методом з використанням програмного пакету Nucleus Chem 8. У разі комплексоутворення спостерігається включення одного фосфонового залишку каліксарену в його порожнину. При цьому утворюються внутрішньомолекулярні водневі зв'язки Р=О...Н-Н між амінофосфоновими фрагментами. Групи NH²⁺ одного аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагмента молекули С 107 взаємодіють з γ - та β - фосфорильними залишками молекули АТР. Групи NH²⁺ другого аміно-(2-піридил)метилфосфонового фрагмента взаємодіють з α -фосфорильним залишком та гідроксилом дезоксирибози молекули АТР. В стабілізації комплексу, крім водневих зв'язків, значну роль відіграють і слабші взаємодії, а саме: π - π , ОН- π , NH²⁺- π . У разі стехіометричного комплексоутворення С-107 з АТР γ -атом фосфору набуває більшої електрофільності внаслідок утворення водневих зв'язків, що, у свою чергу, може полегшувати каліксареніндукований гідроліз зв'язку Р ^{β} -О-Р ^{γ} . Дійсно, було доведено, що зазначений калікс[4]арен стимулює гідроліз АТР; вивчено кінетичні властивості цієї реакції.

Одержані результати мають значення для подальшого розвитку уявлень про молекулярні механізми реакцій супрамолекулярного неензиматичного та ензиматичного гідролізу АТР, процесів АТР-залежного транспортування йонів Са в субклітинних мембранних структурах, а також для створення на базі каліксаренів штучних каталізаторів, здатних гідролізувати АТР, а також АТР-чутливих сенсорів.

ЗАКОНОМІРНОСТІ ВПЛИВУ ПЕРОКСИДАЦІЇ МЕМБРАН НА Na⁺,K⁺-АТР-азу РІЗНИХ ТКАНИН

КАПЛЯ О. А.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua*

Для з'ясування можливості залучення Na⁺,K⁺-АТР-ази як мішені в механізми клітинної відповіді за окисного стресу була досліджена чутливість ензиму до пероксидації в мембранних препаратах з кори головного мозку, мозкового шару нирок та слизової оболонки товстої кишки щура. Показано, що у препаратах з мозку активність убаїнрезистентного альфа1-ізоензиму Na⁺,K⁺-АТР-ази має вищу стійкість до окисної інактивації порівняно з убаїнчутливим компонентом активності альфа2- та альфа3-ізоензимів незалежно від пероксидної ліпідної деструкції мембран.

Для подальшого з'ясування закономірностей окислення альфа1-ізоензиму Na⁺,K⁺-АТР-ази досліджували його чутливість до гідроген пероксиду в препаратах мембран з медулярного шару нирок з гомогенним (за типом каталітичної субодиноці) ізоензимним складом. Na⁺,K⁺-АТР-азну активність визначали в пермеабілізованих мембранних препаратах після попередньої інкубації в середовищі генерації активних форм кисню як компонент АТР-азної активності, що інгібується убаїном.

Гідроген пероксид у присутності есенціальних іонів Na⁺,K⁺-АТР-ази інгібував ензиматичну активність у концентраційному діапазоні вище 0,1 мМ з I₅₀ = 0,92 ± 0,13 мМ. Хелатування ЕГТО істотно запобігало окисній інактивації ензиму. Це вказує на наявність у механізмі окисного інгібування стадії генерації гідроксильних радикалів, що каталізується слідовою кількістю іонів двовалентних перехідних металів, проте також свідчить про високу стійкість альфа1-ізоензиму Na⁺,K⁺-АТР-ази до дії самого гідроген пероксиду. Сам по собі FeSO₄ ефективно інгібує ензиматичну активність у концентраційному діапазоні (0,5–20 мкМ) з I₅₀ = 1,49 ± 0,13 мкМ. Таким чином, мембранозв'язаний ензим є сенсором, чутливим до низьких концентрацій іонів Fe²⁺. У присутності мікромолярних концентрацій FeSO₄ інактивація Na⁺,K⁺-АТР-ази відбувається навіть при фізіологічних концентраціях H₂O₂ (≥ 1 нМ), ступінь інактивації визначається ефектом іонів заліза і є індикатором їхньої концентрації. Таким чином, наявність інактивації альфа1-ізоензиму Na⁺,K⁺-АТР-ази нирок у наномолярному та мікромолярному діапазоні концентрацій H₂O₂ свідчить про присутність іонів перехідних металів. Подібні загальні закономірності виявлено для Na⁺,K⁺-АТР-ази слизової оболонки товстої кишки.

Стійкість альфа1-ізоформи Na⁺,K⁺-АТР-ази до дії гідроген пероксиду може мати фізіологічну важливість для функціонування ензиму за умов метаболічного стресу, а специфіка її окисного пошкодження може виявлятися під час розвитку певних епітеліальних патологій нирок та товстої кишки у разі гіперпродукції оксидантів та інтоксикації металами.

**ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСУ D-ДИМЕРУ
ФІБРИНУ З Fab-ФРАГМЕНТАМИ МОНОКЛОНАЛЬНИХ
АНТИТІЛ II-4d З МЕТОЮ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ЦЕНТРУ «с»
ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ ФІБРИНУ**

КАПУСТЯНЕНКО Л. Г., ГРИЦЕНКО П. Г., ЛУГОВСЬКОЇ Е. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: lougovsk@biochem.kiev.ua*

Раніше нами було знайдено, що у фрагменті фібрину В β 12-46 центрального домену Е знаходиться центр полімеризації «С», який разом із центром «А» (А α 17-19) бере участь у формуванні протофібрил і функціонує до відщеплення фібринопептидів В. Відомо, що фібриноген за спеціальних умов утворює фібриноподібні надмолекулярні структури без відщеплення фібринопептидів А і В, тобто без міжмолекулярної взаємодії центрів «А»-«а» та «В»-«в». Ця асоціація молекул фібриногену можливо здійснюється за рахунок взаємодії «С»-«с». Ми вважаємо, що центри «С» та «с» експоновані в молекулі фібриногену та не потребують активації тромбіном, але афінність їхнього зв'язування недостатня для здійснення полімеризації фібриногену за фізіологічних умов.

Раніше Е. В. Lugovskoy et al. за допомогою моноклональних антитіл II-4d показали, що в NH₂-кінцевій частині γ С-домену фібрину знаходиться невідомий раніше центр полімеризації, який бере участь у побудові протофібрил. Тому ми припускаємо, що центр «с», комплементарний центру «С», або його головний структурний фрагмент знаходиться саме в цій частині γ С-домену фібрину. Інформацію щодо амінокислотних залишків, які входять до складу центру «с», зміг би дати рентгеноструктурний аналіз фібриногену або D-димеру, співкристалізованих із пептидами В β 12-26 та В β 26-46, які входять до складу центру «С», або із Fab-фрагментами монАТ II-4d, котрі гальмують формування протофібрил шляхом блокування свого епітопу, що імовірно збігається із центром «с».

З метою локалізації центру полімеризації «с» в D-доміні фібрину людини, комплементарного виявленому центру «С» в E-доміні, ми одержали комплекс D-димеру з Fab-фрагментами монАТ II-4d. Для цього 57 мкг D-димеру та 30 мкг Fab-фрагментів в 1 мл 0,05 М амоній-ацетатного буфера рН 7,4; 0,1 М NaCl; 10⁻⁴ М CaCl₂ інкубували 2 год при +37 °С. Потім проводили висолювання 100%-им (NH₄)SO₄ до 50%-го насичення. Осад формувався протягом 42 год при +4 °С, далі центрифугували 30 хв при 3600 g і +12 °С. Чистоту комплексу контролювали за допомогою нативного електрофорезу (за Маурером). Одержаний препарат було відправлено для рентгеноструктурного аналізу в лабораторію професора Russell Doolittle (University of California, San Diego, USA). Одержані перші кристали даного комплексу.

Hsp60-P70S6 KINASE INTERACTION IN CARDIOMYOCYTES AT HEART FAILURE

*KAPUSTIAN L., KROUPSKAYA I., ROZHKO O.,
FILONENKO V., SIDORIK L.*

*Institute of Molecular Biology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: l.m.kapustian@imbg.org.ua*

Molecular chaperones (Hsp) are known as cardioprotective proteins and key regulators of apoptotic death or survival in cardiomyocytes. Hsp60, the main mitochondrial chaperone, is of special interest since recent data evidence for the location of 10-30% of this protein in cytoplasm of cardiomyocytes.

Recently it has been shown on the cultured neonatal cardiomyocytes that molecular chaperone Hsp60 is capable to form complexes with proapoptotic proteins Bax and Bad, not allowing them to precipitate the apoptosis. The decrease in Hsp60 level in cardiomyocytes resulted in translocation of Bax protein to mitochondria and launch of apoptosis.

On the other hand p70S6 kinase is one of the crucial protein required for cell growth and G1 cell cycle progression. p70S6 kinase phosphorylates the S6 protein of the 40S ribosomal subunit and is involved in translational control. Recently the pro-apoptotic molecule Bad was identified as one of the main p70S6K targets phosphorylated on the Ser¹¹²- and Ser¹³⁶-residues.

We supposed that Hsp60 and p70S6K could form *in vivo* a complex which plays a crucial role in regulation of stress-induced apoptotic signal pathways in cardiomyocytes. Co-immunoprecipitation study firstly identified the *in vivo* interaction between Hsp60 and p70S6K in normal and human myocardium affected by dilated cardiomyopathy (the chronic stage of heart failure). The mechanism of such complexes formation should be elucidated. We presume that Hsp60 is a general connecting link in the regulation of cardiomyocytes apoptotic signalling at heart failure progression.

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ ТА ІШЕМІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ЦИРКАДІАЛЬНИХ ГЕНІВ У КЛІТИНАХ ГЛЮМИ: ЕФЕКТ БЛОКАДИ ГЕНА *ERN1*

*¹КАРБОВСЬКИЙ Л. Л., ¹МІНЧЕНКО Д. О., ¹ГАРМАШ Я. А.,
¹КУЗНЄЦОВА А. Ю., ²МОНЕ М., ¹МІНЧЕНКО О. Г.*

*¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
²INSERM U920 Лабораторія молекулярних механізмів
ангіогенезу, Університет Бордо 1, Таленс, Франція;
e-mail: ominchenko@yahoo.com*

Молекулярні основи сигнальних систем, що визначають вищі рівні регуляції найважливіших метаболічних процесів у клітинах різних організмів поглиблено вивчаються протягом останніх десяти років. У першу чергу це регуляторні системи, що визначають циклічний характер перебігу основних процесів життєдіяльності та

поведінку організмів і які генеруються на молекулярному рівні циркадіальним годинником. Цей годинник являє із себе групу взаємопов'язаних між собою факторів: *Per1* та *Per2*, *Cry1* та *Cry2*, *BMall1* та *Clock*, функція яких контролюється низкою протеїназ та фосфатаз. Циркадіальні гени, основними з яких є *Clock*, *BMall1*, *Per1* і *Per2*, кодують синтез факторів транскрипції, які регулюють експресію досить великої групи генів сигнальної мережі і є ключовими регуляторами метаболізму як за норми, так і при багатьох патологічних станах. Встановлено, що при деяких захворюваннях мають місце порушення регуляції експресії низки циркадіальних генів, які можуть бути причетні також до виникнення та прогресії злоякісних пухлин. Відомо, що в умовах гіпоксії у клітинах активується адаптивна реакція для їхнього виживання, яка є комплексом внутрішньоклітинних сигнальних подій на порушення згортання протеїнів та накопичення їх в ендоплазматичному ретикулумі і які сприймаються сигнальним ферментом ендоплазматичний ретикулум-ядро-1 (ERN1). Мета даного дослідження полягає у вивченні експресії мРНК низки циркадіальних генів у клітинах гліоми лінії U87 в умовах гіпоксії та за дефіциту глюкози або глутаміну, а також залежності експресії цих генів від експресії ERN1. Експресію мРНК циркадіальних генів у клітинах гліоми досліджували методом кількісної полімеразної реакції комплементарних ДНК, одержаних методом зворотної транскрипції РНК.

Внаслідок проведених досліджень було встановлено, що рівень експресії мРНК циркадіального гена *Per1* у клітинах гліоми посилюється в умовах гіпоксії та вирощування клітин у середовищі без глюкози. Крім того, рівень експресії мРНК *Per1* у цих клітинах у разі їхнього вирощування в середовищі без глутаміну суттєво не змінювався. Було показано, що виключення гена, який кодує синтез сигнального ферменту ендоплазматичний ретикулум-ядро-1, у клітинах гліоми посилює рівень експресії гена *Per1*, але знімає залежність експресії цього гена від гіпоксії і не змінює ефект дефіциту глюкози у середовищі вирощування клітин на рівень експресії даного гена. В той же час, не виявлено суттєвих змін в експресії гена *Per2* в умовах гіпоксії та у разі вирощування клітин у середовищі без глюкози або без глутаміну. Виключення гена *ERN1* у клітинах гліоми посилює рівень експресії гена *Per2* та призводить до зниження його експресії в умовах гіпоксії. Встановлено, що експресія гена *BMallb* у клітинах гліоми посилюється у разі виключення гена *ERN1*, суттєво активується в умовах гіпоксії, а у клітинах без *ERN1* посилюється також в умовах гіпоксії і при дефіциті глюкози або глутаміну. Крім того, було встановлено, що рівень експресії мРНК циркадіального гена *Clock* у клітинах гліоми знижується в умовах гіпоксії і не змінюється під час вирощування клітин у середовищі без глюкози або глутаміну, а у разі виключення гена *ERN1* у клітинах гліоми рівень експресії мРНК *Clock* посилюється. Експресія гена *Cry1* у клітинах гліоми знижується в умовах гіпоксії та у разі виключення гена *ERN1*, але у клітинах без *ERN1* експресія гена *Cry1* в умовах гіпоксії не змінюється. Таким чином, рівень експресії циркадіальних генів у клітинах гліоми істотно змінюється за гіпоксії і моделях ішемії (дефіцит глюкози або глутаміну в середовищі культивування клітин) і залежить від функції гена сигнального ферменту ендоплазматичний ретикулум-ядро-1.

**АКТИВАЦІЯ ТА РЕДАГУВАННЯ
ЛЕЙЦИН-ПОДІБНИХ АМІНОКИСЛОТ ЛЕЙЦИЛ-ТРНК
СИНТЕТАЗОЮ ІЗ *Thermus thermophilus***

КОВАЛЕНКО О. П., КРИКЛИВИЙ І. А., ГУДЗЕРА О. Й.,
ТУКАЛО М. А.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: mtukalo@imbg.org.ua*

Лейцил-тРНК синтетаза здатна активувати амінокислоти, близькі за структурою до лейцину. Механізми корекції, властиві лейцил-тРНК синтетазі, як і деяким іншим аміноацил-тРНК синтетазам, дозволяють редагувати помилкові аміноацил-аденілати та/або аміноацил-тРНК, що додатково підвищує точність аміноацилювання тРНК^{Leu}. Метою дослідження було з'ясувати, наскільки ефективно відбувається активація та редагування *in vitro* низки амінокислот, як протеїнових, так і непротеїнових, лейцил-тРНК синтетазою із *T. thermophilus*. Методом пірофосфатного обміну визначено кінетичні константи реакції активації ізолейцину, валіну, метіоніну, цистеїну, норваліну, норлейцину та гомоцистеїну. Виявлено, що активація протеїнових амінокислот, за виключенням ізолейцину, відбувається з низькою ефективністю (фактор дискримінації відносно лейцину перевищує 3300), тому ймовірність активації цих амінокислот лейцил-тРНК синтетазою не перевищує загальної частоти помилок в амінокислотних послідовностях протеїнів. Непротеїнові амінокислоти та ізолейцин активуються досить ефективно, що потребує залучення додаткових механізмів корекції продуктів помилкової активації.

Константи швидкості редагування помилкових аміноацил-аденілатів/аміноацил-тРНК визначали за накопиченням у реакційній суміші АМР. Найшвидше відбувається редагування непротеїнових амінокислот – норваліну, норлейцину та гомоцистеїну. У разі протеїнових амінокислот спостерігали значно нижчі швидкості накопичення АМР, що особливо характерно для розгалужених амінокислот – валіну та ізолейцину.

Для з'ясування ролі редагувального домену лейцил-тРНК синтетази у корекції досліджуваних амінокислот використовували мутантну форму ензиму. Мутація D347A ускладнює правильну фіксацію амінокислоти (незалежно від її специфічності) в активному центрі редагувального домену. Виявлено, що мутація призводить до зниження швидкості редагування норваліну та норлейцину у 6–7 разів, цистеїну, метіоніну та валіну – у 2–3 рази та не впливає на редагування ізолейцину та гомоцистеїну.

Одержані результати свідчать про те, що лейцил-тРНК синтетаза із *T. thermophilus* не здатна ефективно дискримінувати непротеїнові амінокислоти, схожі з лейцином, а також ізолейцин на етапі активації їх, тому редагування цих амінокислот є необхідною умовою для підтримання точності аміноацилювання тРНК^{Leu}. Всі з досліджуваних амінокислот можуть бути відредаговані у разі помилкової активації їх, але редагування непротеїнових амінокислот відбувається значно швидше, ніж протеїнових. Правильна фіксація амінокислоти в активному центрі редагувального домену є важливою умовою ефективного редагування норваліну та норлейцину, певною мірою впливає на редагування метіоніну, цистеїну та валіну і неважлива для редагування гомоцистеїну та ізолейцину.

ОЧИСТКА ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПІД-ТРАНСФЕРНОГО ПРОТЕЇНУ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ

¹КОВАЛЬОВА В. А., ²ГУТ І. Т., ¹ГУТ Р. Т.

¹Національний лісотехнічний університет України, Львів;

²Лондонський університет, Велика Британія;

e-mail: romangout@yahoo.com

Ліпід-трансферні протеїни (ЛТР) – невеликі (7–9 кДа) позитивно заряджені (pI~9) секреторні протеїни із характерною тривимірною структурою, утвореною чотирма спіралями, які формують внутрішню кишеню для зв'язування ліпідів. ЛТР здатні переносити *in vitro* жирні кислоти, фосfolіпиди, гліколіпиди та стероїди між мембранами. Відомі такі посттрансляційні модифікації ліпід-трансферних протеїнів, як О-глікозилювання та ацилювання вищими жирними кислотами. До сьогодні залишається нез'ясованою роль ЛТР у фізіології рослин. Є факти, що свідчать про залучення ЛТР у процеси ембріогенезу в рослин, утворення кутину, в захисні реакції проти фітопатогенів та адаптацію до стресових чинників довкілля. ЛТР деяких рослин є сильними алергенами.

Метою нашої роботи було виділити ліпід-трансферний протеїн сосни звичайної і дослідити його властивості. Для його очистки розроблено схему, яка включала наступні етапи: екстракція протеїнів із проростків сосни сульфатною кислотою, постадійне осадження їх сульфатом амонію, виділення фракції термостабільних протеїнів та іонообмінна хроматографія на фосфоцелюлозі у градієнті концентрації хлориду натрію. Внаслідок цих процесів отримано електрофоретично гомогенний препарат протеїну із молекулярною масою біля 12 кДа. Мас-спектрометричним аналізом триптичних пептидів встановлено приналежність очищеного протеїну до родини ліпід-трансферних протеїнів.

Досліджено активність ліпід-трансферного протеїну сосни звичайної щодо фітопатогенних мікроорганізмів. Встановлено, що ЛТР сосни за концентрації 8,4 мкг/мл на 50% пригнічує ріст фітопатогенного гриба *Fusarium oxysporum*.

Лектино-дот та Вестерн-блот аналізом із використанням кон'югатів лектин–пероксидаза хрому показано, що ЛТР сосни звичайної взаємодіє із D-галактозоспецифічними та N-ацетил-D-глюкозаміноспецифічними лектинами, що дає підстави припустити, що цей протеїн є глікозильованим.

Отже, нами вперше одержано в очищеному вигляді ліпід-трансферний протеїн із представника родини *Pinaceae* і виявлено його антифунгальні властивості. У подальшому планується клонувати ген *LTP* сосни звичайної, одержати рекомбінантний аналог цього протеїну та дослідити його біохімічні, структурні та функціональні властивості.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ СТРУКТУРОЮ ТРОМБІНУ ТА ЙОГО СТАБІЛЬНІСТЮ

КОЛОДЗЕЙСЬКА М. В., СОКОЛОВСЬКИЙ В. А.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: olgagorn@yandex.ru*

Вивчення дестабілізації і дезактивації тромбіну має фундаментальне значення для сучасної ензимології і клінічної медицини.

Нами представлено результати досліджень стабілізації молекули тромбіну низкою амінокислот. З'ясовуючи механізм стабілізації ензиму амінокислотами вивчено його температурну інактивацію.

Знайдено, що більшість амінокислот характеризується тією чи іншою мірою захисною дією, сповільнюючи температурну інактивацію ензиму. Визначено відповідність між стабілізуючою дією амінокислот і специфічністю тромбіну. Найбільше, порівняно з іншими амінокислотами, тромбін стабілізується L-аргініном та DL-лізином. Показано стабілізуючий вплив на цей фермент L-глутамінової кислоти, на відміну від дії останньої на трипсин, що зв'язано, очевидно, зі своєю структурою активного центру тромбіну, а саме наявністю аніонного зв'язуючого центру, який містить Lys68, Arg72, Arg77 та інші. Винятком є підвищена стабілізація тромбіну такими амінокислотами, як фенілаланін, DL-серин, DL-метіонін.

Встановлено, що амінокислоти стабілізують тромбін, утворюючи сполуку з реактивним центром його молекули, подібно до сполук ензим-субстрат. Стабільність макроструктури значною мірою залежить від стану його реактивного центру: молекули тромбіну, які містять вільний реактивний центр, лабільніші, ніж ті, в яких реактивний центр зв'язаний з реагентом більш-менш специфічного характеру. Іншим проявом стабілізації тромбіну амінокислотами може бути гальмування процесу автолізу.

ВЗАЄМОДІЯ ТРОМБІНУ ЛЮДИНИ З ОРГАНІЧНИМИ ЛІГАНДАМИ ІОННОЇ ПРИРОДИ

КОЛОДЗЕЙСЬКА М. В., СОКОЛОВСЬКИЙ В. А.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: olgagorn@yandex.ru*

Тромбін є алостеричним ензимом із прокоагулянтною та антикоагулянтною активністю, яка може бути модульована іонами натрію, тромбомодуліном та невеликими синтетичними молекулами.

Досліджено взаємодію тромбіну з органічними лігандами іонної природи, які мають неполярні групи. Показано, що у разі зв'язування ензиму з лігандами основою є електростатична взаємодія, тоді як гідрофобне зв'язування відіграє другорядну роль в реакції ензим-ліганд. Цей факт підтверджує відсутність взаємодії між тромбіном і риванолом, який має позитивний заряд і громіздку гідрофобну групу.

Одержано нові дані щодо лігандної специфічності субстратзв'язувальної ділянки активного центру тромбіну. Показано важливість кількості гідрофобних груп лігандів у взаємодії з ензимом.

Припускається, що зв'язування молекули тромбіну з органічними лігандами відбувається за рахунок аполярної ділянки зв'язування, що обумовлює гідрофобні взаємодії, а також за рахунок аніонної ділянки домену активного центру тромбіну, що має у своєму складі аніонзв'язувальну ділянку, в якій знаходяться основні амінокислоти – аргінін, лізин. Показано, що сполуки, у складі яких є аніон SO_3^{2-} та кілька рознесених у просторі громіздких гідрофобних груп, взаємодіють з ензимом інтенсивніше.

Вивчення взаємодії тромбіну з низкою органічних лігандів іонної природи дає цінну інформацію про природу взаємодії низькомолекулярних сполук із додатковими ділянками активного центру молекули тромбіну та розширює підходи для створення унікальних антитромбінових агентів, необхідних для розвитку нових напрямів терапії.

ВТОРИННА СТРУКТУРА ДОМЕНУ PBS ГЕНОМНОЇ РНК ВІЛ-1 В ІЗОЛЯТАХ РІЗНИХ СУБТИПІВ

КОЛОМІЄЦЬ І. М., ЗАРУДНА М. І., ПОТЯГАЙЛО А. Л., ГОВОРУН Д. М.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: apotyahaylo@gmail.com*

Домен PBS, який є необхідним для ініціації зворотної транскрипції геномної РНК вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ-1), містить PBS-сигнал (primer binding site) завдовжки 18 нт, що утворює дуплекс із 3'-кінцевою частиною праймеру tRNA(lys3). У літературі припускається наявність додаткових місць зв'язування праймеру з доменом, зокрема із AAA та CCCUCA трактами або з PAS-сигналом (primer activating signal). Окрім того припускається, що два дуплекси домену PBS, один з яких містить PAS-сигнал, розпізнаються зворотною транскриптазою. Моделі вторинної структури домену PBS є представленими в основному для ізолятів LAI/HXB2, NL4.3 та MAL.

Мета роботи полягала у дослідженні структури домену PBS геномної РНК ВІЛ-1 різних субтипів та рекомбінантних форм за допомогою моделювання вторинної структури РНК та філогенетичного аналізу. Первинні послідовності промРНК ВІЛ-1, які включають домен PBS, відбиралися з GenBank. Вторинну структуру передбачували з допомогою програми mfold (M. Zuker).

Дослідження структури домену PBS у 1067 геномних РНК ВІЛ-1 показало, що у більшості ізолятів субтипів С та F, а також 75% ізолятів субтипів В та D домен PBS згортається у структуру з U5-шпилькою, а у більшості ізолятів субтипів А, G, А/Е та А/G – із U5(AA)-шпилькою. Показано, що структура домену PBS розрізняється за наявністю шпильок U5, U5(AB) та U5(AA), експонуванням додаткових місць зв'язування праймеру та наявністю двох дуплексів, які розпізнаються зворотною транскриптазою. Вперше показано, що в ізолятах із U5-шпилькою у домені PBS область, яка містить PBS-сигнал, утворює шпильку різної довжини (11–24 нт)

із вільною енергією від 4 до 10 ккал/моль, що може впливати на ефективність зв'язування праймеру. Окрім того, виявлено особливості структури U5-шпильки та нижньої частини домену PBS в ізолятах досліджених субтипів.

На основі одержаних даних зроблено висновок про те, що, незважаючи на високу гетерогенність первинної послідовності домену PBS, три додаткових місця зв'язування праймеру з доменом та дуплекс з PAS-сигналом є високо консервативними для всіх субтипів. Другий дуплекс, що розпізнається зворотною транскриптазою, є консервативним для більшості ізолятів субтипів B, C, D та F.

ЛІПІДИ ТА АКТИВНІСТЬ КАЛЬПАЇНУ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ

КОЛЧИНСЬКА Л. І., МАЛИШЕВА М. К.

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail:luko@biph.kiev.ua*

Кальпаїни – родина кальційзалежних протеїназ, які відіграють важливу роль у різноманітних фізіологічних та патофізіологічних процесах. Зважаючи на те, що концентрації кальцію, необхідні для активації обох найбільш розповсюджених форм кальпаїну, багаторазово перевищують концентрацію цього іона в нервових клітинах, а також на постійну присутність у клітинах специфічного протеїнового інгібітора – кальпастатину, вважається, що молекулярний механізм активації цього ензиму є досить складним. Було висунуте припущення, що кальпаїн переходить в активний стан тільки після приєднання до клітинних мембран, де підвищується його спорідненість до кальцію, а в цитоплазмі він постійно перебуває в неактивній формі. Однак в наших дослідках на субклітинних фракціях головного мозку щурів було показано, що питома активність кальпаїну в цитоплазматичній фракції головного мозку є набагато вищою, ніж в мембранних фракціях, і переважна більшість сумарної активності кальпаїну знаходиться в цитоплазмі. Серед факторів, що здатні впливати на спорідненість ензиму до кальцію, а відтак і на його активність, ліпіди клітинних мембран вважаються одним із найважливіших, хоча наявні експериментальні дані з цього приводу досить суперечливі. Використовуючи як субстрат казеїн, мічений флуоресцентною міткою, ми показали, що детергенти тритон X-100 та дигітонін в концентрації 0,3% підвищують активність кальпаїну в мітохондріальній фракції головного мозку щурів, не впливаючи на його активність в цитоплазматичній фракції. Можливо, активний центр ензиму, вмонтованого в мембрану, стає доступнішим для субстрату. Ми вивчали також вплив фосфоліпідів, що входять до складу клітинних мембран, на активність кальпаїну цитоплазматичної фракції головного мозку щурів. Фосфоліпіди використовували у вигляді суспензії моношарових або багатошарових везикул. Виявлено, що від'ємно заряджені фосфатидилсерин та кардіоліпін пригнічують активність кальпаїну цитоплазматичної фракції головного мозку, а позитивно заряджений фосфатидилхолін зумовлює невелику стимуляцію ензиматичної активності у присутності субмаксимальних концентрацій кальцію. Ці ефекти не залежать від типу фосфоліпідних везикул. Можливо припустити, що у присутності субмаксималь-

них концентрацій кальцію відбувається взаємодія фосфатидилхолінових везикул із гідрофобною частиною протеїнової молекули кальпаїну, що приводить до його активації. Така взаємодія може бути дуже суттєвою для активації кальпаїну в клітині.

МОДИФІКАЦІЯ МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ТКАНИННОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМІНОГЕНУ

КОНДРАТЮК А. С., ДІОРДІЄВА С. І., ГРИНЕНКО Т. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: biochimik@ukr.net*

Визначення рівня тканинного активатора плазміногену (t-PA) належить до основних тестів клінічного дослідження стану системи гемостазу. Мета роботи: розробити спосіб визначення t-PA з використанням desAABB-фібрину як стимулятора процесу активації. Принцип методу полягає в активації плазміногену тканинним активатором на фібрині. Рівень t-PA визначається за амідолітичною активністю утвореного плазміну.

Перевірено точність, відтворюваність, специфічність, межі визначення, лінійність способу та побудовано стандартну калібрувальну криву для визначення t-PA у плазмі крові. Реакцію активації проводили в мікропланшетах при температурі 37 °С. Інкубаційне середовище містило: плазміноген 50 мкг/мл, фібрин-мономер 120 мкг/мл, 5–10 мкл плазми крові, 0,3 мМ S₂₂₅₁ та 0,05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4 з 0,15 NaCl. Рівень *n*-нітроаніліну вимірювали через 2 год за довжини хвилі 405 нм.

Лінійна ділянка стандартної кривої відповідає вмісту тканинного активатора 0,1–10 од. в 1 мл плазми, стандартне відхилення кожної з точок складає 0,15–10,7%. Нижня межа визначення активності дорівнює 0,1 од. в 1 мл плазми. Стандартне відхилення для трьох незалежно побудованих кривих складає менше 3,5%. Зміна концентрації плазміногену в інкубаційному середовищі в межах від 10 до 50 мкг/мл, а також концентрація кальцію до 0,25 мМ не впливає на визначення активності.

Висновки: розроблено модифікацію методу COASET t-PA, суть якої полягає у використанні desAABB-фібрину як стимулятора активації плазміногену. Аналітичні характеристики запропонованого методу відповідають загальноприйнятим вимогам. Метод може використовуватися у клінічній та лабораторній практиці для визначення функціонально активного тканинного активатора плазміногену.

**ЗМІНИ ЕКСПРЕСІЇ ТИРОЗИЛ-тРНК
СИНТЕТАЗИ В КАРДІОМІОЦИТАХ МОДЕЛЬНИХ
МИШЕЙ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ
ДИЛАТАЦІЙНОЮ КАРДІОМІОПАТІЄЮ**

КОНДРАТЮК Ю. Ю., СИДОРИК Л. Л., КОРНЕЛЮК О. І.

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
e-mail: kondratyuk_yulya@ukr.net*

Дилатаційна кардіоміопатія (ДКМП) є однією з головних причин важкої серцевої недостатності, при якій необхідна трансплантація серця через дилатацію шлуночків та втрату скоротливої функції. Причини серцевої дисфункції все ще невідомі, але вони є результатом змін експресії протеїнів у кардіоміоцитах. Відомо, що компоненти протеїнсинтезуючого апарату клітини можуть залучатися до процесів виникнення та розвитку багатьох хвороб, від аутоімунних до ракових. Раніше було показано роль деяких аміноацил-тРНК синтетаз (триптофаніл-, лізил-, гліцил- та тирозил-тРНК синтетаз) у розвитку і прогресії системних аутоімунних захворювань, таких як системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит та поліміозит. Вивчення можливої ролі цих протеїнів у розвитку серцево-судинних патологій з аутоімунними процесами, такими як інфаркт, ішемія або серцева недостатність є важливим як з фундаментальної, так із практичної точки зору. Метою даної роботи було дослідження можливих змін рівня експресії тирозил-тРНК синтетази (TyrRS) в кардіоміоцитах модельних мишей із експериментальним захворюванням, подібним до дилатаційної кардіоміопатії людини.

Для вивчення змін рівня експресії TyrRS в динаміці захворювання була використана експериментальна модель міозиніндукованого аутоімунного пошкодження міокарда мишей лінії Valb/c, подібного до ДКМП людини. Досліджувались наступні групи тварин: контрольна (здорові миші лінії Valb/c) та експериментальна — через 1, 2, 4 місяці після індукції захворювання. Кількісний вміст TyrRS визначали методом Вестерн-блот аналізу сумарних лізатів сердець мишей.

Внаслідок проведених експериментів було виявлено зміни кількісного вмісту TyrRS у тканинах сердець мишей, починаючи із другого місяця після індукції захворювання. Тобто одержані дані вказують на потенційну роль синтетази в розвитку серцевих патологій. Обговорюється можлива роль тирозил-тРНК синтетази в адаптаційних змінах міокарда та участь молекулярних шаперонів за дії стресорних чинників.

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО СОСТАВА ПРОТЕИНОВ ТКАНЕЙ ЧЕРНОМОРСКИХ РЫБ

КОРОЛЁВА А. В., ЗАЛЕВСКАЯ И. Н., КОБЗАР М. А.

*Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского,
Симферополь, Украина;
e-mail: anna.undymiel@gmail.com*

Целью исследований явилось изучение электрофоретического состава протеинов мышечной ткани донного вида рыб (морского ерша) в зависимости от уровня загрязнения среды обитания этих организмов, а также исследование возрастных и половых особенностей электрофоретических спектров мышечных протеинов морского ерша.

Фракционный состав мышечных протеинов рыб изучали методом диск-электрофореза. В ходе экспериментов было получено около двухсот электрофореграмм протеинов мышечной ткани, извлеченной у 65 морских ершей. Рассчитывали стандартные среднестатистические электрофоретические спектры (ЭФ-спектры). Статистическая обработка данных производилась с помощью стандартной программы «EXCEL».

В результате исследований были выявлены особенности электрофоретических спектров протеинов мышечной ткани морского ерша в зависимости от антропогенной нагрузки на среду их обитания (разные бухты с разным уровнем загрязнения). Они особенно проявляются в различном распределении протеиновых фракций в ЭФ-спектрах, разной гетерогенности протеиновых зон, а также большим количеством фракций и большей электрофоретической подвижности мышечных протеинов рыб, обитающих в более загрязненной акватории. Также установлены возрастные особенности протеинового состава мышечной ткани морского ерша, проявившиеся в увеличении количества фракций и относительной электрофоретической подвижности в ЭФ-спектрах у более старших рыб, в значительной гетерогенности предстартовой и трансферриновой зон у рыб самых старших групп. В ходе качественного и количественного анализа электрофоретических спектров протеинов мышечной ткани исследуемых рыб не было выявлено половых различий, что может быть связано с особенностями метаболических процессов в организме рыб, который готовится к размножению. Возможно, при изучении ЭФ-спектров организмов рыб в период покоя будут выявлены более резкие отличия, что будет изучаться в ходе дальнейших исследований.

Таким образом, изучение особенностей электрофоретического состава протеинов мышц морского ерша показало различия в ЭФ-спектрах в зависимости от антропогенной нагрузки и возраста рыб. Изучение этого вопроса может способствовать оценке физиолого-биохимического состояния рыб и среды их обитания.

**РЕКОМБІНАНТНІ АНАЛОГИ РОЗЧИННОЇ ФОРМИ
НВ-EGF ЛЮДИНИ ТА ЇХНЄ ЗАСТОСУВАННЯ**

КОРОТКЕВИЧ Н. В., ГОНЧАРЕНКО А. М., ЛАБИНЦЕВ А. Ю.,
КОЛИБО Д. В., РОМАНЮК С. І., КОМІСАРЕНКО С. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: gnr.nata@gmail.com*

Гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактора росту – НВ-EGF (від англ.: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor), належить до родини епідермальних ростових факторів. НВ-EGF синтезується у вигляді мембрано-заякореного попередника pro-НВ-EGF, який під дією мембранних металопротеїназ здатен переходити у розчинну форму – sНВ-EGF (soluble НВ-EGF). Зв'язування sНВ-EGF з відповідним рецептором активує сигнальні шляхи, які відіграють вирішальну роль у регулюванні процесів проліферації та диференціації клітин, інгібуванні апоптозу, що є особливо важливим при злоякісних перетвореннях. Саме тому рекомбінантні аналоги цього фактора можна розглядати як потенційні компоненти лікарських засобів із регенеративною дією та як важливі інструменти фундаментальних досліджень.

Метою цієї роботи було одержати активний рекомбінантний аналог sНВ-EGF людини в бактерійній системі експресії та дослідити його вплив на процеси міграції та диференціації клітин чутливих ліній *in vitro*.

Під час досліджень було проведено експресію рекомбінантного аналога sНВ-EGF людини з кДНК, одержаної із клітин гістоцитарної лімфоми людини U937, оптимізовано умови його виділення та очистки. Було показано, що одержаний аналог sНВ-EGF зберігає здатність взаємодіяти з гепарином, а також В-субодиницею дифтерійного токсину. Крім того, за допомогою флуоресцентних похідних sНВ-EGF показана здатність цього фактора зв'язуватись із рецепторами чутливих клітин. Попередні дослідження біологічної активності рекомбінантного sНВ-EGF підтвердили його здатність стимулювати проліферацію та міграцію фібробластів.

Таким чином, одержаний рекомбінантний sНВ-EGF людини може бути використаний у фундаментальних дослідженнях, наприклад, для дослідження механізмів реалізації біологічної активності НВ-EGF, його участі у процесах диференціації та міграції, а також у різних патологічних процесах, зокрема злоякісної трансформації. Також перспективним може бути дослідження здатності одержаного рекомбінантного sНВ-EGF стимулювати регенеративні процеси в організмі.

Автори висловлюють подяку пров.н.с., к.ф.-м.н. В. Ф. Горчеву та ст.н.с., к.т.н. О. Ю. Чуніхіну за допомогу у проведенні досліджень з використанням конфокального мікроскопа та проточного цитофлуориметра.

МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА, ЯКІ РОЗПІЗНАЮТЬ НОВУ АНТИГЕННУ ДЕТЕРМІНАНТУ НА D-ДИМЕРІ ФІБРИНУ ЛЮДИНИ

*КОСТЮЧЕНКО О. П., КОЛЕСНИКОВА І. М., ЛИТВИНОВА Л. М.,
КОШЕЛЬ Т. А., ЛУГОВСЬКОЇ Е. В.*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kolesnikova@biochem.kiev.ua*

D-димер є молекулярним маркером розщеплення фібрину плазміном і формується за послідовної дії трьох ензимів: тромбіну, фактора XIIIa та плазміну. Тромбін розщеплює фібриноген з утворенням фібрину і активує перетворення фактора XIII у XIIIa, який каталізує формування ковалентних зв'язків між D-доменами у полімерному фібрині. Нарешті, плазмін розщеплює прошитий фібрин із звільненням продуктів деградації фібрину, в тому числі і D-димеру.

Мета роботи – одержати мноноклональні антитіла (монАТ), специфічні до D-димеру фібрину, які б розпізнавали іншу антигенну детермінанту, ніж раніше одержані нами монАТ до D-димеру III-3B.

Як антиген було використано D-димер. Гібридизували клітини селезінки імунізованої миші та клітини мієломи X63-Ag8.653 у присутності 50% поліетиленгліколю. Клітини культивували на селективному поживному середовищі. Наявність специфічних антитіл визначали за допомогою тІФА. Позитивні гібридоми клонували методом кінцевих розведень. МонАТ виділяли на протеїн G-сефарозі.

Показано, що монАТ I-1D належать до ізополу IgG1, K_D для них з D-димером складає $5,0 \cdot 10^{-10}$ М. Результати непрямого та конкурентного тІФА для монАТ I-1D свідчать про те, що ці антитіла добре реагують із D-димером, незначною мірою з D-фрагментом і не реагують із фібриногеном, фібрином desAABB та з E-фрагментом фібриногену. За допомогою імуноблот-аналізу з відновленим D-димером було показано, що монАТ I-1D реагують лише з β -поліпептидним ланцюгом.

Встановлено, що в конкурентному тІФА монАТ I-1D та раніше нами одержані монАТ III-3B не конкурують за місце зв'язування на молекулі D-димеру. Таким чином, їх можна застосувати для кількісного визначення D-димеру у плазмі крові людини за допомогою бісайтового тІФА, імунохроматографічного та латексного методів.

ІНГІБІТОРНИЙ ВПЛИВ КАЛІКСАРЕН- МЕТИЛЕНБІСФОСФОНОВИХ КИСЛОТ НА ПОЛІМЕРИЗАЦІЮ ФІБРИНУ

¹КОШЕЛЬ Т. А., ¹ЛУГОВСЬКОЮ Е. В., ¹ГРИЦЕНКО П. Г.,
²КАЛЬЧЕНКО В. І., ²ЧЕРЕНКО С. О., ¹КОЛЕСНИК Є. О.

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: Tanya_kow@list.ru;

²Інститут органічної хімії НАН України, Київ

У процесі активації системи зсідання крові утворюється фермент тромбін, який перетворює фібриноген у фібрин дезАА, здатний до спонтанної полімеризації за рахунок міжмолекулярного зв'язування комплементарних сайтів «А» та «а». Надалі відбувається утворення протофібрил, перетворення їх у фібрили та в кінцевому рахунку формується тривимірна сітка фібрину – каркас будь-якого тромбу. В останні роки підвищився інтерес до вивчення впливу каліксаренів на біохімічні процеси через здатність їх впливати на різні біохімічні процеси.

Метою нашої роботи було дослідити вплив каліксаренів на полімеризацію фібрину, а також на зсідання плазми крові людини.

Турбідиметричним аналізом було показано, що каліксарени С-98, С-192, які містять відповідно два та чотири залишки метиленбісфосфонові кислоти, та С-145 (натрієва сіль каліксарену С-192) специфічно гальмують полімеризацію фібрину з IC_{50} $1,3 \cdot 10^{-4}$, $0,5 \cdot 10^{-6}$ та $2,5 \cdot 10^{-6}$ М відповідно. Молярне співвідношення каліксарену С-192 до фібрину в середовищі полімеризації при цьому складає 1,7 до 1.

За допомогою трансмісійного електронного мікроскопа встановлено, що каліксарен С-192 інгібує першу стадію полімеризації фібрину – побудову протофібрил з мономерних молекул. За допомогою HPLC дослідили утворення комплексу С-192 із синтетичним пептидом Gly-Pro-Arg-Pro, який імітує центр полімеризації фібрину «А» (A α 17-19), що залучається у процес формування протофібрил. Отже, інгібуюча дія С-192 відбувається за рахунок блокування вищезгаданого центру.

Було досліджено інгібуючу дію каліксарену С-192 на зсідання плазми крові людини. Одержані дані показують, що С-192 вдвічі знижує протромбіновий індекс та частково активований тромбoplastиновий час в нормальній плазмі крові людини при концентрації С-192 $7,0 \cdot 10^{-5}$ та $1,7 \cdot 10^{-5}$ М відповідно.

Таким чином, вперше показано, що каліксарен С-192 та його натрієва сіль С-145 є специфічними інгібіторами полімеризації фібрину та зсідання плазми крові. Ці сполуки можуть бути використані як основа для розробки нового класу антитромботичних препаратів.

КІНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВЗАЄМОДІЇ КАТІОНІВ МЕТАЛІВ З МІТОХОНДРІАЛЬНОЮ ПОРОЮ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ПРОНИКНОСТІ

КРАВЕНСЬКА Є. В., ДУБИЦЬКИЙ Л. О., ФЕДІРКО Н. В.

Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: k.evgeniya.v.@gmail.com

Відомо, що деякі двовалентні метали виявляють стимулюючу дію щодо мітохондріальної (Мх) пори неспецифічної проникності, а отже викликають набрякання Мх та вихід Ca^{2+} з них. Такі процеси супроводжуються значними морфо-функціональними порушеннями на рівні клітини та зрештою можуть призвести до її некротичної та/або апоптичної загибелі. Проте, низка питань щодо молекулярної природи Мх пори, її функціонування та взаємодії з ефекторами вивчені недостатньо. Метою даної роботи було встановити кінетичні характеристики взаємодії катіонів металів з Мх порою неспецифічної проникності та здійснити порівняльний аналіз одержаних даних.

Дослідження проводили на ізольованих Мх печінки білих безпородних щурів, масою 180–250 г. Мх виділяли методом диференціального центрифугування. Набрякання Мх реєстрували за допомогою спектрофотометра СФ-26 і оцінювали процес за латентним періодом, швидкістю та амплітудою. Реєстрацію виходу Ca^{2+} з Мх здійснювали з використанням Ca^{2+} -селективного електрода Orion 93-20 та оцінювали процес за швидкістю, тривалістю та амплітудою. Концентрацію мітохондріального протеїну визначали за методом Лоурі.

Підтверджено здатність Ca^{2+} , Cd^{2+} та Zn^{2+} до активації Мх пор неспецифічної проникності.

Зі збільшенням концентрації доданого Ca^{2+} (5–100 мкмоль/л) скорочується латентний період Ca^{2+} -індукованого набрякання Мх, зростає його швидкість, а амплітуда достовірних змін не зазнає. Залежність швидкості Ca^{2+} -індукованого набрякання Мх від концентрації доданого Ca^{2+} описується степеневою функцією (максимальна швидкість (V_{max}) та константа напівнасичення ($K_{0,5}$) становили відповідно 0,609 од./хв на 1 мг протеїну і 19,848 мкмоль/л). Зі зростанням концентрації доданого Ca^{2+} (10–150 мкмоль/л) збільшується швидкість та амплітуда Ca^{2+} -індукованого виходу Ca^{2+} з Мх, а його тривалість скорочується. Залежність швидкості Ca^{2+} -індукованого виходу Ca^{2+} з Мх від концентрації доданого Ca^{2+} описується параболічною кривою.

Зі збільшенням концентрації доданого Cd^{2+} (1–50 мкмоль/л) зростає швидкість та скорочується латентний період Cd^{2+} -індукованого набрякання Мх, проте зменшується і його амплітуда. Залежність швидкості Cd^{2+} -індукованого набрякання Мх від концентрації доданого Cd^{2+} описується степеневою кривою (V_{max} та $K_{0,5}$ становить відповідно 1,084 од./хв на 1 мг протеїну і 7,276 мкмоль/л). Зі зростанням концентрації доданого Cd^{2+} (0,1–3,0 мкмоль/л) збільшується швидкість Cd^{2+} -індукованого виходу Ca^{2+} з Мх, скорочується його тривалість, а амплітуда достовірно не змінюється. Залежність швидкості Cd^{2+} -індукованого виходу Ca^{2+} з Мх від концентрації доданого Cd^{2+} описується параболічною функцією.

Зі збільшенням концентрації доданого Zn^{2+} (0,1–7,0 мкмоль/л) скорочується латентний період Zn^{2+} -індукованого набрякання Мх, його амплітуда достовірних змін не зазнає, а швидкість має куполоподібний (параболічний) характер з максимумом у точці 3,0 мкмоль/л доданого Zn^{2+} (V_{max} та $K_{0,5}$ висхідної гілки параболи становили відповідно 0,283 од./хв на 1 мг протеїну і 0,219 мкмоль/л). Зі зростанням концентрації доданого Zn^{2+} (1–10 мкмоль/л) збільшується швидкість та скорочується тривалість Zn^{2+} -індукованого виходу Ca^{2+} з Мх, а його амплітуда достовірно не змінюється. Залежність швидкості Zn^{2+} -індукованого виходу Ca^{2+} з Мх від концентрації доданого Zn^{2+} описується параболічною кривою.

Продемонстровано нездатність Pb^{2+} та Co^{2+} до стимуляції Мх пори неспецифічної проникності.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що Ca^{2+} , Cd^{2+} та Zn^{2+} , на відміну від Pb^{2+} та Co^{2+} , взаємодіють з Мх порою неспецифічної проникності, активуючи її за відмінними механізмами.

ВИДОВІ ТА ІНДИВІДУАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ІЗОЕНЗИМІВ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ СПЕРМИ

КУЗЬМІНА Н. В., ОСТАПІВ Д. Д., ГУЛЕЮК Н. Л., ГУМЕНЕЦЬКИЙ І. Є.

*Інститут біології тварин НААН України, Львів;
ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України», Львів;
e-mail: inenbiol@mail.lviv.ua; prion_nvc@ukr.net*

Генерація активних форм кисню (АФК) – необхідна умова для дозрівання, існування та здатності сперміїв запліднювати ооцит. Проте, після еякуляції і в процесі виживання, надмірно високе утворення АФК призводить до пошкодження мембран, втрати рухливості та загибелі статевих клітин. Вміст АФК на оптимальному рівні підтримується антиоксидантною системою, ключову роль в якій відіграє супероксиддисмутаза (СОД). Доведено, що СОД забезпечує захист структур статевих клітин, і в цьому процесі важливу роль відіграють її ізоформи. Оскільки фізіолого-біохімічна характеристика сперми та придатність до технологічної обробки залежить від виду самців, вивчали спектр і активність СОД в еякулятах бугаїв, кнурів і чоловіків. Для досліджень використані свіжоотримані еякуляти бугаїв ($n = 12$), кнурів ($n = 6$) і чоловіків ($n = 5$). Методом електрофорезу в 10%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) з подальшим специфічним фарбуванням пластин гелю нітросинім тетразолієм, встановлено якісний склад протеїнів СОД: в усіх досліджених зразках виявлено п'ять ізоформ ензиму, які за швидкістю руху в ПААГ позначили від найменш – до максимально рухливої як S1, S2, S3, S4 та S5. Виявлено, що ізоензимний спектр протеїнів СОД характеризується видовими відмінностями: різною швидкістю міграції й інтенсивністю прояву фракцій у ПААГ. Так, найменшу рухливість мають протеїни СОД сперми кнурів, а найбільшу – чоловіків. Крім того, особливістю електрофореграм сперми чоловіків є чітка вираженість і яскравість S2-смуги. Для всіх одержаних спектрів характерні слабкий прояв і мінорність S1-смуги, а також висока активність протеїнів СОД S4-смуги. Встановлено, що у профілі ізоензимного спектра СОД сперміїв бугая, кнура

і чоловіка після відмивання від плазми відсутні S1- і S2-смуги, а склад фракцій ензиму плазми подібний до електрофореграм цільної сперми. Індивідуальні особливості ізоформ СОД в еякулятах виявляються різною інтенсивністю смуг S1, S3 та S5, що свідчить про неоднаковий внесок їх у сумарну активність ензиму.

ВЗАЄМОДІЯ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-99 З МІОЗИНОМ МІОМЕТРІЯ

ЛАБИНЦЕВА Р. Д., БЕВЗА А. А., БОБРОВСЬКА О. М.,
БЕВЗА О. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: labyntseva@biochem.kiev.ua*

Міозин є Mg^{2+} -залежною АТР-азою. Катіони Mg^{2+} відіграють важливу роль у каталізі гідролізу АТР міозином, в утворенні та стабільності комплексу нуклеозидфосфатів з субфрагментом-1 (голівки, S1) міозину. Раніше нами був показаний інгібуючий вплив каліксарену С-99 на АТР-азу S1 міозину міометрія. З метою вивчення механізму гальмівної дії каліксарену на АТР-азу S1 міозину був досліджений вплив цієї сполуки на кінетичні параметри АТР-гідролазної реакції за Mg^{2+} (K_{Mg} та V_{Mg}). У присутності 100 мкМ каліксарену С-99 максимальне значення ензиматичної активності, як і в контролі, спостерігається при 4 мМ Mg^{2+} , але за наявності каліксарену його рівень зменшується на 40% порівняно з контролем. Каліксарен С-99 знижує значення V_{max} реакції гідролізу АТР голівкою міозину за катіоном Mg, при цьому зменшується спорідненість ензиму до цього катіону. Отже, у цьому разі має місце змішаний тип інгібування каліксареном С-99 гідролізу АТР, що каталізується субфрагментом-1 міозину міометрія.

При дослідженні взаємодії каліксарену С-99 з міозином міометрія методом конфокальної мікроскопії з використанням моноклональних антитіл проти міозину на клітинах первинної культури міоцитів матки були виявлені відмінності у структурі розподілу міозину в міоцитах у контролі та у присутності каліксарену С-99, що може бути обумовлено конформаційними перебудовами у структурі міозину внаслідок його взаємодії з каліксареном С-99.

Одержані експериментальні дані щодо впливу каліксарену С-99 на $[Mg^{2+}]$ -залежність АТР-ази S1 міозину міометрія корелюють з результатами комп'ютерного моделювання взаємодії калікс[4]арену С-99 із субфрагментом-1 міозину гладенького м'яза у присутності Mg^{2+} . Показано, що у присутності катіонів Mg як кофактора в лігандзв'язувальному центрі (ЛЗЦ) S1 міозину змінюється просторова орієнтація комплексу каліксарен-АТР у просторі ЛЗЦ голівки міозину. Аналіз дослідженого комплексу калікс[4]арен С-99-субфрагмент-1 міозину за наявності та відсутності іонів магнію виявив характерні для таких комплексів гідрофобні взаємодії, а також водневі зв'язки за участю деяких аміногруп.

Автори вдячні член-кор. НАН України В. І. Кальченку та його колегам (ІОХ НАН України) за синтез каліксарену та обговорення експериментальних результатів.

**БІФУНКЦІОНАЛЬНІ ЛЕКТИНИ НАСІННЯ
ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО**

ЛЕВЧУК Г. М., ВОЙТОВИЧ О. М., КОБЗЕВА Д. О.

*Запорізький національний університет, Україна;
e-mail: anna.levchuck@yandex.ua*

Останнім часом все більше уваги приділяється таким біологічно активним речовинам як лектини. Завдяки своїй здатності розпізнавати та вибірково зв'язувати вуглеводи клітинних поверхонь вони знаходять дуже широке застосування у препаративній біології та медицині. Було встановлено, що роль лектинів не обмежується розпізнаванням тільки вуглеводів; вони здатні розпізнавати інші речовин – протеїни, ліпіди, вітаміни, фітогормони тощо. Серед лектинів було знайдено так звані біфункціональні лектини, які виявляють окрім вуглеводзв'язувальної ще й ензиматичну активність. Такі лектини було знайдено у представників різних таксонів рослин, тварин та мікроорганізмів.

Метою роботи було встановлення лектинової активності у кислої ліпази насіння льону олійного.

Ліпазу з подрібненого насіння льону олійного сорту Золотистий екстрагували за стандартною методикою при 8 різних значеннях рН буферних розчинів у діапазоні 4,0–5,4 та визначали ліполітичну активність титрометричним методом. Лектинову активність визначали за допомогою реакції гемаглютинації з 2%-ю суспензією еритроцитів кролика з урахуванням концентрації протеїну. При аналізі лектинову активність виражали як обернену величину – коефіцієнт лектинової активності. Дослідження проводили у п'ятикратному повторенні, результати обробляли за допомогою стандартних статистичних методів

Ліполітична та лектинова активність мала найвищий рівень при рН 4,4 та дорівнювала $3,88$ та $5,64 \times 10^7$ відносним одиницям відповідно. Найнижчий рівень активності ліпази та лектинів спостерігався при рН 5,2 та відповідно дорівнював $0,19$ та $1,61 \times 10^3$ відносних одиниць. Динаміка змін лектинової та ліполітичної активності при всіх варіантах рН буферного розчину аналогічна, що підтверджується доволі високим коефіцієнтом кореляції між цими характеристиками (+0,74). Можна припустити, що лектинова та ліполітична активність належить одному лектин–ензиматичному комплексу, в якому лектин розпізнає ліпіди, а ліпаза розщеплює.

Кисла ліпаза насіння льону олійного крім ензиматичної активності виявляє ще й лектинову, тобто насіння льону олійного містить біфункціональні лектини.

ВПЛИВ СТРУКТУРИ ЛІГАНДУ НА ПРОТИПУХЛИННІ ТА АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ

ЛЕУС І. В., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет
імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: ingaleus@mail.ru*

У попередніх роботах була представлена нова реній-платинова (Re–Pt) система. Досліджувалися три сполуки цис-дикарбоксилатного класу з пропіонатними (Re4), півалатними (Re5) та адамантанкарбоновими (Re2) лігандами. Мета роботи: дослідити протираковинну активність, антиоксидантні та антигемолітичні властивості цих сполук у системі Re–Pt та з'ясувати вплив структури ліганду на протираковинні та антиоксидантні властивості кластерних сполук. Досліджували вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові, морфологічні форми еритроцитів, концентрацію гемоглобіну, активність каталази та еритроцитарну стійкість. В усіх випадках застосування сполук ренію та cisPt спостерігається вищий протираковинний ефект порівняно з одноразовим введенням cisPt. Концентрація гемоглобіну підвищується на 5–20%. В умовах розвитку пухлини спостерігається істотне зростання неоднорідності популяції еритроцитів. Під час лікування системою Re–Pt у щурів відбувається значне підвищення кількості дискоцитів, за використання Re4+cisPt-системи кількість ехіноцитів наближається до норми, а у разі застосування терапії cisPt разом з Re5 рівень ехіноцитів нижче за норму приблизно у 4 рази. Введення Re–Pt системи сприяє зсуву максимуму гемолізу, але період стійкості еритроцитів дещо скорочується. Введення Re2 знижує рівень ТБК-активних продуктів лише на 21%. Лікування Re4 та Re5 разом із cisPt зменшує концентрацію продуктів пероксидного окислення ліпідів майже у 4 рази. У цьому модельному експерименті активність каталази істотно не змінювалась. Отже, показано, що структура ліганду кластерних сполук ренію впливає на ефективність протираковинної системи Re–Pt, її антиоксидантні та антигемолітичні властивості. Півалатний ліганд у цис-карбоксилатах диренію сприяє найбільшій ефективності Re–Pt системи щодо вищезазначених біохімічних параметрів вірогідно завдяки значному позитивному індукційному ефекту та довжині радикала.

MEMBRANE INTERACTIONS OF EUROPIUM CHELATE AS REVEALED BY FLUORESCENCE QUENCHING

¹LIMANSKAYA L. A., ¹YUDINTSEV A. V., ¹TRUSOVA V. M.,
¹GORBENKO G. P., ²DELIGEORGIEV T., ²VASILEV A.,
²KALOIANOVA S., ²LESEV N.

¹Karazin Kharkov National University, Ukraine;

²University of Sofia, Bulgaria;

e-mail: lucy_limanskaya@mail.ru

The past decades have witnessed high-throughput development of a diversity of multifunctional nanoassemblies providing unique opportunities for diagnosis, treatment and prevention of a number of severe diseases. An important and rapidly growing area where nanotechnology meets medicine implicates fabrication of drug delivery systems with improved longevity, targetability, intracellular penetration and contrast loading. Of these, highly adaptable liposome-based nanocarriers currently attract increasing attention. These systems offer a number of advantages, *viz.* biocompatibility, complete biodegradability, non-toxicity, ability to carry both hydrophilic and lipophilic payloads and protect them from chemical degradation and transformation, increased therapeutic index of drug, flexibility in coupling with targeting and imaging ligands, improved pharmacodynamic profiles compared to free drugs, reduced side effects, *etc.* As potential payload for liposomes, lanthanides and their complexes attract ever growing interest because of their pronounced antibacterial, antitumor and anticoagulation activities. Of these, europium chelates (EC), belonging to a new class of potential antitumor drugs, are of particular interest due to their high cytotoxic activity. An important step in development of liposomal formulations lies in exploration of lipid-associating abilities of the drug.

The present study was focused on examination of lipid bilayer interactions of europium chelate (here referred to as V10). To this end, hydrophobic fluorescent probe *p*-terphenyl, located in the non-polar membrane region has been employed as a reporter molecule.

Lipid vesicles composed of zwitterionic lipid phosphatidylcholine (PC) were prepared using the extrusion technique. The thin lipid film was obtained by evaporation of lipids' ethanol solutions, hydrated with 5 mM Na-phosphate buffer pH 7.4, and extruded through a 100 nm pore size polycarbonate filter.

At the first step of the study we have explored the efficiency of *p*-terphenyl incorporation into PC bilayer. Partition coefficient derived from the probe fluorimetric titration with liposomes was found to be *ca.* $(1.5 \pm 0.4) \times 10^4$, suggesting rather high *p*-terphenyl affinity for the lipid phase. Next, we have evaluated the possibility of the quenching of *p*-terphenyl fluorescence by europium chelate. Fluorescence intensity of the probe was found to decrease with increasing concentration of the drug, suggesting that V10 represents an effective quencher for *p*-terphenyl. This finding was explained by the drug penetration into hydrophobic membrane core, followed by the collision between V10 and *p*-terphenyl molecules and subsequent fluorescence quenching. At the last step of the study fluorescence quenching data were quantitatively interpreted in terms of the dynamic quenching model. Plotting the apparent quenching constants as a function of lipid concentration allowed us to estimate the partition coefficient for V10-membrane interactions, which was evaluated to be *ca.* $(3.0 \pm 0.9) \times 10^3$.

To summarize, the results obtained provide direct evidence for incorporation of europium chelate into nonpolar region of PC model membranes. The recovered ability of EC to quench *p*-terphenyl fluorescence creates a basis for development of the novel drug screening assays.

This work was supported in part by the grant #4534 from the Science and Technology Center in Ukraine and Fundamental Research State Fund (project number F.28.4/007).

АЛЬТЕРНАТИВНІ СПЛАЙС-ВАРІАНТИ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ-2 У МИШЕЙ

ЛИПОВА Н. М., МІНЧЕНКО Д. О., РАТУШНА О. О., МІНЧЕНКО О. Г.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ominchenko@yahoo.com*

Біфункціональний ензим 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза є одним із ключових ензимів регуляції як гліколізу, так і метаболізму глюкози в цілому, оскільки він контролює не лише гліколіз та глюконеогенез, але в значній мірі і перший етап метаболізму глюкози – її фосфорилування. 6-Фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза – це родина ізоензимів, які виконують одну і ту ж функцію – синтезу та розщеплення однієї сполуки – фруктозо-2,6-бісфосфату, мають дуже близькі по структурі каталітичні центри для 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази, але регуляторні ділянки у них різні, що забезпечує тканиннospецифічний характер перебігу та регуляції гліколізу, а можливо й інших процесів метаболізму глюкози. І хоча синтез 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази кодується чотирма генами, на сьогодні виявлено набагато більше різних ізоформ цього ензиму, які утворюються за рахунок альтернативного сплайсингу пре-мРНК всіх чотирьох генів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази. Альтернативні сплайс-варіанти 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази відрізняються між собою як регуляторними ділянками (N-кінець та C-кінець), так і змінами у каталітичних доменах, внаслідок чого вони є переважно монофункціональними ізоензимами по 6-фосфофрукто-2-кіназі або фруктозо-2,6-бісфосфатазі. Метою роботи було дослідження експресії 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 у мишей та виявлення нових альтернативних сплайс-варіантів даного ензиму. Для цього з допомогою двох пар праймерів, специфічних для 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 мишей, було синтезовано комплементарні ДНК, проведено їх ампліфікацію і клонування.

Дослідженнями встановлено, що крім основного, виявленого раніше варіанту 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2, у мишей було виявлено унікальні альтернативні сплайс-варіанти з делеціями або з делеціями та вставками в різних ділянках мРНК, причому як 6-фосфофрукто-2-кіназній частині, так і у фруктозо-2,6-бісфосфатазній. Так, було ідентифіковано варіант 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2, в якому був відсутній 15-й екзон, що приводить до зміни послідовності C-кінцевої частини ензиму без змін каталітичних доменів фруктозо-2,6-бісфосфатази. Більше того, було виявлено альтернативний

сплайс-варіант 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2, у якому відсутній не лише 15-й екзон, а і 12-й та 13-й екзони. Внаслідок делеції цих трьох екзонів утворюється мРНК, що кодує ізоензим без «К» домену фруктозо-2,6-бісфосфатази. Серед альтернативних сплайс-варіантів мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 мишей були виявлені ізоформи без 8-го або без 13-го екзонів. Делеція 13-го екзону вкорочує С-кінцеву ділянку ензиму без змін у каталітичних доменах. У той же час, делеція 8-го екзону призводить не лише до втрати двох каталітичних доменів 6-фосфофрукто-2-кінази, але і до передчасної термінації трансляції. Разом з тим, такий альтернативний сплайс-варіант 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 має послідовність для кодування фруктозо-2,6-бісфосфатази. Один із виявлених сплайс-варіантів був сильно редукований: в ньому відсутня послідовність з 4-го по 14-й екзон, а інший був суттєво більшим за основну ізоформу 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 миші. Останній має делеції 8-го і частини 9-го екзонів, але дві вставки: після 2-го екзону (10 нуклеотидних залишків) та після 14-го екзону (593 нуклеотидних залишки), які генерують передчасні стоп-кодони, внаслідок чого цей альтернативний сплайс-варіант 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 має послідовність для кодування синтезу лише вкороченої з С-кінця фруктозо-2,6-бісфосфатази.

ЗМІНА РІВНЯ МЕТИЛУВАННЯ ЕВКАРІОТНОГО ФАКТОРА ЕЛОНГАЦІЇ 1А (eEF1A) В РАКОВИХ ПУХЛИНАХ

¹ЛУКАШ Т. О., ²ДЕБСКИ Я.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

²Інститут біохімії і біофізики, Академія наук Польщі, Варшава;
e-mail: t.lukash@gmail.com

eEF1A є одним із основних компонентів, що забезпечують процесивність трансляції в еукаріотній клітині. Останнім часом стрімко зростає кількість даних про участь eEF1A у нетрансляційних процесах, як, наприклад, апоптоз або взаємодія із цитоскелетом. Відомо також, що різні форми eEF1A пов'язані з онкогенезом, але залишається незрозумілим, що саме робить цей протеїн онкогенним. Ми вважаємо, що зміна статусу eEF1A під час пухлиногенезу може бути пов'язана зі зміною його посттрансляційних модифікацій. Для перевірки цієї гіпотези було проаналізовано посттрансляційні модифікації eEF1A карциносаркоми Walker W-256, очищеного за допомогою мас-спектрометричного аналізу (ESI-MS).

eEF1A складається з 462 амінокислотних залишків, з них відомо 11 модифікованих: N-триметиллізини (ТМЛ) в положеннях 36, 79 і 318, N-диметиллізини (ДМЛ) в положеннях 55 і 165, L-глутаміл-5-гліцерилфосфорилетаноламіни (GPE) в положеннях 301, 374 і фосфотирозини у 29, 86, 141, 162 положеннях амінокислотної послідовності. Внаслідок проведеного нами мас-спектрометричного аналізу eEF1A було вперше виявлено відмінності в метилуванні eEF1A. ТМЛ, ДМЛ та N-монометиллізин (ММЛ) було виявлено одночасно в положенні 79, замість ТМЛ у нормі; ДМЛ та ММЛ в положенні 169, замість ДМЛ у нормі; ТМЛ та ММЛ в положенні

439, у нормі даний залишок взагалі не має метилування. Можливим поясненням таких змін може бути або дефект системи метилування в ракових клітинах, або активація деметилази, що є особливо інтригуючим у світлі появи роботи про взаємодію лізинової деметилази (LSD1) з негістоновими протеїнами (Huang et al., 2007). Біологічне значення оборотного метилування негістонових протеїнів у пухлинах залишається невідомим. Недометилування/деметилування Lys-79 і Lys-165, що розташовані в ГТФ-зв'язувальному домені, може впливати на активність eEF1A в трансляції. Lys-439 розташований в N-кінцевій неструктурованій частині молекули eEF1A, що, як вважається, відповідає за взаємодію з нетрансляційними протеїнами-партнерами, такими як актин і кальмодулін. Метилування Lys-439 в ракових клітинах може слугувати стеричною перешкодою для характерних для нормальних клітин цитоплазматичних взаємодій eEF1A, в тому числі із сигнальними макромолекулами.

Дослідження виконувалися частково за рахунок коштів проекту Ф28/276 – 2009 і Програм співробітництва між НАНУ і CNRS.

**ОТЩЕПЛЕНИЕ FpA ОТ МОЛЕКУЛЫ
ФИБРИНОГЕНА ВЫЗЫВАЕТ ЭКСПОНИРОВАНИЕ
ФИБРИНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ НЕОАНТИГЕННОЙ
ДЕТЕРМИНАНТЫ В 121–138-ом УЧАСТКЕ Вβ-ЦЕПИ
дезА-ФИБРИНА**

*МАКОГОНЕНКО Е. М., УРВАНТ Л. П., ФИЛЬЧАК О. С.,
ЛУГОВСКОЙ Э. В., КОМИСАРЕНКО С. В.*

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: makogonenko@biochem.kiev.ua*

Молекула фибриногена (Fg) представляет собой мультидоменный протеин со многими внутримолекулярными междоменными взаимодействиями, наиболее важным из которых является взаимодействие αC-домена Aα-цепи с N-концевыми фрагментами Aα- и Вβ-цепей молекулы. Отщепление фибринопептидов от Fg тромбином ведет к экспозиции центров полимеризации фибрина А и В, диссоциации αC-доменов от центрального E-региона молекулы и экспозиции неоантигенной детерминанты фибринспецифических монАТ I-3с, локализованной в 121–138-ом участке Вβ-цепи молекулы (Lugovskoy E. V. et al., 2009). Предполагалось, что неоантигенная детерминанта в 121–138-ом участке Вβ-цепи закрыта αC-доменом и открывается после отхождения последнего от E-региона. Проверка этого предположения показала, что появление неоантигенной детерминанты совпадает во времени с началом отщепления от Fg FpA тромбином и имеет место в мономерном дезА-фибрине до начала образования протофибрилл. Расщепление Fg плазмином не приводит к экспозиции эпитопа фибринспецифических монАТ I-3с ни на одном из промежуточных фрагментов гидролиза, включая X₁-, X₂- и У-фрагменты. В то же время активация X₂-фрагмента тромбином вызывает экспозицию эпитопа в 121–138-ом участке Вβ-цепи молекулы. Интенсивность флуоресценции триптофанов в X₂-фрагменте, активируемом тромбином, не возрастает, и незначительно

уменьшается в присутствии монАТ I-3с. Полученные результаты указывают на то, что экспозиция эпитопа фибринспецифических монАТ I-3с не вызвана удалением α C-домена фибриногена, а, вероятно, является результатом более сложной внутримолекулярной перестройки, инициируемой отщеплением фибринопептида А и затрагивающей воронкоподобный и суперспирализованный домены Е-региона молекулы дезА-фибрина.

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ ТА ІШЕМІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ ГЕКСОКІНАЗ ТА ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГІДРОГЕНАЗИ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ

¹МАРУНИЧ Р. Ю., ¹МІНЧЕНКО Д. О., ¹МИХАЛЬЧЕНКО В. Г.,
²МОНЕ М., ¹МІНЧЕНКО О. Г.

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
²INSERM U920 Лабораторія молекулярних механізмів
ангіогенезу, Університет Бордо 1, Таленс, Франція;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Гіпоксія є однією із характерних рис злоякісних пухлин, вона значною мірою визначає інтенсивність їхнього росту. У злоякісних пухлинах і зокрема гліомах, значно змінюється транспортування та метаболізм глюкози. При цьому значно посилюються процеси гліколізу, що контролюються головним чином родиною ензимів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази, яка також контролює активність і гексокінази шляхом утворення комплексу між ензимами. І якщо експресія та механізми регуляції 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази у клітинах злоякісних пухлин достатньо добре вивчені, то експресія та механізми регуляції гексокіназ ще недостатньо з'ясовані. Разом з тим, відомо, що в умовах гіпоксії, коли має місце не лише дефіцит кисню, а і АТР, у клітинах активується адаптивна реакція для виживання клітин, що представляє собою комплекс внутрішньоклітинних сигнальних подій на порушення згортання протеїнів та накопичення їх в ендоплазматичному ретикулумі, які сприймаються низкою сенсорних сигнальних систем, найважливішою із яких є сигнальний ензим ендоплазматичний ретикулум-ядро-1, трансмембранний протеїн, N-кінцева сенсорна частина якого знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму. Мета цього дослідження полягає у вивченні експресії мРНК гексокінази-1 і гексокінази-2 та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у клітинах гліоми лінії U87 в умовах гіпоксії та ішемії (за дефіциту глюкози або глютаміну), а також залежності експресії цих генів від функції гена, що кодує синтез сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум-ядро-1. Експресію мРНК гексокінази-1 і гексокінази-2 та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у клітинах гліоми досліджували методом кількісної полімеразної реакції комплементарних ДНК, одержаних методом зворотної транскрипції РНК.

Внаслідок проведених досліджень було встановлено, що рівень експресії мРНК гексокінази-1 у клітинах гліоми посилюється в умовах гіпоксії та під час вирощування клітин у середовищі без глюкози. Крім того, рівень експресії мРНК гексокінази-1 у цих клітинах у разі вирощування їх у середовищі без глютаміну суттєво не

змінюється. Було показано, що виключення гена, який кодує синтез сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум-ядро-1, у клітинах гліоми істотно не змінює рівень експресії гена гексокінази-1, але знімає залежність експресії цього гена від гіпоксії і знижує ефект дефіциту глюкози в середовищі вирощування клітин на рівень експресії даного гена.

В той самий час, виявлено суттєві відмінності в експресії гена гексокінази-2, порівняно з геном гексокінази-1, в умовах гіпоксії та у разі вирощування клітин у середовищі без глюкози або без глутаміну. Так, в умовах гіпоксії рівень експресії гена гексокінази-2 у клітинах гліоми збільшується в шість разів більше, порівняно з геном гексокінази-1, а в середовищі без глюкози – в два рази більше. Крім того, рівень експресії гена гексокінази-2 збільшується також і за вирощування клітин гліоми в середовищі без глутаміну. Виключення гена, який кодує синтез сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум-ядро-1, у клітинах гліоми посилює рівень експресії гена гексокінази-2, але знімає залежність експресії цього гена від дефіциту глюкози та глутаміну в середовищі вирощування клітин та знижує ефект гіпоксії на рівень експресії даного гена. Експресія гена глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у клітинах гліоми посилюється у разі виключення гена ензиму ендоплазматичний ретикулум-ядро-1, істотно активується в умовах гіпоксії і дефіциту глутаміну. Таким чином, рівень експресії генів гексокінази-1, гексокінази-2 та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у клітинах гліоми істотно змінюється в умовах гіпоксії і ішемії та залежить від функції гена сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум-ядро-1.

РЕЛАКСАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАКРОМОЛЕКУЛ В СИСТЕМАХ ПОЛИСАХАРИДОВ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

МИКУЛИЧ Д. В., РУСНАК Е. М.

*Одесский филиал Института биологии южных морей
им. А. А. Ковалевского НАН Украины;
e-mail: obibss@paco.net*

Студнеобразование в системах полимеров обусловлено молекулярным движением, сопровождаемым релаксационными процессами, определяющими характер и состояние системы.

Цель работы – изучение релаксационного поведения макромолекул полисахаридов красных водорослей в водных и сахарно-водных системах для оценки возможности формирования однородных студней полисахаридами этих водорослей. Водные и сахарно-водные растворы полисахаридов фуцеллярии *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. и филлофоры *Phyllophora truncata* (Pall.) Newroth et Taylor f. *angustissima*, содержащие 1,25% полисахарида и 70% сахара исследованы в интервале температур 20–100 °С. Измерения релаксационных характеристик полисахаридных цепей – времени спин–спиновой релаксации (T_2 , с) проведены на ЯМ-релаксометре по методике Карра–Парсела–Мейбума–Гиля на частоте 19,05 МГц. Полученные данные свидетельствуют о том, что существенное влияние на состояние системы оказывает температура: при ее снижении T_2 уменьшается для

всех исследуемых растворов полисахаридов. Наибольшие значения T_2 отмечаются в интервале температур плавления студней 80–100 °С. Относительно высокими величинами T_2 характеризуются системы и в интервале температур застудневания 30–50 °С. Эти данные свидетельствуют о том, что все исследуемые системы являются типично аморфными полимерными системами. Они менее «жесткие», чем например, студни агара, для которых в интервале исследуемых параметров регистрируется более короткое время T_2 , равное 9×10^{-3} с. Установлено, что включение в систему сахарозы обуславливает формирование более прочной структуры, о чем свидетельствует появление у 5% макромолекул полисахаридов относительно более короткого времени спин–спиновой релаксации, равного $6,7 \times 10^{-4}$ с. Совокупность полученных экспериментальных данных позволяет судить о том, что студни полисахарида филлофоры формируют менее организованную пространственную структуру, чем студни полисахарида фуруцеллярии. Менее аморфная структура отмечена для систем полисахаридов, содержащих сахарозу. Для всех исследуемых систем характерно резкое изменение их состояния, происходящее в интервале температур 50–60 °С – начала процесса студнеобразования.

ЛЕКТИНЫ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР: БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

МОЛОДЧЕНКОВА О. О., АДАМОВСКАЯ В. Г.,
ЦИСЕЛЬСКАЯ Л. Й., САГАЙДАК Т. В.

*Селекционно-генетический институт—Национальный центр
семеноведения и сортоизучения НААН Украины, Одесса;
e-mail: olgamolod@ukr.net*

Лектины относятся к группе протеинов, характерной особенностью которых является способность специфически и обратимо связывать углеводные лиганды. Различия в структуре и углеводной специфичности лектинов предполагают различия их функциональной нагрузки. Одной из возможных функций лектинов является защита от фитопатогенов и абиотических стрессоров. Целью данного исследования было выделение и изучение биохимических свойств лектинов клеточных стенок, выделенных из инфицированных возбудителями фузариозной инфекции и обработанных индуктором устойчивости – салициловой кислотой (СК) – проростков зерновых культур.

Лектины были выделены из проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Застава од.), ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Вакула) и кукурузы (*Zea mays* L., линия ГК 26 ЗМ). Источником инфекции служили сильнопатогенные штаммы *Fusarium graminearum* (для пшеницы), *Fusarium culmorum* (для ячменя) и *Fusarium moniliforme* (для кукурузы). В исследованиях использовали 2 мМ раствор СК.

Результаты изучения динамики изменения лектиновой активности и углеводной специфичности лектинов клеточных стенок проростков зерновых культур при заражении возбудителями фузариоза и действии СК в процессе прорастания позволили сделать вывод о неодинаковой чувствительности лектинов к действию этих факторов у различных по устойчивости к фузариозу генотипов. В основе диф-

ференцированной отзывчивости различных по устойчивости генотипов зерновых культур на действие фузариозной инфекции и СК, лежат, по нашему предположению, как родовые, так и генотипные отличия в специфике накопления и перераспределения лектинов.

Методами гель-фильтрации, аффинной хроматографии и изоэлектрофокусирования выделены и очищены лектины клеточных стенок из проростков зерновых культур, инфицированных возбудителями фузариоза и обработанных СК, определена их молекулярная масса (27 кДа), изучена углеводная специфичность. Выход лектинов из инфицированных проростков зерновых культур составил 33,6% с коэффициентом очистки 191,28; из растений, выращенных на растворе СК, составил 35,61% с коэффициентом очистки 221,9. По результатам изофокусирования были идентифицированы изоформы лектинов с изоэлектрическими точками в зонах с рН 5,25–6,85; 7,22–7,74; 8,16–8,70; 9,57–9,74. Аминокислотный анализ выделенных лектинов позволил выявить в их составе большое количество остатков аспарагиновой, глутаминовой кислот, лейцина и низкое содержание треонина, аланина и фенилаланина. Реакция с реактивом Элмана показала отсутствие в протеинах свободных SH-групп. Показано, что выделенные лектины в концентрации 50 мкг/мл при внесении в среду выращивания колоний грибов *Fusarium*, подавляли рост и развитие патогенов (диаметр колоний гриба *F. graminearum* уменьшался относительно контроля в 1,4 раза, диаметр колоний гриба *F. culmorum* – в 1,85 раза, а диаметр колоний гриба *F. moniliforme* в 1,25 раза). Обнаруженная ингибирующая активность выделенных лектинов против фузариозных грибов открывает перспективы для использования его в молекулярно-селекционных программах повышения устойчивости зерновых культур к фузариозу, а уровень изменения лектиновой активности в инфицированных и обработанных СК растениях может быть одним из биохимических критериев для оценки устойчивости растений к данному патогену.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-2 НОРМАЛЬНОЙ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

МОТРУК Н. В., ВОВЧУК И. Л.

*Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: ntv1@ukr.net*

Матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2 – КФ 3.4.24.24) – Zn^{2+} -зависимая эндопептидаза, обеспечивающая деградацию различных компонентов межклеточного матрикса. В предыдущих исследованиях нами установлено повышение активности ММП-2 в ткани опухолей молочной железы, которое может быть объяснено либо увеличением биосинтеза, либо изменением физико-химических и биохимических свойств энзима.

Методом высаливания и гель-хроматографии на сефадексе G-75 были получены препараты ММП-2 из немалигнизированной (НМЖ) и опухолевой ткани молочной железы (ЗОМЖ). Определение активности энзима проводили по гидролизу желатинины (по методу Вовчук).

Установлено, що оптимальним значенням рН для ММП-2 як НМЖ, так і ткани ЗОМЖ являється 7,4. Зависимість активності ММП-2 від температури описується характерною колоколообразною кривою з оптимумом дії при 37 °С.

ММП-2 із НМЖ і ЗОМЖ являється типовою желатиназою, найбільш інтенсивно розщеплює денатуриований колаген – желатину, а також дипептиди, що містять неполярні гідрофобні амінокислоти. Підсилення процесу малигнації супроводжується зниженням K_m ензиму, виділеного з ткани ЗОМЖ з 0,0298 до 0,0061 мМ, що свідчить про підвищення сродства ММП-2 до субстрату – желатини.

При оптимальному значенні рН більш сильне зниження активності ензиму НМЖ відбувається в присутності іонів Ba^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} і Hg^{2+} . Активність ензиму ЗОМЖ гальмується іонами Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} і Cd^{2+} , а іони Pb^{2+} і Zn^{2+} підвищують активність.

Активність ММП-2 як НМЖ, так і ЗОМЖ гальмується лейпептином, що може свідчити про наявність SH-груп цистеїну в структурі активного центру. Зростаючі концентрації хелатних реагентів ЕДТА і 1,10-фенантроліна знижують активність ММП-2 обох тканин, що підтверджує необхідність присутності іонів Zn^{2+} для проявлення активності ензимів. Фотоокислення гістидина метиленовим синім призводить до пригнічення ензиматичної активності, більш вираженого для ензиму НМЖ, що передбачає необхідність цієї амінокислоти для проявлення каталітичної активності ММП-2.

ІЗОФОРМИ eEF1A: ПОШУК ПІДГРУНТЯ ДЛЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ВІДМІННОСТІ

¹НОВОСИЛЬНА О. В., ²ТИМЧЕНКО О. О., ²СЕРДЮК І. М.,
¹НЕГРУЦЬКИЙ Б. С.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
²Інститут білка РАН, Пушино, Російська Федерація;
e-mail: aleksnova@yahoo.com

У вищих еукаріотів існує дві тканинспецифічні ізоформи фактора елонгації трансляції 1A (eEF1A), A1 і A2 гомологічні на 98%. Не зважаючи на високу схожість амінокислотних послідовностей, ці протеїни мають істотні функціональні відмінності. Власне, пошук підґрунтя для функціональної відмінності цих протеїнів і є метою цього дослідження.

На основі експериментальних кривих розсіяння рентгенівських променів в області малих кутів вперше були побудовані тривимірні структури ізоформ A1 і A2. Ми знайшли, що на відміну від компактною ізоформи A2, A1 має частково розгорнуту просторову конформацію, що підтвердило наші попередні мікрокалориметричні дані. До того ж, флуоресцентною спектроскопією виявлено, що A1 є значно гідрофобнішим протеїном ніж A2, що може зумовлюватись експонуванням гідрофобних залишків у розгорнутій структурі A1.

Крім того, наші дані свідчать про Ca^{2+} -залежну кальмодулін(CaM)-зв'язуючу здатність A1 та повну відсутність такої властивості у A2. Показано, що CaM, хоча

й не впливає ні на зв'язування нуклеотиду, а ні на швидкість нуклеотидного обміну, проте конкурує з тРНК за місце зв'язування на молекулі А1. Таким чином, не можна виключити, що взаємодія із СаМ має інгібуючий вплив на трансляційну функцію А1.

З іншого боку, фізіологічні функції нейронів і міоцитів, де функціонує тільки А2 ізоформа, пов'язані з постійною зміною внутрішньоклітинної концентрації іонів Са²⁺. Тобто, відсутність Са²⁺-залежної СаМ-зв'язуючої здатності у ізоформи А2 може бути необхідною для збереження відносно рівномірної швидкості елонгації поліпептидних ланцюгів у нервових та м'язових клітинах.

Отже, незначна відмінність первинних послідовностей ізоформ еЕF1А призводить до різної конформації та поверхневої гідрофобності цих протеїнів, що, в свою чергу, може детермінувати різний функціональний статус А1 та А2. Ми припускаємо, що саме ці ознаки можуть визначати виключну здатність А1 взаємодіяти з СаМ.

Дослідження виконувалися частково за рахунок коштів проекту Ф28/276 – 2009 і Програм співробітництва між НАНУ і CNRS.

АТР-азна АКТИВНІСТЬ СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ МІОФІБРИЛИ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ПІД ВПЛИВОМ УЛЬТРАЗВУКУ

ПЕЛЮХ Л. І., НУРИЩЕНКО Н. Є.

*НДІ фізіології імені академіка Петра Богача Київського національного
університету імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: pelyukhl@univ.kiev.ua*

Відомо, що ультразвук (УЗ) впливає на низку біохімічних реакцій та біофізичних процесів в організмі. При цьому дія ультразвуку є причиною збільшення внутрішньоклітинного Са²⁺, який клітини використовують як кофактор у регуляції активності ензимів. Однак, дані літератури про вплив УЗ на АТР-азну активність протеїнів скоротливого апарату практично відсутні.

Тому метою нашої роботи було дослідити вплив УЗ терапевтичного діапазону на АТР-азну активність скоротливих протеїнів скелетного м'яза.

Озвучення регуляторних та скоротливих протеїнів проводили за допомогою терапевтичного апарата УЗТ 33.04 С, що генерує ультразвуковий сигнал з частотою 0,88 МГц. Інтенсивність УЗ змінювалась в межах діапазону 0,05–1 Вт/см².

Показано, що найбільший вплив на Mg²⁺-АТР-азну активність у присутності 100 μМ Са²⁺ на Са²⁺-чутливий актоміозин має УЗ із інтенсивністю 0,2 та 0,4 Вт/см², при цьому АТР-азна активність підвищується відповідно на 59, 40% відносно контролю. К⁺-АТР-азна активність актоміозину зменшується у всіх варіантах озвучення відносно контролю відповідно до збільшення ультразвукового сигналу. УЗ не впливає на АТР-азну активність Са²⁺-нечутливого актоміозину.

За озвучення міозину скелетних м'язів кроля Са²⁺-АТР-азна активність інгібувались, в той час як К⁺-АТР-азна активність у присутності хелатора іонів Са²⁺-ЕГТА не змінюється.

У разі використання озвученого тропонінового комплексу відбувається збільшення Mg^{2+} -АТР-азної активності реконструйованої міофібрили відносно до контролю. Особливо істотно збільшується Mg^{2+} -АТР-азна активність за дії неперервного УЗ з інтенсивністю 0,2 та 0,4 Вт/см². K^{+} -АТР-азна активність, як і у разі озвучення нативного актоміозину інгібувались.

Таким чином, одержані результати свідчать про Ca^{2+} -залежний характер впливу ультразвуку, а також про здатність ультразвуку впливати як на тропоніновий комплекс, так і безпосередньо на молекулу міозину у складі актоміозинового комплексу.

ЕФЕКТ СТИБКОПОДІБНОЇ ЗМІНИ КОНФОРМАЦІЇ АЛЬБУМІНУ В РАЗІ ЗБІЛЬШЕННЯ ЙОГО КОНЦЕНТРАЦІЇ У РОЗЧИНІ

*ПЕРШКО Н. Ю., ЛЕВЧЕНКО О. Є., ПЕЛЄВІН С. В.,
СТЕБЛЯНКО Т. Й., МЕЛЬНИК В. О., СИДОРЕНКО М. В.*

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
відділення біотехнічних проблем діагностики, Київ;
e-mail: natalipershko@gmail.com*

У ході цієї роботи ми мали на меті встановити, чи зазнає альбумін конформаційних змін у разі збільшення його концентрації у розчині.

Об'єктом дослідження служили мазки з розчинів ліофілізованого альбуміну людини (Sigma) у фізіологічному розчині (0,9%-й NaCl) із концентраціями від 20 до 100 г/л. Зразок кожного з розчинів наносили на поверхню предметного скла і рівномірно розподіляли по ній. Після висушування при температурі 35–37 °С на предметному склі утворюється тонка плівка альбуміну.

Далі досліджували спектри поглинання одержаних плівок у діапазоні 1700–1600 см⁻¹. Паралельно в цих самих розчинах визначали вміст SH-груп. Внаслідок роботи встановлено наявність позитивної кореляції між концентрацією альбуміну в досліджуваному діапазоні та площею під графіком модуля другої похідної спектра поглинання в діапазоні 1700–1600 см⁻¹. Коефіцієнт кореляції дорівнює 0,997. Аналогічну кореляцію виявлено між концентрацією альбуміну та вмістом SH-груп.

Виявлена закономірність різко порушується (відбувається стрибкоподібне зменшення одночасно як спектрального показника, так і вмісту SH-груп) у разі збільшення концентрації альбуміну в розчині вище певної величини, яка збігається з верхньою межею нормальних значень, властивих сироватці крові людини.

Одержані результати дають підстави вважати, що у разі збільшення концентрації альбуміну має місце стрибкоподібна просторова зміна його макромолекул за участю SH-груп, яка відображається в інфрачервоному спектрі поглинання в діапазоні 1700–1600 см⁻¹.

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА
У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССОВ
ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ И ПТИЦ**

ПЕХИМЕНКО Г. В.

*Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского,
Симферополь, Украина;
e-mail: gvpekhimenko@mail.ru*

С помощью физико-химических методов исследования: аналитического электрофореза в полиакриламидном геле, денситометрии, гель-фильтрации и др. изучены некоторые внутримолекулярные особенности альбуминовых фракций сыворотки крови у представителей классов пресмыкающихся и птиц (по четыре вида от каждого класса).

Показано, что молекулярные массы сывороточного альбумина у представителей класса птиц варьируют от 62 400 до 65 250, а у пресмыкающихся от 60 130 до 61 080 Да. В целом молекулярная масса сывороточного альбумина представителей класса птиц достоверно выше ($P < 0,05$). Данный показатель снижается у птиц в ряду: курица → гусь → голубь → утка, у пресмыкающихся в ряду: уж водяной → черепаха → полоз → уж обыкновенный. Методом диск-электрофореза установлено, что количество протеиновых фракций сыворотки у исследуемых животных различно, при этом внутри классов оно относительно стабильно (15–17 – у птиц; 9–10 – у пресмыкающихся).

Установлено, что коэффициент электрофоретической подвижности (Кэф) альбуминовой фракции исследуемых видов внутри классов приблизительно стабилен. Разброс значений внутри каждого класса составляет не более 0,02 единицы (0,75–0,77 у птиц; 0,69–0,71 у пресмыкающихся). В ряду видов птицы – пресмыкающиеся наблюдается уменьшение (Кэф) сывороточного альбумина. Причем, у представителей класса пресмыкающихся его содержание достоверно ниже, чем у представителей класса птиц ($P < 0,05$).

Близкие значения Кэф у сывороточных альбуминов исследуемых видов внутри классов, вероятнее всего, отражают близость их суммарных поверхностных зарядов, а достоверное различие Кэф между классами указывает на различные поверхностные заряды и молекулярный вес исследуемых протеинов. При определении протеинового спектра сыворотки крови исследуемых видов класса птиц и пресмыкающихся наблюдается определенная стабильность внутри классов, что может быть одним из показателей, характеризующих данный класс животных.

Таким образом, содержание альбумина в сыворотке крови животных, принадлежащих к разным классам, достоверно различается ($P < 0,05$). В целом содержание альбумина в сыворотке крови представителей класса птиц достоверно выше аналогичного показателя у представителей класса пресмыкающихся. Внутри исследуемых классов также наблюдаются некоторые различия в данных показателях, однако они незначительны (птицы: 42,3–48,2% от общего количества протеина сыворотки, пресмыкающиеся: 36,6–38,9%), поэтому внутри классов данный показатель можно считать относительно стабильным.

**СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ І ВЛАСТИВОСТІ
ПОЗАКЛІТИННОГО ЛЕКТИНУ ШТАМУ
B. subtilis IMB B-7014**

¹ПІДГОРСЬКИЙ В. С., ¹КОВАЛЕНКО Е. О., ²КАРПОВА І. С.,
¹САЩУК О. В., ¹ГЕТЬМАН К. І.

¹Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: kovalenko@serv.imv.kiev.ua

На сьогодні велика увага вчених приділяється вивченню вуглеводзв'язувальних речовин – лектинів, які присутні в будь-якій живій системі і яким притаманна різноманітна медико-біологічна активність. Серед лектинів будь-якого походження найменш дослідженими є лектини сапрофітних мікроорганізмів. Встановлено, що лектини деяких сапрофітних штамів бацил виявляють виражені антивірусні, протипухлинні та імуномодулюючі властивості за відсутності токсичних та алергічних ефектів. Невизначеними залишаються їхні структурні характеристики.

Мета роботи: визначення структурних особливостей, фізико-хімічних і біологічних властивостей позаклітинного сіалоспецифічного лектину сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014 (штам B-7014). Вирішення цієї проблеми є необхідним для створення лікарських засобів спрямованої дії та біорегуляторів із широким спектром активності.

Експерименти проведено за допомогою методу автофокусування без застосування комерційних амфолітів. У кожній фракції досліджували гемаглютинуючу (лектинову) активність із використанням еритроцитів кроля та барана. Загальну кількість протеїну у фракціях визначали спектрофотометричним методом. Вуглеводну специфічність виявляли в реакції пригнічення гемаглютинації. Електрофоретичне розділення субстанції лектину проводили в системі SDS–ПААГ за методом Laemmli.

Встановлено, що досліджуваний лектин являє собою комплекс двох ізоформ (кислої та лужної), які відрізняються між собою за фізико-хімічними та біологічними характеристиками, а саме: напрямком руху в електричному полі, локалізацією відповідно до різних значень рІ, електрофоретичною рухливістю, рівнем активності, ступенем афінності до різних вуглеводів та спорідненістю до еритроцитів тварин різної видової належності. Характерною рисою для всіх ізоформ лектину є наявність молекулярної одиниці з масою 50 кДа, саме якій притаманні лектинові властивості: високий рівень гемаглютинуючої активності та спорідненості до сіалових кислот і сіаловмісних глікокон'югатів.

ЕКСПРЕСІЯ АЛЬТЕРНАТИВНИХ СПЛАЙС-ВАРІАНТІВ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ-2 У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

*РАТУШНА О. О., ЛИПОВА Н. М., МІНЧЕНКО Д. О.,
БОЖКО І. В., МИХАЛЬЧЕНКО В. Г., МІНЧЕНКО О. Г.*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ominchenko@yahoo.com*

Біфункціональний ензим 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза (PFKFB) є одним із ключових ензимів регуляції метаболізму глюкози, оскільки вона контролює не лише гліколіз та глюконеогенез, але значною мірою і перший етап метаболізму глюкози – її фосфорилування шляхом утворення комплексу з глюкострофиліном. Цей ензим бере участь у регуляції різних сторін метаболізму глюкози як у нормі, так і при різних формах патології, в тому числі у злоякісних пухлинах та при цукровому діабеті, а активність та експресія контролюється численними факторами, в тому числі і низкою гормонів. PFKFB – це родина біфункціональних ізоензимів, які виконують одну і ту саму функцію – синтезу та розщеплення фруктозо-2,6-бісфосфату, мають дуже близькі за структурою каталітичні центри для 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази, але різні регуляторні ділянки, що забезпечує тканинноспецифічний характер перебігу та регуляції гліколізу. Синтез різних ізоформ PFKFB кодується чотирма різними генами, причому про-мРНК кожного із них має по декілька альтернативних сплайс-варіантів, які відіграють важливу роль у механізмах регуляції метаболізму глюкози та гліколізу, зокрема. Посилена експресія PFKFB та її активація в умовах гіпоксії чи у злоякісних пухлинах приводить до збільшення рівня фруктозо-2,6-бісфосфату та активації гліколітичного розщеплення глюкози, а при цукровому діабеті має місце пригнічення активності PFKFB, що було показано для PFKFB-1 печінки.

Метою роботи було дослідження експресії різних ізоформ мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 у нирках та легнях щурів при експериментальному цукровому діабеті, оскільки у цих органах PFKFB-2 відіграє важливу роль у регуляції гліколізу і експресується на високому рівні. Досліди проводили на щурах-самцях лінії Wistar, діабет спричинювали стрептозотоцином. Із легень та печінки виділяли РНК та досліджували експресію мРНК PFKFB-2 методом полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК, одержаних шляхом зворотної транскрипції.

Проведеними дослідженнями виявлена експресія двох ізоформ мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 з різною С-кінцевою частиною як у нормі, так і при експериментальному цукровому діабеті у нирках та легнях щурів, причому у тварин з цукровим діабетом виявлено зниження експресії цих двох ізоформ мРНК PFKFB-2 як у нирках, так і у легнях. Більше того, аналіз клонованих кДНК PFKFB-2 із нирок діабетичних щурів виявив чотири нових альтернативних сплайс-варіанти мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази, що мають різні вставки та делеції як у 6-фосфофрукто-2-кіназній частині, так і у фруктозо-2,6-бісфосфатазній частині молекули PFKFB-2. Три із цих альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 мають вставки чи делеції в

6-фосфофрукто-2-кіназній частині і є монофункціональними, оскільки не можуть кодувати синтез функціонально активної 6-фосфофрукто-2-кінази. Показано, що виявлені альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 експресуються як у нирках, так і у легенях щурів, і що експресія їх змінюється у тварин з експериментальним цукровим діабетом порівняно з контрольними щурами. Результати нашої роботи свідчать про суттєві порушення експресії мРНК PFKFB-2 на рівні альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2 в нирках та легенях при цукровому діабеті, що може бути доказом складності механізмів регуляції метаболізму глюкози і гліколізу, зокрема, і одним із численних факторів їхнього порушення при цьому досить поширеному захворюванні.

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТКАНЕЙ И СЛИЗИ НАЗЕМНЫХ МОЛЛЮСКОВ *Helix albestins* И *Eobania vermiculata*

РЕЗНИК Е. П.

Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского,
Симферополь, Украина;
e-mail: elizabet.reznik@gmail.com

Целью исследований явилось определение количественного содержания протеинов в тканях и слизи наземных моллюсков *Helix albestins* R. и *Eobania vermiculata* M. В качестве первого этапа исследований была проведена сравнительная оценка содержания протеинов в слизи исследуемых моллюсков, а также влияние на их содержание первичной технологической обработки. Кроме этого, изучали электрофоретический состав протеинов мышечной ткани и печени исследуемых видов.

Содержание протеинов в слизи моллюсков определяли микробиуретовым методом и методом Лоури. Разделение протеина по отношению к потенциальным денатурирующим агентам проводилось путем высаливания сульфатом аммония. Исследовали 30 особей *Helix albestins* и 30 особей *Eobania vermiculata*. Фракционный состав протеинов мышц и печени улиток изучали методом гель-электрофореза. В ходе экспериментов было получено около 60 электрофореграмм протеинов мышц и печени, извлеченных у 20 особей. Рассчитывали стандартные среднестатистические электрофоретические спектры (ЭФ-спектры).

В результате исследований получили следующие данные. Содержание протеина в цельной слизи *Helix albestins* и *Eobania vermiculata* не демонстрирует статистически достоверных различий и не претерпевает значимых изменений при фильтрации. Устойчивость слизи *Eobania vermiculata* к осаждению сульфатом аммония ниже, чем для *Helix albestins*. Снижение концентрации составляет 15,2 и 46,6% соответственно.

В ходе исследования электрофоретического состава протеинов мышц и печени наземных моллюсков выявлены некоторые особенности, которые проявляются в различном распределении протеиновых фракций в ЭФ-спектрах, разной гетерогенности протеиновых зон, а также большим количеством фракций и большей электрофоретической подвижностью мышечных протеинов улиток.

Таким образом, полученные данные по содержанию протеина в слизи *Helix albestins* и *Eobania vermiculata* позволят дать рекомендации по совершенствованию методов получения и переработки нативной слизи в фармацевтических целях. При изучении особенностей электрофоретического состава протеинов мышц и печени наземных моллюсков выявлены различия, которые могут быть использованы для оценки физиолого-биохимического состояния моллюсков.

НОВІ РЕГУЛЯТОРНІ ЕЛЕМЕНТИ У ПРОМОТОРНІЙ ДІЛЯНЦІ ГЕНА *MGMT* МИШІ

¹САМОЙЛЕНКО І. О., ²ЯЦИШИНА А. П., ²ПІДПАЛА О. В.,
²ВАГІНА І. М., ²ЛУКАШ Л. Л.

¹Національний педагогічний університет ім. М. П. Драгоманова, Київ, Україна;

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

e-mail: hi_frehs@gala.net

Репаративний фермент O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (*MGMT*) захищає клітину від токсичної та мутагенної дії алкілувальних сполук, видаляючи алкільні групи з O⁶-позиції гуаніну в ДНК. Ген *MGMT* експресується в усіх клітинах, однак рівень його експресії варіює залежно від типу клітин та їхніх ростових характеристик.

Про організацію промотора гена *Mgmt* миші відомо лише те, що він не має типових TATA і CCAAT блоків, збагачений на гуанін і цитозин, а також містить функціональні сайти Sp1, Ap1, E2F і URS-подібний сайт дріжджів. Тому метою даної роботи був аналіз промоторних ділянок досліджуваного гена на наявність потенційних цис-регуляторних елементів.

Об'єктом дослідження були одержані у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України нові клітинні лінії G1 (24, 104 п.), G4 (25 п.), G6 (25 п.) і G7 (20 п.), клітинну лінію 3T3, а також клітини 12,5-денних ембріонів миші лінії BALB/c. У роботі наведено результати аналізу ділянки промотора 77428 із бази даних TRED. Функціональні сайти визначали за допомогою програми TFSEARCH, мобільні генетичні елементи – SENSOR. Ампліфіковані ділянки очищали, секвенували та аналізували їхні нуклеотидні послідовності, використовуючи програми BLASTN, Chromas і DNASTar5.

У відомому промоторі 77428 за допомогою *in silico* аналізу виявили 28 потенційних сайтів для 13 нових індукційних і тканиноспецифічних транскрипційних факторів, здатних забезпечувати відповідь клітини на різноманітні сигнали. У всіх досліджених зразках не виявили змін у розподілі потенційних сайтів зв'язування із транскрипційними факторами та мобільних генетичних елементів. Очевидно, це пов'язано із важливістю цих регуляторних послідовностей для регуляції експресії даного гена.

Таким чином, у межах промотора гена *Mgmt* миші (77428, база даних TRED) виявили потенційні регуляторні елементи, функціональна активність яких потребує експериментального підтвердження.

**DIVERSE PRESYNAPTIC MECHANISMS
UNDERLYING METHYL- β -CYCLODEXTRIN – MEDIATED
CHANGES IN GLUTAMATE TRANSPORT***SIVKO R. V., KRISANOVA N. V., BORISOVA T. A.**Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: tborisov@biochem.kiev.ua*

The effect of the cholesterol-depleting agent methyl- β -cyclodextrin (M β CD) on exocytotic, transporter-mediated, tonic release, the ambient level and uptake of L-[¹⁴C]glutamate was assessed in rat brain synaptosomes using different methodological approaches of M β CD application. The addition of 15 mM M β CD to synaptosomes (the acute treatment, AT) immediately resulted in the extraction of cholesterol and two times increase in the extracellular L-[¹⁴C]glutamate level. When 15 mM M β CD was applied to synaptosomes for 35 min followed by washing of the acceptor (the long-term pretreatment, LP), this level was only one-third higher than in the control. The opposite effects of M β CD on tonic L-[¹⁴C]glutamate release and glutamate transporter reversal were found in AT and LP. Tonic release was dramatically enlarged in AT, but decreased after LP. Transporter-mediated release was increased several times in AT, but attenuated in LP. Exocytotic release of L-[¹⁴C]glutamate was completely lost in AT, whereas after LP it was half decreased in comparison with the control. Na⁺-dependent L-[¹⁴C]glutamate uptake was decreased by ~60% in AT, whereas in LP, it was lowered by ~40% only. The presence of M β CD in the incubation media during AT caused dramatic dissipation of the proton gradient of synaptic vesicles that was shown with the pH-sensitive dye acridine orange, whereas after LP no statistically significant changes were registered in synaptic vesicle acidification. It was concluded that the diverse changes in glutamate transport in AT and LP were associated with the difference in the functional state of synaptic vesicles.

**РОТАМЕРНЫЕ ВАРИАНТЫ
КОНФИГУРАЦИИ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ
И ИХ КОДИРОВАНИЕ В ГЕНОМЕ***СОКОЛИК В. В.**ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины», Харьков;
e-mail: Sokolik67@rambler.ru*

Накопился ряд противоречий вследствие сведения понятия первичной структуры протеина всего лишь к «линейной последовательности аминокислотных остатков». Речь идет, прежде всего, о различной пространственной структуре протеинов со 100% гомологией аминокислотных последовательностей (например, основной актин и α -актин 1), что дискредитирует главное правило сопоставительного моделирования: «близкие аминокислотные последовательности упаковываются в близкие структуры». Также стоит упомянуть сформулированный С. Левинталем принцип закономерности специфического фолдинга протеина: «свернуться в нативную конформацию случайным образом протеин не может». И наконец, гипоте-

за Wobble неоднозначного спаривання кодон–антикодон для третього нуклеотида триплету при рибосомному синтезі протеїна. Припустили, що оскільки третій нуклеотид кодона не детермінує амінокислотний залишок в поліпептидній ланцюзі, то він кодує конфігурацію пептидної зв'язі (КПС) в композиції сусідніх амінокислотних залишків.

Були виділені три ротамерних варіанта КПС: R (right), 0 (ноль) і L (left). Установили, що повторення в протеїні R-КПС змушує його поліпептидну ланцюжок закручуватися в праву спіраль, повторення 0-КПС – в β-тяж, а повторення L-КПС – в ліву спіраль. Чередування R, 0 і L-КПС обумовлює неупорядкований ділянку поліпептидної ланцюжок або випетлювання між фрагментами з вторинною структурою. Відомо, що енергетичні бар'єри, що розділяють ротамери, не перевищують ~100 кДж/моль, тому час їх існування в індивідуальному стані становить ~10⁻⁵–10⁻¹³ с. Це, на перший погляд, робить бессмысленним детермінування в геномі визначеного ротамерного варіанта КПС, якщо не звернути увагу, що в складі поліпептида він додатково фіксований внутрімолекулярними водородними зв'язями.

Як же кодується структурний шаблон протеїна з послідовності пептидних зв'язей в строго дискретних ротамерних варіантах і як цей код реалізується? На основі емпіричної таблиці композиційного генетичного коду [Кушелев А. Ю., 2002] нами була складена таблиця генетичного коду просторової структури протеїна, в якій кожному кодону крім амінокислотного залишку поставлено в відповідності один з трьох ротамерних варіантів КПС (R, 0 або L). Таким чином, за нуклеотидної послідовності можна декодувати і побудувати індивідуальний структурний шаблон для будь-якого невідомого протеїна. Цей підхід хороший і для рішення зворотної задачі: моделювання нових протеїнів з заданими властивостями, які визначаються їх просторовою структурою.

МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНА ТІАМІНТРИФОСФАТАЗА У СКЛАДІ ТІАМІНЗВ'ЯЗУВАЛЬНОГО ПРОТЕЇНУ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ СИНАПСОМ

СТРОКІНА А. О., ПАРХОМЕНКО Ю. М.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: a_strokina@mail.ru*

Численні дослідження свідчать, що нервові клітини є найчутливішими серед інших до дефіциту вітаміну В1 (тіаміну), і порушення тіамінзалежних процесів у них є одним з важливих патогенетичних або обтяжуючих факторів деяких нейродегенеративних захворювань. Було розроблено гіпотезу, згідно з якою в нервовій клітині існує окремий пул тіаміну, представлений, в основному, його фосфатами, не зв'язаними з протеїнами, функціонування якого спряжене із функціонуванням збудливої мембрани. Вважається, що ключову роль у цьому процесі відіграє тіамінзв'язувальний протеїн (ТЗП), який складається з двох субодиниць (63 та 35 кДа). Раніше було встановлено локалізацію ТЗП у плазматичній мембрані синап-

тосом (ПМС) і його біфункціональність: поряд із здатністю специфічно зв'язувати тіамін, він вибірково гідролізує фосфорні ефіри тіаміну, найактивніше – тіамінтрифосфат (ThTP), що дає підстави розглядати цей протеїн як мембранну ThTP-азу. Окрім ТЗБ в літературі описано два різних ензими, що виявляють ThTP-азну активність: цитозольна та мембранозв'язана ThTP-аза. Метою даної роботи було за допомогою поліклональних антитіл, специфічних до цитозольної ThTP-ази дослідити можливу гомологію між цим протеїном та досліджуваною мембранозв'язаною ThTP-азою у складі тіамінзв'язувального протеїну ПМС.

Було досліджено вплив поліклональних антитіл, специфічних до цитозольної ThTP-ази на ThTP-азну активність ПМС. Виявлено, що обробка ПМС антитілами, специфічними до цитозольного ензиму з молекулярною масою близько 25 кДа, призводить до зниження ThTP-азної активності плазматичних мембран в середньому на 48% порівняно із контролем, що вказує на те, що протеїн із ПМС виявляє високу ступінь гомології з цитозольною ThTP-азою в первинній послідовності. Методом Вестерн-блот аналізу підтверджено, що мембранозв'язана ThTP-аза є гомологічною цитозольній ThTP-азі. Також показано, що серед протеїнів ПМС тільки один протеїн є гомологічним цитозольному ензиму, який є складовою частиною тіамінзв'язувального протеїну, ізольованого з ПМС, а саме його субодиницею з молекулярною масою 35 кДа. Тобто ТЗБ є єдиним носієм мембранозв'язаної ThTP-азної активності.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

ТАМАШЕВСКИЙ А. В.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск;
e-mail: tayzoe@mail.ru*

Цель работы – исследовать влияние модификации мембранных липидов на функциональную активность Р-гликопротеина (Р-гр) в лимфоцитах человека.

Функциональная активность Р-гр определялась методом остаточного удержания родамина 123 (Rho123, Sigma). В качестве ингибитора транспортной активности Р-гр использовали циклоспорин А (CsA, Fluka). Экспрессию Р-гр оценивали моноклональными антителами UIC2-PE (Immunotech). Филиппин и метил-β-циклодекстрин (m-β-cd, Sigma) были использованы в качестве агентов, модифицирующих липидный бислой.

Установлено, что процентное количество клеток, меченных UIC2-PE в суммарной популяции лимфоцитов доноров, составило в среднем 1,7–3,3%. После кратковременной обработки клеток додецилсульфатом натрия процент клеток, связавшихся с UIC2-PE, составил в среднем 9,1–12,3%. Это косвенно может свидетельствовать о возможной локализации Р-гр в липидных рафтах лимфоцитов. Показано, что выход Rho123 из лимфоцитов снижается в среднем на 20–30% по отношению к контролю после обработки клеток полиеновым антибиотиком фи-

липпином, который связывает мембранный холестерол и нарушает структуру липидных рафтов. Остаточное удержание Rho123 в лимфоцитах после экстракции мембранного холестерола, полученное после обработки клеток m- β -cd, составило в среднем 120–180% по отношению к контролю и превысило таковое на 50–55% после действия CsA. Средняя интенсивность флуоресценции Rho 123 в лимфоцитах, модифицированных филиппином и m- β -cd после обработки клеток CsA, составила 35–45% и 235–250%, соответственно, по отношению к контролю. Наличие аддитивного ингибирования транспортной активности P-gr в лимфоцитах после воздействия m- β -cd и Cs A может свидетельствовать о том, что эффекты по выбросу Rho 123 не связаны с переходом P-gr в супернатант после экстракции холестерола из этих клеток. Таким образом, функциональная активность P-gr в лимфоцитах человека, оцененная по остаточному удержанию Rho 123, связана с оптимальным содержанием и распределением холестерола в их мембранах, а также определяется целостностью структуры липидных рафтов в этих клетках.

ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ 2-5-ОЛІГОАДЕНІЛАТІВ ІЗ ПРОТЕЇНАМИ ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

*ТКАЧУК З. Ю., ДУБЕЙ Л. В., ТКАЧУК В. В., ТКАЧУК Л. В.,
ЛОСИЦЬКИЙ М. Ю., ЯЩУК В. М., ДУБЕЙ І. Я.*

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: ztkachuk@bigmir.net*

Метою роботи було дослідження можливості зв'язування 2-5-олігоаденілатів (2-5A) з протеїнами методом флуоресцентної спектроскопії. Для пояснення біологічної активності 2-5-олігоаденілатів ми припустили, що відбувається зв'язування їх із певними клітинними протеїнами. Виявити цю взаємодію можна за змінами у спектрах короткохвильової флуоресценції протеїнів, зумовленої триптофаном і тирозином. Поглинання протеїнів при 280 нм пов'язане з тирозином і меншою мірою триптофаном, тоді як поглинання при 295 нм асоціюється майже винятково із триптофаном, і його емісію можна селективно збудити при 295–305 нм.

Вивчали взаємодію альбуміну, кальмодуліну, імуноглобуліну IgG та інтерферону із серією олігоаденілатів, яка включає природний тример 2-5A₃ та його аналоги, що містять у 3'-положенні залишки 8-аміноаденозину (2-5A₃-NH₂), інозину, кордицепіну та епокси-аденозину, а також тіофосфатний аналог 2-5-триаденілату. Додатково вивчали аденозин, епокси-аденозин та епокси-модифікований динуклеотид 2-5A₂-еро. Препарати досліджували в концентраціях 5×10⁻⁵, 5×10⁻⁶ та 5×10⁻⁷ М, концентрація всіх протеїнів становила 3,5×10⁻⁶ М. Спектри флуоресценції записували зі збудженням 280 і 296 нм.

Спостерігали гасіння флуоресценції протеїнів у присутності 2-5A, залежно від їхньої структури та концентрації. Так, 2-5A₃ в концентрації 5×10⁻⁵ М та при збудженні 280 нм гасить емісію альбуміну на 55, кальмодуліну на 69, інтерферону на 18 та імуноглобуліну на 8%. Гасіння триптофанової емісії (збудження при 296 нм) істотно менше. Препарат 2-5A₃-NH₂ гасить флуоресценцію альбуміну на 67% при

збудженні 280 нм і на 54% при збудженні 296 нм, та суттєво знижує емісію інтерферону (відповідно на 50 і 39%). Подібні закономірності спостерігаються і для інших сполук. У більшості випадків гасіння емісії, що збуджувалась при 280 нм, помітно вище, ніж флуоресценції триптофану. Зменшення концентрації 2-5A в 10–100 разів у всіх випадках вело до значного зниження ефекту гасіння.

Таким чином, досліджені препарати в концентрації 5×10^{-5} М активно зв'язуються з альбуміном і кальмодуліном, менш активно – з інтерфероном і практично не взаємодіють з імуноглобуліном. Можна припустити, що взаємодія їх із протеїнами відбувається переважно в безпосередній близькості до залишків тирозину, а роль триптофану менша.

ДОСЛІДЖЕННЯ ІЗОЕНЗИМІВ ФРУКТОЗОБІСФОСФАТАЗИ ФІТОПАТОГЕННОЇ АХОЛЕПЛАЗМИ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХНІХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

ТОКОВЕНКО І. П.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ;
e-mail: tira@bigmir.net*

Відомо, що деякі ензими існують у вигляді декількох молекулярних форм, які генетично детерміновані. Ці множинні молекулярні форми окремого ензиму (ізоензими) каталізують одну і ту саму реакцію і їм властива однакова субстратна специфічність, але вони мають різні фізико-хімічні і регуляторні властивості, що пов'язано з наявністю в них однакових каталітичних, але різних регуляторних центрів.

Метою роботи було дослідження наявності ізоензимних спектрів фруктозобісфосфатази (ФБФ-ази) фітопатогенної ахолеплазми та вивчення деяких їхніх властивостей.

Внаслідок застосування методів автофокусування та електрофорезу в поліакриламідному гелі виявлено два ізоензими та встановлено їхню молекулярну масу, яка дорівнює 46 і 136 кДа. За визначення субстратної специфічності встановлено, що найефективнішим субстратом для обох ізоензимів виявився фруктозо-1,6-бісфосфат.

При дослідженні впливу катіонів двовалентних металів на активність ізоензимів ФБФ-ази встановлено, що обидві досліджувані ізоформи ензиму потребують катіонів магнію для виявлення максимальної активності. Його катіони концентрації від 2,0 до 60 мМ підвищують активність обох ізоформ ФБФ-ази до 110% порівняно з контролем. Але при концентрації від 60 мМ і вище спостерігається пригнічення активності ізоформ цього ензиму.

Щодо впливу катіонів марганцю на активність ізоформ ФБФ-ази, то дія їх на ізоензими менш виражена і вони здатні лише частково замінити катіони магнію.

Таким чином, при дослідженні ізоензимних профілів ФБФ-ази фітопатогенної ахолеплазми виявлено два ізоензими з молекулярною масою 46 і 136 кДа та вивчено вплив катіонів двовалентних металів на активність ізоензимів ФБФ-ази.

Встановлено, що катіони магнію і марганцю виявляють себе як кофактори в реакції, що каталізується ФБФ-азою цієї ахолеплазми і досліджувані ізоензими дуже чутливі до зміни концентрацій катіонів цих металів як в бік збільшення, так і в бік зменшення від оптимальної.

LYSOZYME INDUCES FORMATION OF LIPID DOMAINS ON MEMBRANE SURFACE

TRUSOVA V. M.

*Karazin Kharkov National University, Ukraine;
e-mail: vtrusova@yandex.ru*

Lateral asymmetry and formation of ordered lipid domains in cellular membranes have elicited extensive attention for more than four decades. Vast majority of studies indicates that lipid heterogeneity may exist due to lipid-lipid, lipid-protein, and protein-protein interactions. One class of lipid inhomogeneities is represented by the domains formed by acidic lipids in response to adsorption of oppositely charged cationic proteins. The driving mechanism for such sequestration is the tendency of lipids to minimize the electrostatic free energy of protein-lipid binding. In the present work we evaluated the ability of cationic protein lysozyme (Lz) to induce lateral redistribution of lipids in supported lipid bilayers (SLB) composed of zwitterionic lipid phosphatidylcholine (PC) and its mixtures with 5 or 25 mol% of anionic lipid cardiolipin (CL) (CL5 and CL25, respectively). Lipid bilayers contained trace amounts of BODIPY-PC or BODIPY-CL, and were visualized using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). Addition of Lz to neat PC membranes exerted no influence on SLB morphology as can be judged from invariance of BODIPY-PC fluorescence. In contrast, incorporation of Lz in CL-containing membranes led to significant changes in bilayer organization, where protein binding caused large areas with increased surface fluorescence of BODIPY-CL. These areas are of micrometer size, and in general remain in the plane of the SLB, being in focus at the level of the SLB and characterized by a stepwise change in fluorescence intensity. Notably, the step size between the areas of different intensity is discrete and approximately equals the intensity level of the parent bilayer (quantified after subtraction of camera noise). The above findings suggest that observed structures are lipid domains enriched in CL. The magnitude of this effect was found to increase with CL content and Lz concentration. The domains were of micrometer size and remained in the plane of lipid bilayer. The step size between the areas of different intensity was discrete and approximately equaled the intensity level of the parent bilayer (quantified after subtraction of camera noise). The time-scale of lipid demixing corresponded to 15 minutes after Lz addition. Later no changes in domain location or size were observed. The sequence of the events was supposed to be as follows. Lz attaches to the headgroups of anionic CL via electrostatic attraction giving rise to the lateral migration of CL molecules, remote from protein binding site, towards interaction zone. Clustering of CL creates gradients of curvature and line tension along the membrane surface. If the curvature radius of anionic lipid-enriched areas significantly exceeds that of surrounding lipid, membrane can further lower the interaction energy by bending and stretching. These elastic properties underlie further possible structural transformations of

CL-segregated regions. Such reorganization may manifest itself in squeezing out from parent SLB the multilayer lipid stacks, i.e. sheets of bilayers homogeneously stacked on top of each other. The obtained results may provide deeper insights into molecular details of such cellular processes as signal transduction, coupling of G-proteins with their receptors, exocytosis, regulating the activity of phospholipase A₂, protein kinase C, intracellular lipid and protein sorting. Moreover, present work may have implication with respect to Lz functioning against Gram-positive and Gram-negative bacteria containing CL.

This work was supported by the grant № 4534 from the Science and Technology Center in Ukraine, grant № F28.4/007 from Fundamental Research State Fund, and award from Human Frontier Science Program.

МОЛЕКУЛЯРНА ПРИРОДА МУТАЦІЙ, ПОВ'ЯЗАНИХ ІЗ ФЕНОТИПОМ NOTCH У *Drosophila virilis*

ТЮТЮННИКОВА А. П., ГУБЕНКО І. С., МАЛЮТА С. С.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: anna.tyutyunnykova@gmail.com*

Ген *Notch* – один із ключових генів раннього розвитку організму. Цей ген кодує трансмембранний гетеродимерний рецептор, і мутації в ньому призводять до найрізноманітніших наслідків, в залежності від їхньої локалізації. Відомо, що мутації в 11 і 12 EGF-повторах зовнішньоклітинного домену протеїну Notch спричинюють появу мутантного фенотипу у *Drosophila melanogaster*, ознаками якого є: потовщення жилок крила, особливо L3 та L5; надрізи країв крила, особливо між жилками L5 та L4; дефекти у розвитку сенсорних органів (недорозвинені очі або повна їх відсутність, дефекти щетинок); мутантний фенотип проявляється лише у половини самиць, самці з мутацією гинуть. Вищеописаний фенотип є подібним до фенотипу мутантної лінії *Drosophila virilis* N¹²², залученого до нашого дослідження.

Мета роботи – встановлення взаємозв'язку між фенотипом лінії N122 *Drosophila virilis* і мутаціями в ділянках 11 і 12 EGF-повторів гена *Notch*.

Об'єктом дослідження були чисті лінії *D. virilis*: дикий тип (лінія 9) та мутантна лінія N¹²². Здійснювалось виділення геномної ДНК *D. virilis*, дизайн олігонуклеотидних праймерів для ампліфікування ділянки, яка кодує 11 і 12 EGF-повтори гена *Notch*, ПЛР, секвенування продуктів ампліфікації та аналіз одержаних результатів за допомогою програм BioEdit та Gene Runner, а також із використанням баз даних <http://www.rcsb.org>, flybase.org, www.ncbi.nlm.nih.gov.

Вперше було проведено молекулярний аналіз ділянки гена *Notch D. virilis*, яка відповідає за взаємодію рецептора Notch із його лігандами. Результати секвенування показали наявність у мутанта трьох точкових мутацій, які, однак, жодним чином не впливають на зміну амінокислотної послідовності кінцевого протеїну. Тому можна вважати, що ці мутації є SNP (single nucleotide polymorphism – поліморфізмом по одному нуклеотиду).

Встановлено, що: 1 – в досліджуваному фрагменті гена *Notch D. virilis* наявні три точкові мутації, які можна віднести до SNP; 2 – виявлені мутації не змінюють амінокислотну послідовність протеїну, отже, в даному регіоні немає конформацій-

них змін, пов'язаних із виявленими мутаціями; 3 – виявлені мутації не є причиною утворення фенотипу мутантної лінії 122; 4 – запропоновано пошук мутацій в інших регіонах гена Notch (ділянках, що кодують анкіринові повтори, а також в ділянці, що кодує цитоплазматичний домен рецептора).

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ УБАЇНУ
ТА КАЛІКСАРЕНУ С107 НА АКТИВНІСТЬ
Na⁺,K⁺-АТР-ази У ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАНАХ
ПЕЧІНКИ ЩУРА В УМОВАХ *IN VIVO* ТА *IN VITRO***

¹ЦИМБАЛЮК О. В., ²КОСТЕРІН С. О., ³РОДІК Р. В.,
³КАЛЬЧЕНКО В. І.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

³Інститут органічної хімії НАН України, Київ;

e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua

Синтез і впровадження нових високоефективних хімічних сполук, які виявляють високу вибірковість щодо певних іон-транспортувальних систем клітини, зокрема натрієвої помпи, є надзвичайно важливою проблемою сучасної біохімічної мембранології та фармакології. Дійсно, одне з перших місць у світі за летальністю займають серцево-судинні захворювання, зокрема гіпертензія, гіпертрофія міокарда та кардіоміопатія. Ці захворювання супроводжуються порушенням функціонування натрієвої помпи і надлишковим рівнем ендогенних кардіотонічних стероїдів. З іншого боку, лікарські засоби для корекції серцевої недостатності містять убаїн (серцевий глікозид з наперстянки). Однак тривале застосування таких препаратів зумовлює значні системні порушення в організмі. Це свідчить про надзвичайну важливість пошуку альтернативних речовин, застосування яких спричинило б селективне пригнічення функції натрієвої помпи без шкідливих побічних ефектів.

З джерел літератури відомо, що окремі каліксарени (С107, С99) в умовах *in vitro* більш специфічно, ніж убаїн, модифікують іон-транспортувальні системи, зокрема Na⁺,K⁺-АТР-азу гладеньких м'язів. Тому завданням нашої роботи було в дослідях *in vitro* та *in vivo* дослідити ефекти убаїну та каліксарену С107, а також його структурного компонента – фрагмента М3, на загальну (Mg²⁺,Na⁺,K⁺-АТР-азну), Mg²⁺-АТР-азну та Na⁺,K⁺-АТР-азну активність плазматичної мембрани гепатоцитів щура.

Було виявлено здатність каліксарену С107 та убаїну (обидві речовини у концентрації 1 мМ) повністю пригнічувати Na⁺,K⁺-АТР-азну активність в умовах *in vitro*. Структурний компонент каліксарену – фрагмент М3 не впливав на ензиматичну активність препаратів мембран.

В умовах хронічної дії *in vivo* (36,3 нмоль/г маси тварини) спостерігається різнорідна дія каліксарену С107 та убаїну на Mg²⁺,Na⁺,K⁺-АТР-азну та Mg²⁺-АТР-азну активність препаратів плазматичних мембран: загальна активність після ін'єктування убаїну залишалась без змін, але вірогідно зростала убаїн-нечутлива Mg²⁺-АТР-азна активність. При ін'єктуванні каліксарену С107 показники

Mg²⁺, Na⁺, K⁺-АТФ-азної та Mg²⁺-АТФ-азної активності знижувалися вдвічі порівняно з інтактним контролем. Каліксарен С107 зберігав свої інгібіторні якості щодо Na⁺, K⁺-АТФ-ази в умовах цілісного організму. За умов *in vivo* фрагмент МЗ не змінював показники ензиматичної активності.

Таким чином, можна припустити, що механізми впливу досліджених речовин (каліксарену С107 та убаїну) на натрієву помпу в умовах *in vivo* не ідентичні, тому є перспективним подальше вивчення особливостей дії каліксарену С107 в умовах організму.

ДОСЛІДЖЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФІБРИНОГЕНУ дезВβ(1-23)₂

^{1,2}ЧЕРНИШЕНКО В. О., ¹ЧЕРНИШЕНКО Т. М.

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: bio.cherv@gmail.com

За допомогою обмеженого протеолізу фібриногену фібриногеназою, виділеною нами із отрути *Echis multisquamatis*, одержано та електрофоретично охарактеризовано препарати фібриногену, позбавленого фрагмента Вβ(1-23) – Fg-дезВβ(1-23)₂, та похідного від нього фібрину – Fп-дезААβ(1-23)₂. Метою нашої роботи було дослідження особливостей полімеризації фібрину дезААβ(1-23)₂ і агрегації тромбоцитів у присутності дезВβ(1-23)₂ фібриногену.

Турбідиметричний аналіз полімеризації фібриногену дезВβ(1-23)₂, показав, що лаг-фаза тромбініндукованої полімеризації подовжується в 4 рази і тангенс кута нахилу кривої зменшується в 2,7 рази порівняно з нативним фібриногеном. Отже, відсутність фрагмента Вβ(1-23) ВβN-домену, впливає на формування протофібрил та на латеральну асоціацію їх. Виявлено також, що фібрин дезААβ(15-23)₂ має меншу спорідненість до ДД-фрагмента фібрину. Аналітична гель-проникна хроматографія показала, що концентрація стабільних ДД-фібринових комплексів з фібрином дезААβ(15-23)₂ на 70% менша, ніж у разі з фібрином дезААВВ та дезАА. Цей факт може свідчити про участь фрагмента β(15-23) βN-домену фібрину в утворенні ДДЕ-тріади під час полімеризації.

Досліджено агрегацію тромбоцитів у присутності фібриногену дезВβ(1-23). Показано, що відсутність фрагмента Вβ(1-23) ВβN-домену фібриногену не впливає на швидкість та ступінь АDP-індукованої агрегації тромбоцитів, однак зменшує наступну дезагрегацію. Даний феномен можна пояснити дисоціацією αC-доменів фібриногену від центрального E-регіону молекули фібриногену та одне від одного після відщеплення ВβN-домену з можливою експозицією RGD-последовності Аα572-574.

Таким чином, дослідження функціональних властивостей фібриногену дезВβ(1-23)₂ дало змогу одержати дані, що свідчать про участь фрагмента Вβ(1-23) ВβN-домену у побудові протофібрил, їхній латеральній асоціації, у процесах агрегації тромбоцитів. У ході досліджень фібриноген дезВβ(1-23)₂ зарекомендував себе як придатний інструмент для вивчення протеїн-протеїнових та протеїн-клітинних взаємодій за участю фібриногену.

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕАЗЫ И ИХ НЕАКТИВНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ

*ЧЕРНЯВСКИЙ Е. А., СТРЕХА И. С., ЛЕСНИКОВИЧ Ю. А.,
ВОЛОБУЕВА В. В., АДЗЕРИХО И. Э., ШКУМАТОВ В. М.*

*Учреждение Белорусского государственного университета
«Научно-исследовательский институт
физико-химических проблем», Минск;
e-mail: biopharm@bsu.by*

Ультразвуковые волны давно и широко используются как физический фактор воздействия на живые организмы в физиологии и биохимических исследованиях. В последнее время очень активно развиваются методы применения ультразвука (УЗ) в терапевтической практике, производстве лекарственных препаратов и пищевых продуктов. Однако до настоящего времени выбор оптимальных параметров УЗ при различных сферах его применения носит эмпирический характер. Целью работы было изучение влияния УЗ обработки на функциональные свойства и пространственную структуру сериновых протеаз и их неактивных предшественников. Исследовано влияние низкочастотного импульсного (27,4 кГц, 51,2 Вт/см², 50%-я скважность) УЗ на химотрипсин, трипсин, химотрипсиноген и трипсиноген. Проведен сравнительный анализ контрольных и обработанных ультразвуком протеинов методами SDS гель-электрофореза, гель-проникающей и обратно-фазовой хроматографии, определением протеолитической активности и производной УФ-спектроскопии. Установлено, что в случае трипсина и химотрипсина ультразвуковая обработка приводит к потере энзиматической активности. Остаточная активность после УЗ обработки в течение 15 мин при 37 °С составляла 29% исходной активности химотрипсина и 16% трипсина. Наряду с этим УЗ обработка всех четырех протеинов приводит к накоплению продуктов автолиза. Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе обработки УЗ часть молекул исходных протеинов подвергается денатурации и дальнейшей быстрой протеолитической деградации.

СТРУКТУРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТОМІОЗИНУ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЗА УМОВ ОКИСНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ТА ПІД ВПЛИВОМ УЛЬТРАЗВУКУ

ШЕЛЮК О. В., ОМЕЛЬЯНЮК В. С., МЕДИНСЬКА К. О.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: shelyuk_olga@ukr.net*

В останні роки суттєва увага дослідників приділяється вивченню модифікації протеїнових молекул під впливом активних форм кисню. Як відомо, при м'язовій травмі продукується надлишкова кількість вільних радикалів, які можуть спричинювати безпосереднє ушкодження м'язових протеїнів. У літературі не існує даних про окисну модифікацію м'язового протеїнового комплексу — актоміозину, який є

зручною моделлю для вивчення м'язового скорочення. Тому метою нашого дослідження стало вивчення структурних характеристик актоміозину в умовах окисної модифікації, а також з'ясування впливу ультразвуку (УЗ) на м'язовий протеїновий комплекс за даних умов.

Дослідження проводили на актоміозині скелетних м'язів кролів ($n = 7$). Окисну модифікацію протеїнів проводили за методом О. Ю. Дубініної зі співавторами, із нашими модифікаціями. Озвучення актоміозину проводили неперервним УЗ (0,88 МГц) з інтенсивністю 0,05; 0,2; 0,4; 0,7 і 1,0 Вт/см² із використанням приладу УЗТ-3.04 С (Україна) впродовж 5 хв.

Вплив окисної модифікації на структурні параметри актоміозину досліджували за спектрами флуоресценції протеїну та параметром В згідно з розробленим у відділі біофізики НДІ фізіології методу, який дозволяє реєструвати спектральні зсуви до 0,02–0,05 нм.

Результати досліджень ($P < 0,05$) показали, що після окисної модифікації актоміозину інтенсивність флуоресценції становить 40% порівняно з нативним протеїновим комплексом (контроль), а за окисної модифікації попередньо озвученого УЗ актоміозину – 45%. Параметр В після дії УЗ зменшується зі зміщенням максимумів спектрів на 0,1–0,3 нм, за модифікуючої дії окислення на озвучений актоміозин параметр В зазнає більшого зменшення зі зміщенням максимумів спектрів приблизно на 1 нм.

Отже, одержані результати показали, що за окисної модифікації відбувається гасіння інтенсивності флуоресценції, що може свідчити про модифікуючу дію вільних радикалів на структуру протеїнового комплексу. Незважаючи на позитивний вплив УЗ певних режимів вплив окисної модифікації є значно вираженішим. Нормалізуючого впливу на досліджені структурні показники не відмічено.

РОЛЬ МАЛОГО РНП-КОМПЛЕКСА В ФОРМИРОВАНИИ ТЕЛ ВКЛЮЧЕНИЯ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА (*Bombyx mori*)

ШИРИНА Т. В., БОБРОВСКАЯ М. Т., КОЗЛОВ Э. А.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: e.a.kozlov@imbg.org.ua*

Известно, что вирусы ядерного полиэдрома (ВЯП) на поздней стадии инфекции образуют тела включения (полиэдры), состоящие из вирионов и малого РНП-комплекса с молекулярной массой около 30 000. Протеин тел включений (полиэдрин с M_r 28 500), кристаллизуясь в полиэдры, образует паракристалл, элементарной кристаллической ячейкой которого является 13S-субъединица полиэдрина (M_r 340 000). Электрофорезом в полиакриламидном геле мы показали, что малый РНП-комплекс содержит РНК длиной 50–60 нуклеотидов и полипептид с M_r 14 000 (p14). Биоинформационным подходом мы предсказали, что ВЯП *B. mori* кодируют малую РНК длиной 56 нуклеотидов, комплементарную к участку гена полиэдрина, кодирующего аминокислотную последовательность, ответственную за протеин-нуклеиновые взаимодействия. Предполагается, что предсказанная нами малая РНК

образует комплекс с *p14*, который представляет собой N-концевую половину полиэдрина. Гель-фильтрацией через Sephacryl S 300 и Superose 6 показано, что малый РНП-комплекс с M_r 32 000 образует димер, который, в свою очередь, образует ассоциат с двумя 13S-субъединицами полиэдрина с M_r около 700 000. Предлагается модель формирования полиэдров с участием малого РНП-комплекса.

РОЛЬ микроРНК В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, РАСПОЛОЖЕННЫХ В КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ЦЕПЯХ УЧАСТКОВ ГЕНОМА БАКУЛОВИРУСОВ, КОДИРУЮЩИХ ОЧЕНЬ ПОЗДНИЕ ГЕНЫ

ШИРИНА Т. В., БОБРОВСКАЯ М. Т., КОЗЛОВ Э. А.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: e.a.kozlov@imbg.org.ua*

Вирусы ядерного полиэдроса (ВЯП) семейства бакуловирусов содержат два очень поздних гена *ph* и *p10*, расположенных на разных участках плюс цепи. На участке минус цепи, комплементарном к гену *ph*, расположен ген *orf1629*, а на комплементарном к гену *p10* участке расположен ген *p74*. Ранее было известно, что имеет место перекрестная регуляция экспрессии генов *ph* и *orf1629* ВЯП *Autographa californica*. Для второй пары комплементарных генов *p10* и *p74* такие данные отсутствуют. Мы предположили, что в процесс перекрестной регуляции генов *ph* и *orf1629* ВЯП *Autographa californica* могут быть вовлечены микроРНК, закодированные в этих генах. Используя разработанный нами алгоритм поиска микроРНК в отдельно взятых районах генома бакуловирусов, мы предсказали микроРНК, закодированные в выше упомянутых генах ВЯП *Autographa californica* и *Bombyx mori*. Полученные данные позволяют нам сформулировать гипотезу, согласно которой в перекрестной регуляции экспрессии генов, расположенных в комплементарных участках генома бакуловирусов, принимают участие микроРНК, закодированные в этих участках.

ВИВЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ОСНОВ СПЕЦИФІЧНОГО ВПІЗНАВАННЯ ПРОКАРІОТНОЇ тРНК^{Tyr} ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗОЮ *Thermus thermophilis*

¹ЯРЕМЧУК Г. Д., ¹ПОПОВА Х. Є., ²КУСАК С. А., ¹ТУКАЛО М. А.

*¹Институт молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
²Європейська молекулярно-біологічна лабораторія, Гренобль, Франція;
e-mail: mtukalo@imbg.org.ua*

Тирозин-тРНК синтетаза (ТирРС) належить до 1-го структурного класу аміноацил-тРНК синтетаз. Незважаючи на це, ТирРС має дві неканонічні для цього класу риси. По-перше, це функціональний димер, який зв'язує дві молекули тРНК,

а по-друге, ТирРС має тип пізнавання тРНК, який характерний для 2-го структурного класу аміноацил-тРНК синтетаз (Yaremchuk et al., 2002). Метою нашої роботи було вивчення особливостей молекулярних основ специфічного впізнавання прокариотної тРНК^{Tyr} тирозин-тРНК синтетази *Thermus thermophilus* (ТирРСТТ) з використанням методу рентгеноструктурного аналізу, біохімічних методів та генно-інженерних методів. Після інтенсивного скринінгу умов кристалізації й їхньої оптимізації нам вдалося одержати кристали комплексу ТирРСТТ : тРНК^{Tyr}, які мали кращу ніж раніше роздільну здатність (0,19 нм). Одержана структура з високим розділенням чітко показала входження 3'-кінця тРНК^{Tyr} до активного центру ензиму. Більш чітко показано деталі впізнавання ензимом акцепторного стебла і варіабельної гілки тРНК^{Tyr}. Спираючись на одержані нами структурні дані про будову комплексу ТирРСТТ: тРНК^{Tyr} було розпочато вивчення особливостей взаємодії тРНК^{Tyr} із гомологічною тирозил-тРНК синтетазою методом сайт-спрямованого мутагенезу. Для цього були одержані мутантні форми тРНК^{Tyr} і вивчена їхня аміноацилювальна активність. Виявилось, що мутації у акцепторному стеблі тРНК не призводять до значних змін активності РНК^{Tyr}, тоді як мутації у антикодоні призводять до повної її втрати. Таким чином, елементи впізнавання гомологічної синтетази для прокариотної тРНК^{Tyr} знаходяться, в першу чергу, в антикодоні, тоді як в системах із еукаріот і архебактерій основними елементами впізнавання є залишки нуклеотидів акцепторного стебла, а антикодон не вносить суттєвого внеску до цього процесу.

II. РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ТА КЛІТИННИХ ФУНКЦІЙ

ДОПОВІДІ

**ДОСЛІДЖЕННЯ ОБМІНУ ІОНІВ Са
У МІТОХОНДРІЯХ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА
ЗА ДОПОМОГОЮ ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ**

БАБІЧ Л. Г.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: babich@biochem.kiev.ua*

Більшість Ca^{2+} -сигналів у клітині спряжені з обміном цього катіона у мітохондріях. Сьогодні мітохондрії розглядають як один з внутрішньоклітинних пулів Ca^{2+} . В наших експериментах з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM досліджено Ca^{2+} -індуковані зміни мембранного потенціалу ізольованих мітохондрій міометрія. Так, зокрема, показано, що додавання Ca^{2+} (100 мкМ) у середовище інкубації індукує деполяризацію мітохондріальної мембрани. За наявності у середовищі інкубації Mg^{2+} (3 мМ) і АТР (3 мМ) додавання Ca^{2+} (100 мкМ) не супроводжується деполяризацією, що, можливо, пояснюється функціонуванням АТР-синтетази в оберненому напрямку як H^{+} -помпи, яке запобігає дисипації мембранного потенціалу мітохондрій.

З використанням Са-чутливого флуоресцентного зонда fluo-3AM та проточного цитометра також доведено можливість реєстрації рівня іонізованого Са у матриксі мітохондрій. Зокрема, показано, що, за умов моделювання функціонування Ca^{2+} -уніпортеру мітохондрій, має місце Ca^{2+} -індуковане збільшення інтенсивності флуоресценції зонда fluo-3, величина якого залежала від концентрації катіона. Накопичення катіона є стабільним у часі та пригнічується введенням 5 мкМ A23187+1 мМ EGTA. За наявності 1 мкМ протонифору CCCP та 20 мкМ Ca^{2+} інтенсивність флуоресценції зонда не змінюється. Введення іонів Са у середовище інкубації, що не містить АТР та Mg, приводить до деполяризації мітохондріальної мембрани, проте це не перешкоджає акумуляції Ca^{2+} у матриксі. Рівень Ca^{2+} у деполяризованих мітохондріях збільшується за наявності у середовищі інкубації рутенієвого червоного та іонів Mg. Отже, показано, що ізольовані мітохондрії міометрія накопичують іони Са як у поляризованому, так і деполяризованому станах.

Таким чином, за допомогою проточної цитометрії та з використанням фракції ізольованих мітохондрій можна досліджувати: 1) закономірності обміну йонів Са; 2) зміни мембранного потенціалу; 3) зміни форми та розміру об'єкту, а також 4) проводити скринінг ефекторів, які здатні модулювати ці параметри.

SWEET SIGNS OF APOPTOTIC DEATH

*BILYY R., TOMIN A., SHKANDINA T., MAGORIVSKA I.,
STOIKА R., KIT Yu.*

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: R.Bilyy@nas.gov.ua*

Earlier, we proved that exposure of sub-terminal galactose and mannose residues of glycocalyx glycoproteins via their desialilation is the intrinsic feature of apoptotic cells (Bilyy *et al.*, Cytometry, 2003; Bilyy *et al.* Autoimmunity, 2007; Bilyy *et al.* Apoptosis, 2008). This phenomenon has been effectively used for detection of apoptotic cells (Bilyy *et al.* Autoimmunity, 2009). It is also known that an exposure of desialated proteins on the surface is one of the markers for phagocytes to eliminate the cell. Failure in the elimination of apoptotic cells results in autoimmune disorders. The aim of current work was to clarify the role of surface glycans, particularly desialated, in the apoptotic cells clearance and to reveal the mechanisms responsible for cell surface glycan changes during apoptosis. We have studied sialidase activity responsible for apoptotic glycan desialation. Fluorescent vital dyes were used to conduct the study of enzymatic sialidase activity. An increase of sialidase activity on the surface of apoptotic cells was proved as early as 2 h after the onset of apoptosis. Sialidase activity was localized in the integral protein fraction of plasma membrane. Besides, we have shown that an increase in sialidase activity during apoptosis is caspase-dependent process and both the involved caspases and their cellular targets have been identified. By artificial desialilation of cells, we were able to significantly increase their clearance by human macrophages. While the induction of apoptosis in the presence of sialidase inhibitor led to inefficient clearance of apoptotic cells lacking desialilated glycotops on their surface. The commercially available neuraminidases are mostly of bacterial origin, and human sialidases are not available for artificial cell desialation. Taking this into account, we performed a screening for catalytic antibodies possessing sialidase activity (Sialic-abzymes) in the blood serum (since desialated cells are primary ones in contact with blood serum). We failed to detect any sialic-abzyme activity in blood serum of healthy donors, but we found it to be significantly higher in the IgG fraction of patients with multiple myeloma and SLE. By using proteinG-sepharose, we have isolated abzymes possessing sialidase activity. To prove that sialidase activity is an intrinsic property of isolated molecules, we performed HPLC analysis in the adverse conditions facilitating dissociation of immune complexes, as well as in gel digestion of fluorescent sialidase substrate. Treatment of cells with sialic abzymes demonstrated their action towards human RBCs and PMNs which led to an increased clearance by human macrophages. Summarizing, we present a novel tool to facilitate apoptotic clearance and mechanisms underlying its action.

This work was partly supported by WUBMRC Grant, grants from NASU, President of Ukraine, and German-Ukrainian bilateral grant UKR08/035.

**THE MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING
THE CHANGES IN ACTIVE GLUTAMATE TRANSPORT
AND DEVELOPMENT OF SYNAPTOPATHY**

BORISOVA T. A.

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv;
e-mail: tborisov@biochem.kiev.ua*

The study was focused on the analysis of the changes in key characteristics of glutamatergic neurotransmission: (1) Na⁺-dependent glutamate uptake by rat brain nerve terminals; (2) the extracellular level and tonic release of glutamate, i.e., parameters, which determined spontaneous activity of the brain; and (3) stimulated by depolarization of the plasma membrane exocytotic (Ca²⁺-dependent) and transporter-mediated (Ca²⁺-independent) release of glutamate under different experimental conditions.

Two model systems were used to investigate the alterations in glutamate transport and so the experiments were carried out on: (*) nerve terminals of rats subjected to hypergravity in the cranio-caudal direction and (**) cholesterol-deficient nerve terminals that were obtained after the treatment with cholesterol-depleting agent, methyl- β -cyclodextrin.

The changes in uptake, unstimulated/stimulated release and the ambient level of L-[¹⁴C]glutamate were found in both experimental models. Interrelations between uptake, tonic release and ambient level of the neurotransmitter were determined under conditions of hypergravity and cholesterol deficiency. Using the latest model, we demonstrated that the malfunction of glutamate transporters reduced the cytosolic level of the neurotransmitter and augmented the ambient glutamate concentration, thereby favoring a decrease in intra-to-extracellular glutamate ratio and net tonic glutamate release.

The alterations in stimulated by depolarization exocytotic and transporter-mediated release of glutamate were shown to be a result of a decrease in the proton gradient of synaptic vesicles, and thus the redistribution of glutamate between the vesicular and cytosolic pools. This redistribution was attributable to both experimental models but led to different physiological consequences under conditions of hypergravity and cholesterol deficiency. The molecular mechanisms underlying the changes in active glutamate transport, which caused the development of synaptopathy, were analyzed.

Blood platelets contain Na⁺-dependent glutamate transporters similar to those located in the plasma membrane of neurons. The aim of the research was to analyze comparatively transport of glutamate in blood platelets and nerve terminals. Possible significance of blood platelets as the peripheral models of presynaptic nerve terminals and as markers in synaptopathy was assessed.

**ВПЛИВ ПОЗАКЛІТИННИХ АДЕНІНОВИХ
НУКЛЕОТИДІВ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ
СТИМУЛЬОВАНОГО СУКЦИНАТОМ ДИХАННЯ
СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН СЛИННИХ ЗАЛОЗ
ЛИЧИНКИ ДЗВІНЦЯ**

*ВЕЛИКОПОЛЬСЬКА О. Ю., МАНЬКО Б. О.,
ПАСЛАВСЬКА К. В., МАНЬКО В. В.*

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: Olga.Velykopolska@gmail.com*

У слинних залозах личинки дзвінця ідентифіковано P2X- і P2Y-рецептори (Великопольська, Манько, 2005). За тривалої дії агоністів деякі P2X-рецептори (наприклад, P2X₇-рецептори ссавців) з катіонного каналу перетворюються на неселективну пору, проникну для сполук з молекулярною масою до 900 Да (Surprenant *et al.*, 1996; Virginio, 1997). Метою нашої роботи було перевірити можливість такої трансформації P2X-рецепторів досліджуваних клітин, використовуючи непроникний через плазматичну мембрану сукцинат (Hems *et al.*, 1968). Проникність сукцинату (118,09 Да) оцінювали за швидкістю поглинання O₂, яку визначали полярографічно з використанням кисневого електрода Кларка. Позаклітинне середовище містило, ммоль/л: NaCl – 136,90, KCl – 5,36, CaCl₂ – 1,76, Na₂HPO₄ – 0,35, KH₂PO₄ – 0,44, MgCl₂ – 0,49, глюкоза – 5,55; pH 7,2. Для активації P2X-рецепторів використовували АТР або АДР у концентрації 100 мкмоль/л, клітинне дихання стимулювали сукцинатом (0,35 ммоль/л). Швидкість поглинання кисню інтактними слинними залозами становила 0,76 ± 0,02 нг-ат. О/(хв × зал.). Внаслідок додавання сукцинату інтенсивність дихання не змінилася (*n* = 10), що свідчить про непроникність плазматичної мембрани для нього. Крім того, додавання лише АДР чи АТР також не призводило до змін швидкості поглинання кисню (*n* = 5). Але за спільної дії агоніста P2-рецепторів і сукцинату поглинання кисню підсилювалося. Причому, ступінь підсилення залежав від послідовності додавання цих речовин та типу агоніста. Так, додавання АДР у середовище, що містило сукцинат, стимулювало дихання на 22,31% (*n* = 5, *P* ≤ 0,01). Сукцинат після попереднього внесення АДР спричиняв збільшення швидкості дихання на 18,91% (*n* = 5, *P* ≤ 0,01). Аналогічно, АТР після сукцинату інтенсифікував поглинання кисню на 40,29% (*n* = 5, *P* ≤ 0,01), тоді як сукцинат на тлі АТР – лише на 31,77% (*n* = 5, *P* ≤ 0,01). Отже, сукцинат активував дихання секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця за присутності АДР або АТР у концентрації, недостатній для інтенсифікації чи пригнічення окисного фосфорилування. Це підтверджує наявність у плазматичній мембрані P2X-рецепторів, подібних за властивостями до P2X₇-рецепторів ссавців. Спорідненість цих рецепторів до АТР є вищою, ніж АДР, що також притаманно P2X₇-рецепторам (Surprenant *et al.*, 1996). Наявність таких рецепторів дозволяє досліджувати вплив непроникних через ліпідний матрикс плазматичної мембрани агентів на внутрішньоклітинні процеси.

ВПЛИВ КОН'ЮГОВАНОЇ ЛІНОЛЕВОЇ КИСЛОТИ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ КЛІТИН РАКУ ПРОСТАТИ ЛІНІЇ C4-2

¹ВУДМАСКА І. В., ²КАРПОВА Е. А., ²КУЛИК Г. О.

¹Інститут біології тварин НААН України, Львів;

²Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA;

e-mail: igor.vudmaska@inenbiol.com.ua

Тривалий час усі транс-ненасичені жирні кислоти вважалися шкідливими, проте зараз встановлено, що цис-, транс-кон'юговані ізомери лінолевої кислоти мають антиканцерогенні, антиліпогенні, антидіабетичні та протизапальні властивості.

Нами проведено дослідження впливу синтетичних 9с,11т і 10т,12с 18:2 кислот на проліферацію клітин раку простати C4-2 та вміст у них деяких регуляторних протеїнів. До культури клітин додавали зв'язані з бичачим сироватковим альбуміном жирні кислоти у концентрації 50 мкмоль та інкубували протягом 24 годин. Контролем служили клітини, які інкубувалися з альбуміном без жирних кислот.

Обидві жирні кислоти пригнічували проліферацію. Після інкубування у зразках, до яких додавали 9с,11т ізомер, кількість клітин була у 1,5, а у зразках з 10т,12с ізомером у 2 рази меншою порівняно з контролем. Згідно результатів багатьох дослідників 10т,12с ізомер у деяких видах пухлин збільшує вміст каспаз 3, 8, 9 та 12 (MCF-7, MDA-MB-231, HT-29, SK-HEP-1, MIP-101, PC-3, dRLh-84) і зменшує експресію та фосфорилування Akt (MCF-7, MDA-MB-231, HT-29, TSU-Pr1). Проте, в наших дослідженнях активація прокаспаз-3 була незначною і статистично не вірогідною. Разом з тим, ми виявили, що 10т,12с 18:2 на 20% посилює стимулюючу дію LY294002 на вміст каспази-3. Наші дослідження не показали міжгрупових різниць у кількості pAkt за додавання обох досліджуваних жирних кислот. Не виявлено також впливу на вміст LC3-II, зростання якого характерне для автофагії.

Таким чином з одержаних результатів випливає, що 9с,11т і 10т,12с ізомери лінолевої кислоти пригнічують ріст тканинної культури раку простати C4-2, проте на відміну від багатьох інших ракових клітин цей вплив скоріш за все не пов'язаний з посиленням апоптозу. Оскільки за цих умов не стимулювалася автофагія, а мікроскопічні дослідження не виявили некротичних змін, зменшення кількості ракових клітин лінії C4-2 у присутності 9с,11т і 10т,12с 18:2 жирних кислот, очевидно, зумовлене сповільненням проліферації.

**PERINATAL HYPOXIA INDUCES LONG-LASTING
CHANGES IN GABAERGIC PROCESSES IN THE RAT
BRAIN HIPPOCAMPUS**

*HIMMELREICH N. H., YATSENKO L. N., POZDNYAKOVA N. G.,
PARKHOMENKO N. T.*

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: ninahimm@biochem.kiev.ua*

Perinatal hypoxia leads to multiple chronic neurological deficits that appear to be a consequence of disturbing a developmentally regulated maturation process, including organization of axonal connections in the developing brain. GABA, which is the first functional neurotransmitter in the developing brain, plays an important signaling function for synapse formation and network construction. In contrast to an adult's brain, where the effect of GABA is inhibitory, neurons of immature brain respond to GABA by excitation. Changes in key components of the GABAergic system in the newborn brain induced by hypoxia are thought to play a pivotal role in the pathophysiology of chronic neurological deficits.

Here, we report the data obtained in experiments with rats exposed to hypoxia and seizures at an age of 10-12 postnatal days and taken in experiments 8-9 weeks after hypoxia episode. We evaluated the functional activity of plasma membrane GABA transporters, the extracellular level of GABA, a regulatory effect of presynaptic metabotropic GABAB autoreceptors in control rats and rats exposed to a single episode of hypoxia/seizures at the perinatal period. Experiments were performed with isolated nerve terminals (synaptosomes) from the rat brain hippocampus. Special attention was paid to pyruvate as an excellent neuroprotective agent.

We have revealed that one of the consequences of perinatal hypoxia was a significant decrease of the initial and maximal rates of GABA accumulation in hippocampal nerve terminals (from 328.5 ± 26.4 to 258.2 ± 20.0 pmol/min x mg of protein and from 980.4 ± 68.6 to 384.0 ± 53.8 pmol/min x mg of protein, respectively), although perinatal hypoxia did not induce any changes in affinity of GABA transporters to the transmitter; the value of the apparent K_m was 8.9 ± 1.8 μ M for the control as well as for experimental rats.

The extracellular [3 H]GABA level maintained by hippocampal synaptosomes was significantly higher in adult rats exposed to hypoxia/seizures at P10-12 than in the control adult rats. Moreover, the experimental rats, in contrast to the control rats, were characterized by inability to maintain a stable level of the extracellular [3 H]GABA. The latter had a tendency towards rising. Pyruvate was a highly effective for lowering and stabilizing the extracellular [3 H]GABA levels. This action of pyruvate was associated with activation of GABA accumulation and modulation of kinetic properties of GABA transporters.

Presynaptic GABAB autoreceptors modulate voltage-gated Ca^{2+} -channel permeability thereby controlling release of GABA. We have revealed that in the control group of rats activation of hippocampal presynaptic GABAB receptors by baclofen resulted in a slight inhibition of exocytotic GABA release, by $12.3 \pm 3.4\%$. In rats exposed to hypoxia, the inhibitory action of GABAB receptors on the release of GABA became essentially stronger amounting to $32.2 \pm 2.1\%$.

It is concluded that a long-lasting increase in the extracellular GABA level evoked by perinatal hypoxia is a consequence of diminished activity of GABA re-uptake and could be a reason of enhanced expression of presynaptic GABA_B autoreceptors that results in impairment of inhibitory processes and triggering pathological hyperexcitability of the neuronal network.

ВИКОРИСТАННЯ ПОТЕНЦІАЛЧУТЛИВОГО ЗОНДА DiOC₆(3) ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ ПОТЕНЦІАЛУ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ТА МІТОХОНДРІЙ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН МАТКИ

ДАНИЛОВИЧ Г. В., ДАНИЛОВИЧ Ю. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua*

Зміни мембранного потенціалу плазматичної мембрани та мітохондрій відіграють важливу роль у забезпеченні обміну катіонів та підтриманні іонного гомеостазу в клітинах. У зв'язку з цим набуває важливого значення можливість тестування потенціалу як плазматичної мембрани так і мітохондрій, а також дослідження його змін під дією різних агентів.

Для тестування трансмембранного потенціалу ($\Delta\phi$) ми застосували потенціалчутливий флуоресцентний зонд DiOC₆(3) (3,3'-дигексилосакарбоціанін), який належить до класу ціанінових барвників, є ліпофільним та позитивно зарядженим. Методом спектрофлуориметрії на фракції везикул сарколеми, виділеної методом диференційного центрифугування у градієнті густини сахарози, було показано, що крива залежності відносного гасіння флуоресценції зонда DiOC₆(3) (5 мкМ, $\lambda_{36} = 450$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 506$ нм) після додавання валіноміцину (0,5 мкМ) від зміни концентрації K^+ у позавезикулярному середовищі майже збігалася із кривою відповідної залежності $\Delta\phi$, розрахованої за рівнянням Нернста. Отже, на мембрані везикул формується K^+ -рівноважний потенціал (знак мінус всередині), значення якого визначається величиною калієвого градієнта.

Для підтвердження цих результатів використали метод протокової цитометрії (протоковий цитометр COULTER EPICS XLTM, $\lambda_{36} = 488$ нм, $\lambda_{\text{фл}} = 510$ нм). Оцінювали інтенсивність флуоресцентної відповіді більшості везикул в їхній загальній популяції. Було показано пряму залежність між флуоресцентною відповіддю зонда та розрахованим $\Delta\phi$ у разі зміни наведеного потенціалу від -58,3 до -10,3 мВ. Значення відносної флуоресцентної відповіді зонда, за різних концентрацій K^+ ззовні везикул, наближались до значень величини $\Delta\phi$, розрахованого за рівнянням Нернста. Таким чином, показана можливість тестування штучного K^+ -рівноважного потенціалу на мембрані везикул методом протокової цитометрії з використанням DiOC₆(3), який за своєю величиною відповідає розрахованому за рівнянням Нернста.

Наступним етапом було дослідити можливість тестування як трансмембранного потенціалу ($\Delta\phi_{\text{ПМ}}$), так і мітохондріального потенціалу ($\Delta\phi_{\text{М}}$) на моделі міоцитів з використанням методу спектрофлуориметрії у стандартному середовищі Хенкса.

Показане зростання інтенсивності флуоресценції $\text{DiOC}_6(3)$ в залежності від його концентрації в клітинній суспензії. Виявлено, що при 10 нМ $\text{DiOC}_6(3)$ зростання інтенсивності флуоресценції не чутливе до убаїну (1 мМ) та калієвої гіперполяризації (120 мМ), але знижується в присутності СССР (10 мкМ). За 50 нМ – 1 мкМ $\text{DiOC}_6(3)$ відповідь зонда чутлива як до убаїну та КСІ (вплив на потенціал сарколеми), так і до протонофору СССР (вплив на мітохондріальний потенціал). За наявності детергенту дигітоніна та СССР (або 1 мМ NaN_3) зростання інтенсивності $\text{DiOC}_6(3)$ не спостерігали.

Таким чином, відпрацьовані умови для тестування потенціалів $\Delta\varphi_{\text{PM}}$ та $\Delta\varphi_{\text{M}}$ на моделі міоцитів за допомогою $\text{DiOC}_6(3)$, що може дозволити використати дану модель у разі дослідження впливу різноманітних агентів.

сGMP-НЕЗАЛЕЖНІ ЕФЕКТИ ОКСИДУ АЗОТУ В МІОМЕТРІЇ, ЯКІ МОЖУТЬ ЛЕЖАТИ В ОСНОВІ РЕГУЛЯЦІЇ КОНТРАКТИЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ

ДАНИЛОВИЧ Ю. В., ДАНИЛОВИЧ Г. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua*

Здатність оксиду азоту розслабляти гладенькі м'язи зумовлює інтерес до використання донорів NO в акушерсько-гінекологічній практиці. У фізіологічних експериментах донори NO викликають релаксацію смужок міометрію. Але шляхи реалізації функціональної активності оксиду азоту в матці вивчені недостатньо і це складає актуальну наукову проблему. Наші дослідження та дані літератури демонструють підвищення під впливом донорів NO вмісту сGMP у міометрії. Втім, як демонструється в чисельних роботах, цей ефект слабо корелює з розслабленням тканини. Серед альтернативних механізмів дії NO передбачають активацію Ca^{2+} -залежних K^+ -каналів. У відповідності до цього нашою метою було дослідити сGMP-незалежні ефекти оксиду азоту (як донори NO використовували нітропрурид і нітрит натрію) у міометрії, які можуть лежати в основі регуляції контрактильної активності. Об'єктом досліджень слугувала первинна культура міоцитів та фракція сарколеми міометрію щурів та свиней, були використані методи спектрофлуориметрії, лазерно-кореляційної спектроскопії, протокової цитометрії, електронної мікроскопії та радіоізотопна техніка.

Було показано, що донори NO підвищують концентрацію Ca^{2+} у міоплазмі (виміри проведені з використанням флуоресцентного зонду BCECF-AM) та стимулюють пасивний транспорт катіону у міоцити (застосований $^{45}\text{Ca}^{2+}$). Для з'ясування причин цього була використана модельна система везикул сарколеми міометрія, характеристики яких відповідають наведеним у літературі. Досліди з використанням флуоресцентного зонду АНС і методу "іонного удару" показали, що поверхнева щільність зарядів знижується під впливом нітриту натрію, що супроводжується гасінням флуоресценції зонду і зниженням гідродинамічного діаметру везикул. Останій показник залишається майже незмінним у присутності модифікаторів позитивно заряджених хімічних груп поверхні мембрани. Можливе

зниження щільності позитивних зарядів сарколеми з відповідним посиленням рецепції і транспортування катіонів – одне з вірогідних пояснень зареєстрованого нами зростання акумуляції Ca^{2+} везикулами під впливом NO. Зростання концентрації Ca^{2+} у міоплазмі за дії донорів NO може бути також обумовлене пригніченням активності транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-ази, яке спостерігається під впливом нітропрусида та нітриту натрію. У присутності дитіотрейтолу цей ефект зникає. Локальне зростання концентрації катіону в субсарколемальній області може призвести до активації K^+ -каналів і зниження рівня збудження сарколеми. Аналіз експериментів по вивченню дії донорів NO на штучний трансмембранний потенціал у системі “ K^+ -валіноміцин/везикули” із використанням потенціалчутливого зонда $\text{DioC}_6(3)$ та методу протокової цитометрії дає підстави припустити, що нітрит натрію поляризує мембрану за відсутності валіноміцину та приводить до дисипації раніше наведеного потенціалу, що можна пояснити збільшенням проникності мембрани для K^+ .

Зростання проникності сарколеми для Ca^{2+} , незалежно від його функціонального змісту, має бути компенсоване. Встановлено, що АТР-залежне накопичення Ca^{2+} у саркоплазматичному ретикулумі пермеабілізованих дигітоніном міоцитів (використовувався $^{45}\text{Ca}^{2+}$) стимулювалось донорами NO. Досліджувані сполуки приводять також до пригнічення пасивного вивільнення Ca^{2+} , активованого екзогенним кальцієм.

Отже, сGMP-незалежні ефекти оксиду азоту можуть реалізовуватись у міометрії на рівні саркоплазматичного ретикулуму і, можливо, шляхом активації K^+ -каналів сарколеми.

О ФУНКЦИОНАЛЬНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ С ВИТАМИНАМИ И КОФЕРМЕНТАМИ

ДОНЧЕНКО Г. В.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: dongv@biochem.kiev.ua*

Функциональное взаимодействие витаминов имеет исключительно важное значение в процессах всасывания, усвоения, обмена и проявления специфического действия каждого витамина. В обмене и реализации биологической роли фолиевой кислоты (ФК) участвуют витамины B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , PP, E, их биологически активные коферментные производные, витаминоподобные соединения – доноры метильных групп, например холин и др.

Дефицит витамина B_{12} может вызвать аналогичную фолиеводефицитную анемию, повреждение функционального состояния периферической нервной системы и спинного мозга, что приводит к тяжелой инвалидности. Механизм, через который дефицит витамина B_{12} вызывает межобластную анемию, связан с его влиянием на транспорт, накопление и обмен фолатов с последующим угнетением синтеза ДНК. Известно, что как витамин B_{12} , так и ФК необходимы для синтеза тимидила для образования ДНК. А нарушение синтеза миелина с развитием неврологичес-

ких патологій пов'язано з дефіцитом вітаміна B_{12} , а не фолата, однак біохімічні механізми не вивчені.

Чоловік повинен отримувати певну кількість холина (0,5–2,5 г/сут.) як донора метильних груп разом з вітаміном B_{12} , ФК і кофакторів реакцій трансметилування.

Доказано, що регулярне надходження комбінації вітамінів B_1 , B_6 і B_{12} , призводить до позитивного ефекту при терапії пошкоджених периферических нервів при їх регенерації. В синтезі ніацина (вітаміна РР) із триптофану рибофлавін (вітамін B_2) і вітамін B_6 є необхідними кофакторами. І, відповідно, ніацин бере участь у біосинтезі активних форм цих двох вітамінів і інших вітамінів, в тому числі і ФК.

Проблема фортифікації харчових продуктів вітамінами, в тому числі і ФК, безумовно, є актуальною, а необхідність її реалізації науково обґрунтованою, особливо з урахуванням реальної оцінки загрозливо низького вітамінного статусу різних груп населення України, що лежить в основі розвитку патологій, що призводять до зменшення чисельності громадянського населення. Однак, є повністю очевидним, що вирішувати питання фортифікації харчових продуктів слід не на основі одного будь-якого вітаміну, а з урахуванням сучасних знань в області вітамінології про механізми функціонального взаємодіяння вітамінів.

АНАЛІЗ ВЛИЯНИЯ АЛЛОКСАНА НА РЕГУЛЯТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ЭРИТРОЦИТОВ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ФАЗОВОЙ ТЕОРИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТКИ

*ДОЦЕНКО О. И., ДОЦЕНКО В. А., ПОЖИДАЕВА А. Э.,
АКСЕНКО Е. В.*

*Донецкий национальный университет, Украина;
e-mail: dots_don@ukr.net*

Фактором, определяющим направленность реакции клетки на внешние воздействия, являются фазовые золь-гель переходы коллоидных структур клетки. Другие факторы, оказывающие параметрическое влияние на золь-гель переходы (кальций цитозоля, циклические нуклеотиды, АФК), также могут резко повышать чувствительность клетки к внешним физическим воздействиям.

Исследования поведения эритроцитарного пула АТР в условиях воздействия на них физиологически-активных веществ имеют важное теоретическое и прикладное значение. Также, безусловный интерес представляет оценка уровня аденозинтрифосфата в эритроцитах при изменении концентраций различных агентов, способных модифицировать кальцийзависимые регуляторные механизмы фазового состояния клетки.

Объектом исследования были эритроциты здоровых доноров, выделяемые из крови по стандартным методикам. Пасту эритроцитов использовали для приготовления суспензии, с содержанием гемоглобина 1,2–1,5 мг/мл. Исследовали метаболизм эритроцитов в процессе их истощения в среде без глюкозы, в средах со-

держашей глюкозу (4 мМ), глюкозу и ионы Ca^{2+} (2 мМ). Концентрацию аллоксана в среде инкубирования варьировали от 10^{-4} до 10^{-15} М. Суспензию эритроцитов с добавками различных доз аллоксана инкубировали при 37 °С в течение 3-х часов. В качестве контроля использовали пробу, содержащую вместо аллоксана физиологический раствор (без инкубирования). Контрольные серии суспензий эритроцитов, не содержащие аллоксан, также инкубировали в течение 3-х часов и каждые 20 мин определяли исследуемые показатели.

В качестве экспериментальных данных, характеризующих интенсивность энергетического обмена, использованы: 1) динамика входа глюкозы в клетку в присутствии аллоксана и активность гексокиназы; 2) данные математического моделирования количества центров связывания, констант связывания глюкозы в присутствии аллоксана; 3) изменения внутриклеточных концентраций АТФ, 2,3-ДФГ и неорганического фосфата эритроцитов, инкубируемых в средах различного состава, а также в средах, содержащих антагонисты кальция в целях модификации регуляторных кальциевых процессов; 4) изменение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы для характеристики потока через пентозофосфатный путь; 5) изменение активности лактатдегидрогеназы и внутриклеточной рН.

Показана роль ионов Ca^{2+} и кальцийсвязывающих протеинов в фазовых золь-гель переходах, направленных на регуляцию клеточных процессов и стабилизацию уровня АТФ.

В докладе будет сделан анализ влияния различных концентраций аллоксана на фазовое состояние цитоплазмы и связанные с ним изменения активностей внутриклеточных энзимов.

MITOCHONDRIAL STRESS SIGNALING

DUSZYNSKI JERZY

Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

Mitochondria are crucial for a wide spectrum of cellular processes. Their involvement not only encompasses the energy metabolism, but also: apoptosis, cell growth, differentiation, movement, signaling and proliferation. Thus, any malfunction of mitochondria can have profound consequences for cell physiology. Severe mitochondrial malfunctions, leading to changes in $\Delta\Psi$, are termed the mitochondrial stress and trigger magnitude of cellular stress responses.

Cellular calcium metabolism and mitochondrial dynamics (balance of fusion/fission processes) are modified by the mitochondrial stress. Signaling from the mitochondria under a stress condition to nucleus (also known as retrograde signaling) affects expression of nuclear genes allowing for cell adaptation to impairment of mitochondrial functions. These adaptive changes can lead to an enhancement of mitochondrial mass and expression of a number of mitochondrial and nuclear genes encoding for mitochondrial proteins. Mitochondria-to-nucleus signaling can be mediated by a number of molecules and one of them are reactive oxygen species (ROS). The mitochondrial stress affects production of ROS. On the other hand, increased ROS level has been shown to be a causative factor of diseases associated with mitochondrial dysfunction.

In the lecture the current understanding of mitochondrial stress mechanism will be presented and results from recent publications of the Laboratory of Bioenergetics will be reviewed.

1. *Lebiedzinska M. et al.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2009. – **41**. – P. 1805–16.
2. *Lebiedzinska M. et al.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2009. – **486**. – P. 73–80.
3. *Kozielec K. et al.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2009. – **41**. – P. 2440–9.
4. *Wieckowski M. R. et al.* // *Nat. Protoc.* – 2009. – **4**. – P. 1582–90.
5. *Czyz A. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – **381**. P. 176–80.
6. *Nowis D. et al.* // *American Journal of Pathology.* – 2010. – **176**. – P. 2658–2668.
7. *Wojewoda M. et al.* // *Bioch. Biophys. Acta - Bioenergetics.* – 2010. – **1797**. – P. 890–896.
8. *Lebiedzinska M. et al.* // *Bioch. Biophys. Acta - Bioenergetics.* – 2010. – **1797**. – P. 952–960.
9. *Suski J. et al.* // *Current Drug Targets.* – 2010. – accepted.
10. *Kozielec R.* // *J. Physiol. Pharm.* – 2010. – accepted.

ОСОБЛИВОСТІ ФІЗІОЛОГО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕХАНІЗМІВ ТРОФІЧНОЇ, ФІТОХРОМНОЇ ТА ФІТОГОРМОНАЛЬНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ТЕМПІВ РОЗВИТКУ РОСЛИН

ЖМУРКО В. В., АВКСЕНТЬЄВА О. О., ЗУБРИЧ О. І.,
ЩОГОЛЄВ А. С., ЮХНО Ю. Ю.

Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: zhmurko@univer.kharkov.ua

Встановлено, що регуляція розвитку рослин різних фотоперіодичних груп за різної тривалості дня та озимих злаків за різних температурно-світлових умов здійснюється у взаємодії трофічних, фітогормональних та ензиматичних процесів. Нині у рослин ідентифіковані гени детермінації темпів і типу розвитку – *PPD* і *VRN* – у пшениці, *EE* – у сої та гени контролю синтезу фітохромів. Досліджуються та встановлені окремі аспекти молекулярних механізмів їхньої експресії. Разом з тим все ще не з'ясованим залишається питання про взаємозв'язок метаболічної (трофічної), фітогормональної, фітохромної та генетичної регуляції типу і темпів розвитку рослин, хоча *a priori* ці регуляторні механізми не можуть бути пов'язаними. З'ясуванню цього питання присвячені дослідження кафедри фізіології та біохімії рослин Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Рослинний матеріал – колекція майже ізогенних ліній (near isogenic lines) пшениці за генами *VRN* та *PPD* і сої за генами *EE*, а також сорти томатів, що генотипово різняться за рівнем РНУ А і В, вивчаються за польових, вегетаційних, лабораторних експериментів *in vivo* та *in vitro*. У дослідах виявлені наступні загальні закономірності. Залежно від стану окремих локусів генів (домінантний чи/або рецесивний) темпи переходу досліджуваних ізогенних ліній до генеративного розвитку змінюються (прискорюються або сповільнюються). Інтенсивність трофічних процесів – накопичення продуктів асиміляції (переважно вуглеводів), їхнє перетворення у азотовмісні спо-

луки та відтікання до меристем вища у тих у ліній, у яких генетично детерміновані прискорені темпи розвитку. У цих ліній зростає активність та вміст рiстактивуючих фiтогормонiв, але знижується рiстiнгiбуючих, змiнюється активнiсть низки оксидоредуктаз та ензимiв обмiну вуглеводiв. Активацiя фiтохромiв зумовлює змiни у темпах розвитку досліджених сортiв томатiв та вуглеводному обмiнi, якi мають генотипову специфiчнiсть. Вiрогiдно, що детермінацiя темпiв i типу розвитку генетичними системами реалiзується шляхом змiни у сiввiдношеннi трофiчних, фiтогормональних, ензиматичних процесiв, тобто фiзiолого-бiохiмiчнi та генетичнi механiзми регуляцiї розвитку рослин являють собою комплементарну систему.

СВІТЛОЗАЛЕЖНЕ ФОРМУВАННЯ МЕМБРАННОГО ПУЛУ БІКАРБОНАТУ У ФОТОСИНТЕЗУЮЧИХ МЕМБРАНАХ

ЗОЛОТАРЬОВА О. К., ПОЛИЩУК О. В., ПОДОРВАНОВ В. В.,
СЕМЕНИХИН А. В.

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ;

e-mail: membrana@ukr.net

Тилакоїдні мембрани містять досить велику кількість бікарбонату (до 1 мкмоль/мг хлорофілу), пов'язаного з мембранами з різною мірою міцності. Міцно пов'язаний бікарбонат абсолютно потрібний для збереження функціональної активності фотосистеми II (ФСII), розташованої у тилакоїдах. Його видалення призводить до інгібування реакцій перенесення електронів, як на донорній, так і на акцепторній стороні ФСII. Місцем локалізації міцно пов'язаного бікарбонату, згідно з даними цілого ряду робіт, є сайт у ФСII між первинним і вторинним пластохіноновими акцепторами QA і QB. Функціональна роль пулу слабозв'язаного HCO_3^- невідома.

Разом з мембранозв'язаним бікарбонатом тилакоїди і частки ФСII містять карбоангідразу (КА, карбонат-гідро-ліаза, EC 4.2.1.1.) – ензим, що каталізує реакцію гідратації CO_2 і зворотну реакцію дегідратації бікарбонату. КА в десятки тисяч разів прискорює встановлення рівноваги між формами вугільної кислоти, яка в розчині досягається дуже повільно. Метою роботи було визначення функціонального зв'язку між світлоіндукованим перенесенням протонів і формуванням мембранного пулу бікарбонату.

Об'єктом дослідження були хлоропласти класу «В», ізольовані з листя шпинату. Залежність швидкості поглинання CO_2 від освітлення визначали за допомогою інфрачервоного газового аналізу в ізольованій від атмосфери прозорій комірці за умов постійному потоці повітря з відомою концентрацією CO_2 (600 ppm).

Показано, що освітлення ізольованих тилакоїдів індукує поглинання CO_2 з газової фази над суспензією в кількості до 320 нмоль/мг хлорофілу. Процес починався одразу ж після початку освітлення і розвивався протягом 15–20 с. Після вимкнення світла в газову фазу вивільнялась кількість CO_2 , яка дорівнює поглинутій на світлі.

Виявлений ефект корелює з добре відомою реакцією світлозалежного поглинання протонів ізольованими хлоропластами (ΔH^+). Показано, що величина світлоіндукованого поглинання CO_2 контролюється активністю карбоангідрази (КА) і пригнічується інгібіторами КА – ліофільним етоксизоламідом та гідрофільним ацетазоламідом.

Результати дозволяють припустити, що кількість мембранозв'язаного бікарбонату в тилакоїдах та їхня фотохімічна активність залежать від активності тилакоїдної КА, яка бере участь у формуванні енергізованого стану хлоропластів.

ОКСИДАТИВНИЙ СТРЕС – УНІВЕРСАЛЬНИЙ МЕХАНІЗМ АДАПТАЦІЇ МЕТАБОЛІЗМУ ЗА УМОВ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ ПОШКОДЖУЮЧИХ ЧИННИКІВ

КАЛИМАН П. А.

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: Pavel.A.Kaliman@univer.kharkov.ua*

Дія на організм пошкоджуючих чинників оточуючого середовища різної фізичної та хімічної природи спричиняє зрушення рівноваги системи прооксиданти ↔ антиоксиданти у бік збільшення прооксидантів. У цьому разі відбувається виснаження вмісту низькомолекулярних антиоксидантів, гальмування ензимів антиоксидантного захисту та підвищення вмісту активних метаболітів оксигену (АМО). Останні гальмують ензими дихального ланцюга мітохондрій, що супроводжується зниженням рівня АТР та утворенням супероксиданіонрадикала (O^*). Крім того, АМО пошкоджують мембрани еритроцитів за рахунок чого вивільнюється гем – активний прооксидант. Частина гему знешкоджується гемопексином, а більшість молекул, завдяки ліпофільності, проникає в різні тканини, насамперед у стінки судин, печінку, нирки та інші, де активують вільнорадикальне окислення. Це супроводжується розвитком оксидативного стресу. За умов оксидативного стресу відбувається експресія ензиму – гемоксигеназа-1 (ГО-1), який вважається маркером оксидативного стресу. ГО-1 каталізує реакцію деградації гему, за рахунок чого зменшується вміст прооксиданту та утворюються активні антиоксиданти – білірубін, моноксид вуглецю та протеїн феритин. Білірубін являється пасткою вільних радикалів, а феритин зв'язує іони заліза, чим блокує їхню прооксидантну дію. АМО активують систему NO – NO-синтазу, яка продукує високореактивний оксид азоту (NO), що нітрозильє молекули гему і виводить його з окисно-відновних реакцій. Крім того, NO приймає участь у регуляції гемоксигеназної активності та активує розчинну форму гуанілатциклази, в результаті чого підвищується вміст цГМФ. Циклічний гуанозинмонофосфат активує цГМФ-залежні протеїнкінази, які діють протилежно цАМФ-залежним протеїнкіназам і регулюють активність ензимів адаптації метаболізму. Система гуанілатциклаза-цГМФ реалізує ефекти дії Са-кальмодуліна і системи фосфоліпаза С – інозитол-3-фосфат, які забезпечують адаптацію метаболізму у разі оксидативного стресу.

У доповіді будуть приведені механізми адаптації метаболізму за оксидативним стресом, зумовленим різними чинниками пошкоджуючої дії.

**POSSIBLE CONNECTION OF *pttg-1* GENE
TO 5Q SYNDROME IN HUMAN***KANYUKA O., AFANASYEF S., FILYAK Ye., STOIKA R.**Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: yevhenfilyak@cellbiol.lviv.ua*

Pituitary tumor transforming gene-1 is known to induce malignant transformation of pituitary cells and found to be overexpressed in many types of tumors. *Pttg-1* is also believed to be involved in activation of anaphase-checkpoint during the mitosis. Knockout of *pttg-1* gene caused thrombocytopenia and disproportion of CD4/CD8 lymphocytes in blood. In human, *pttg-1* gene is located in 5q35.1 (Entrez Gene, HGNC) or 5q33.3 (Ensembl) locus. Deletion of q arm of 5th chromosome, in human leads to myelodysplasia 5q syndrome. This syndrome is characterized by myelodysplastic changing in blood cells concentration and development of autoimmune disorders. Patients with 5q syndrome often die from cancer. It is known that 5q-syndrome develops if deleted 5q31-33 locus, but the molecular explanation of the importance of 5q31-33 locus in development of 5q syndrome was not revealed.

We showed that deletion of *pttg-1* gene can induce myelodysplastic changes and autoimmune disorders in mice similar to 5q syndrome in human. In particular, we found that *pttg-1* knockout in mice leads to a decrease in erythrocytes, thrombocytes and neutrophils number in the blood. However, lack of this gene caused an increase in erythrocytes degradation and elevation of bilirubin concentration in the blood, accompanied with compensatory 100% increase in erythrocytes production and doubling number of young erythrocytes in the blood.

We also found that blood of *pttg-1*-knockout mice contain high level of anti-dsDNA antibodies, while amount of anti-ssDNA and antibodies against simple negatively charged compounds were not high. We discovered, that in *pttg-1* knockout mice anti-dsDNA antibodies are increased owing to 200% elevation of low-affinity anti-dsDNA antibodies, while the level of high affinity anti-DNA antibodies was comparable to that in the blood of wild type mice. Investigation of cancer receptivity of *pttg-1* knockout mice is in progress.

Summarizing, obtained by us results suggest the deletion of *pttg-1* gene to cause autoimmune disorders and myelodysplasia symptoms in mice, similar to 5q syndrome in human. The obtained data drives at functional connection of *pttg-1* deletion and development of 5q syndrome in human.

**ДОНОР ОКСИДА АЗОТА ВЫЗЫВАЕТ
КАЛЬЦИЙЗАВИСИМОЕ УСИЛЕНИЕ ГЕНЕРАЦИИ
СУПЕРОКСИДА КОЛЕОПТИЛЯМИ ПШЕНИЦЫ
И ПОВЫШЕНИЕ ИХ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ**

КАРПЕЦ Ю. В., КОЛУПАЕВ Ю. Е.

*Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, Украина;
e-mail: plant_biology@mail.ru*

В последние годы накапливаются сведения об участии монооксида азота (NO) в формировании ответных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Несмотря на установленную связь между NO, активными формами кислорода (АФК) и кальцием как участниками трансдукции клеточных сигналов, сообщается, что некоторые физиологические реакции растений, индуцируемые экзогенным оксидом азота, могут реализоваться без участия АФК и кальция как внутриклеточных посредников (Lu *et al.*, 2005; Saurtois *et al.*, 2008). Целью нашей работы явилось изучение влияния донора NO нитропруссид натрия (НПН) на теплоустойчивость coleoptiles пшеницы и возможного участия АФК и ионов кальция как посредников в реализации эффектов экзогенного NO.

Отрезки coleoptiles, отделенные от 4-сут. этиолированных проростков пшеницы сорта Элегия, переносили на 2%-ый раствор сахарозы (контроль) либо на раствор сахарозы с добавлением НПН (0,5 мМ). В отдельных сериях экспериментов coleoptiles обрабатывали скавенджером NO метиленовым синим (5 мкМ), антиоксидантом ионолом (бутилгидрокситолуол, 5 мкМ), неспецифическим блокатором кальциевых каналов хлоридом лантана (400 мкМ) либо антагонистом кальмодулина хлорпромазином (5 мкМ). После 24–25 ч инкубации coleoptiles на растворах исследуемых эффекторов часть отрезков каждого варианта подвергали потенциально летальному нагреву в водном термостате при температуре 43 °С в течение 10 мин и через 3-ое сут. оценивали их выживание.

Обработка coleoptiles НПН приводила к значительному усилению генерации ими супероксидного анион-радикала. При этом под действием донора NO происходило повышение устойчивости coleoptiles к повреждающему нагреву. Метиленовый синий, ионол, хлорид лантана и хлорпромазин в значительной степени уменьшали усиление генерации супероксида и снижали эффект повышения теплоустойчивости coleoptiles пшеницы, вызываемый действием донора NO. Сделано заключение о том, что индуцирование теплоустойчивости coleoptiles при действии экзогенного NO происходило при посредничестве АФК и ионов кальция как внутриклеточных мессенджеров.

**СИНТЕЗ РЕГУЛЯТОРІВ ПОРИ МРТР
У МІТОХОНДРІЯХ СЕРЦЯ ЩУРІВ ЗА НОРМИ
І ПАТОЛОГІЇ ТА КАРДІОПРОТЕКТОРНА ДІЯ ГОРМОНІВ
ЕКДИСТЕРОНУ І МЕЛАТОНІНУ**

КОЦЮРУБА А. В., КОРКАЧ Ю. П., САГАЧ В. Ф.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ruba@biochem.kiev.ua*

Відомо, що потужними ендogenousними регуляторами проникливості мітохондріальної пори перемінної провідності (МРТР) є, серед інших, активні метаболіти кисню (АФК) та азоту (АФА). Широко відомими є шляхи генерації АФК, тоді як менш дослідженими є шляхи генерації АФА. Встановлено молекулярні, біохімічні та фізіологічні механізми регуляції синтезу оксиду азоту (NO) активними формами кисню (супероксиданіон, пероксид водню), регуляції експресії генів і активності ензимів різних ізоформ NOS та ензимів біосинтезу їхніх коензимів (тетрагідробіоптерин, NADPH, FAD, FMN), необхідних для роботи цих ензимів. Водночас на сьогоднішній день не проведено жодного комплексного дослідження по одночасному вивченню активностей всіх відомих шляхів синтезу NO за різних фізіологічних умов. Метою даної роботи стало вивчення особливостей синтезу АФК та АФА у мітохондріях серця щурів різного віку за нормальних фізіологічних умов, після тривалих фізичних навантажень, а також за різних патологічних станів – за діабету I типу та за хвороби Паркінсона.

Досліджували інтенсивність генерації вільних радикалів кисню ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ -радикал) і біохімічні показники, що характеризують інтенсивність окисного метаболізму L-аргініну (*de novo* синтез NO) у мітохондріях серця – активність різних ізоформ NO-синтаз і нітратредуктази (реутилізаційний синтез NO), мітохондріальні пули стабільних метаболітів NO – нітрит- і нітрат-аніонів, низько- і високомолекулярних нітрозотіолів, а також активність неокисного аргіназного метаболізму L-аргініну шляхом визначення активності мітохондріальної аргінази і мітохондріальних пулів сечовини. З метою виявлення джерела супероксиду оцінювали мітохондріальні пули сечової кислоти, як маркера активності ксантиноксидази у мітохондріях, що генерує супероксид одночасно із окисненням гіпоксантину і ксантину.

Встановили, що АФК і пероксинітрит – активують МРТР, тоді як NO синтезований cNOS, але не iNOS чи шляхом реутилізації, навпаки, інгібує МРТР. Досліджені гормони чинять свою кардіопротекторну дію в т.ч. шляхом регуляції синтезу АФК та АФА у мітохондріях за рахунок проявів антиоксидантної дії та дії на різні шляхи біосинтезу NO – вони стимулюють конститутивний *de novo* синтез NO в мітохондріях і, навпаки, інгібують його індукцибельний синтез *de novo*.

ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ ФОСФОЛІПАЗИ D. ЇЇ РОЛЬ В СИГНАЛІЗАЦІЇ ЛІПІДІВ ТА РЕГУЛЯЦІЇ МЕТАБОЛІЗМУ КЛІТИН ЕВКАРІОТ

КРАВЕЦЬ В. С.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua

Фосфоліпаза D (ФЛД) була вперше виявлена у рослин і лише потім у тварин, грибів та бактерій. ФЛД гідролізує структурні фосфоліпіди мембран клітин – по фосфоефірному зв'язку, утворюючи вільні водорозчинні сполуки (холін, етанол-амін, гліцерол та N-ацилетаноламін відповідно) та фосфатидну кислоту (ФК), яка є важливим медіатором регуляції метаболізму клітин.

В клітинах тварин виявлено лише два гени ФЛД, які забезпечують експресію двох ізоформ – ФЛД1 та ФЛД2. Для рослин характерна наявність значно більшої кількості ензимів, так у *Arabidopsis thaliana* L. клоновані та досліджені 12 генів цього ензиму, які кодують різні молекулярні форми ФЛД – ФЛД α (3), ФЛД β (2), ФЛД γ (3), ФЛД δ , ФЛД ϵ та ФЛД ζ (2). У геномі рису міститься 17 генів ФЛД. Для ФЛД клітин тварин та рослин характерна модульна структура, у якій виділено сайти, відповідальні за каталіз та регуляторні послідовності. Серед яких описані домени зв'язування G-протеїнів, ліпідів (PX, PH) та іонів кальцію – C2. У *Arabidopsis* 2 з 12 ізоензимів ФЛД – ФЛД ζ 1 та ФЛД ζ 2 – містять на N-кінці домен – (PX) та домен (PH), тоді як для інших 10 ізоензимів характерний домен C2. Домени PX та PH відіграють роль в транслокації протеїнів до мембран та сигналізації поліфосфоінозитидів. Афіність ФЛД до поліфосфоінозитидів вказує на тісну взаємодію ФЛД та ФЛС, яка найбільш виражена у ФЛД β , висока у ФЛД γ та найнижча – у ФЛД α .

Нами проведено аналіз структури та функцій ФЛД клітин рослин та експериментально встановлено, в досліджах *in vivo*, з використанням [³³P]-ортофосфату, роль ФЛД у реалізації дії фітогормонів та її участь у формуванні сигналів за дії ряду стресів на клітини рослин.

Дослідження проведені за підтримки грантів: ДФФД України – ДФФД Білорусі (грант № Ф29.4/020) та НАН України – РФФД (Російська федерація) (5/1-09).

ТЕОРІЯ ОКИСЛЮВАЛЬНОГО СТРЕСУ: ВІД БАКТЕРІЙ ДО ЛЮДИНИ

ЛУЩАК В. І.

Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lushchak@pu.if.ua

У 1950-х роках вільні радикали (ВР) були знайдені в живих організмах і постульована їхня роль у розвитку певних патологій і старіння. Спочатку вони розглядались лише як пошкоджуючі агенти. Коли згодом була описана супероксиддисму-

таза, виявилось, що рівень вільних радикалів може регулюватись організмом. Мало того, було показано, що вільні радикали можуть виконувати захисну і сигнальну функції. В організмі існує баланс між інтенсивністю генерації і елімінації вільних радикалів. У 1985 році Г. Сіес запропонував гіпотезу окислювального стресу згідно з якою стрес виникає у результаті порушення балансу між про/антиоксидантами на користь антиоксидантів. На початку 1990-х років були відкриті кілька регуляторних шляхів, у яких задіяні АФК. Зараз під окислювальним стресом розуміють “тимчасове або хронічне збільшення стаціонарної концентрації активованих форм кисню, яке призводить до зміни клітинного метаболізму і передачі сигналів, зокрема з допомогою АФК через модифікацію клітинних компонентів аж до загибелі клітини шляхом некрозу і апоптозу”. Розвиток окислювального стресу описаний у бактерій, грибів, рослин і тварин. У відповідь на дію окислювального стресу розвивається адаптивна відповідь. Зазвичай це підвищення захисного потенціалу, яке регулюється на рівні транскрипції певних генів. Самі АФК мають невисоку специфічність. Проте, завдяки існуванню специфічних сенсорів система набуває специфічності. Сприйняття сигналу окислювального стресу, зазвичай, відбувається через окислення специфічних протеїнів, а точніше – їхніх цистеїнових залишків чи інших груп, до складу яких входить сірка. У бактерій описані системи SoxRS і OxyR, які координують адаптації до супероксидного аніону і пероксиду водню відповідно. У дріжджів відомі системи Yap1, Sku7, Msn2/4, MAR-кіназ. У рослин відкриті координатори відповіді на стрес, такі як NF-κB, AP-1, MAP-кінази, Rap2.4a NPR1/TGA, а у тварин як NF-κB, AP-1, MAP-кінази, Keap1/Nrf2. Тому зрозуміло, що, незважаючи на певні особливості відповіді, між різними філогенетичними групами існує багато спільного. Останнє дає добрий фундамент для вивчення основних процесів відповіді на окислювальний стрес у простіших і дешевших у дослідженні організмів, а отримані результати екстраполювати на складніше організованих тварин і рослин.

ИНИЦИИРОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА КОЭНЗИМА А В ЦНС

*МОЙСЕЁНОК А. Г., ГУРИНОВИЧ В. А.,
КАТКОВСКАЯ И. Н., БАДУН Г. А.*

*Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, Гродно;
e-mail: val@biochem.unibel.by*

Участие коэнзима ацетилювання (КоА) в процесі енергообеспечення нейронів, біосинтезі фосфоліпидних компонентів нейромембран і ацетилхоліна, наряду со вновь виявленными свойствами системы биосинтеза КоА в регуляції рівня глутатиона і редокс-статуса і -сигналізування, предполагають нейропротекторные свойства предшественников КоА – производных пантотеновой кислоты (ПК) и патогенез синдрома «Pantothenate Kinase associated neurodegeneration». Механізми і предпочтения использования предшественников КоА (ПК, пантеин – ПТ, пантенол – ПЛ, 4'-фосфо-ПК – ФПК) в инициировании биосинтеза коэнзима в головном мозгу остаются неизученными.

Разработана радиометрическая модель изучения транспорта и биотрансформации производных ПК в ЦНС (синтез [³H]-радионуклидов осуществлен в МГУ

методом термической активации трития) после их внутрибрюшинного введения белым крысам.

При введении препаратов ПК в дозе 1,1 мКи/кг на период от 5 мин до 12 ч выявлен активный транспорт (захват) обоих форм предшественников КоА в больших полушариях мозга, достигающий максимума к 180 мин (введение ПТ) и к 12 ч (введение ПК). Введение ПТ сопровождалось накоплением радионуклидов преимущественно в постмитохондриальной фракции, где основной формой, идентифицированной методом ВЭЖХ, была ФПК. Доминирующим метаболитом хлорнокислых экстрактов митохондрий была ФПК и, вероятно, дефосфо-КоА. Введение [³H]-ПК приводило к биотрансформации радионуклида до КоА, фракция которого через 30 мин достигла 46%, а через 12 ч 72% общего уровня радиоактивности, тогда как депонирования радионуклида во фракции ФПК и фосфопантетеина митохондрий и постмитохондриального супернатанта не происходило. Можно полагать, что введение ПТ приводит к накоплению ФПК, а введение ПК – к образованию КоА в структурах головного мозга.

Выявлено быстрое проникновение ПЛ в структуры мозга и его трансформация в ПК и ФПК. Зарегистрирован высокий уровень захвата предшественников биосинтеза КоА в гиппокампе, на срезе которого ФПК идентифицирован как основной метаболит при введении [³H]-ПТ.

Обсуждается вопрос о роли пула ФПК и предпочтительность ксенобиотического производного ПК – пантенола в иницировании биосинтеза КоА в ЦНС.

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ АДАПТОГЕННОЇ ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ СПОЛУК У КЛІТИНАХ РОСЛИН ЗА УМОВ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

ПАЛЛАДИНА Т. О., РИБЧЕНКО Ж. І., КОНТУРСЬКА О. О.

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: tatiana_palladina@ukr.net*

Глобальні зміни клімату посилюють негативний вплив на рослини екологічних факторів, зокрема засолення, яке зараз швидко поширюється, особливо на зрошуваних ґрунтах. Виникнення стану сольового стресу в рослинних клітинах відбувається через посилення процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і порушення осмотичного та іонного гомеостазу, до яких додається токсична дія Na⁺, який є головним катіоном солей, що утворюють засолення. Відсутність потреби рослин у Na⁺ пояснюється функціонуванням у плазмалемі їхніх клітин не Na⁺-насоса, як у тваринних, а H⁺-насоса, причому видалення Na⁺ з цитоплазми назовні та до вакуолярного простору здійснюється вторинно-активними Na⁺-H⁺-антипортерами. Радикальної солестійкості рослин вдається досягти шляхом вбудови в їхні геноми чужорідних генів, які кодуєть протеїни більш потужних Na⁺-H⁺-антипортерів та їх регуляторів.

У той же час існує можливість посилення солестійкості рослин за допомогою біоактивних сполук. Порівняння солепротекторної спроможності препаратів «Метіур» та «Івін» виявило перевагу першого з них, ефект якого зберігається про-

тягом усієї вегетації. З'ясування механізму дії цих сполук, які застосовувалися шляхом обробки ними насіння, здійснене на проростках кукурудзи, експонованих на NaCl, показало їхню здатність послаблювати процеси ПОЛ шляхом активації ензимів антиоксидантного захисту, зокрема ензимів глутатіон-аскорбатного циклу, та запобігати порушенню осмотичного та іонного гомеостазу клітин. Результати експериментів, проведених на препаратах плазматичних та вакуолярних мембран, ізольованих з коренів проростків, продемонстрували спроможність зазначених сполук активувати в них H^+ -насоси, особливо їх H^+ -транспортну функцію, що посилює роботу вторинно-активних Na^+ - H^+ -антипортерів. Крім того було показано, що обробка цими препаратами нормалізувала ліпідний склад плазматичної мембрани клітин коренів проростків, який порушувався в присутності NaCl. В системі *in vitro* показано, що препарат «Метіур», на відміну від «Івіну», виявляє антиоксидантні властивості за антирадикальним механізмом. Обговорюється залежність адаптогенного ефекту біоактивних сполук від хімічної будови, а також можливість їхньої дії на генетичному рівні.

KEY STAGES OF THIAMINE METABOLISM THAT ARE MOST SIGNIFICANT FOR THE VIABILITY OF NERVE CELLS

*PARKHOMENKO Yu. M., STROKINA A. A., CHORNII S. A.,
STEPANENKO S. P., CHEKHOVSKAYA L. I.*

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua*

The high sensitivity of nerve cells to deficiency of vitamin B_1 (thiamine) could not be explained in terms of coenzyme function of thiamine diphosphate (ThDP), so a search of noncoenzymic mechanisms participation of this vitamin in cellular metabolism was initiated by. Based on analysis of the results of own studies and literature data, the authors propose an original hypothesis about the molecular mechanisms by which thiamine and its biologically active derivatives are involved in a specific function of nerve cells. The hypothesis is based on the notion about the existence of mobile pool of thiamine and its biologically active derivatives in the nerve endings, the potential-dependent circulation of the latter between intracellular space and presynaptic gap, and coupling of mobile pool of thiamine and metabolism of acetylcholine (AcCh). Modulating noncoenzymic action of thiamine phosphates on the activity of pyruvate dehydrogenase complex and, consequently, the synthesis of acetyl-CoA (the limitative substrate in synthesis of AcCh) has been shown previously. Further experimental studies confirm the basic provisions of the hypothesis. The purpose of this study was to identify metabolic stages dependent on vitamin B_1 that are critical for the survival of nerve cells, in particular, the role in cell survival coenzymic and noncoenzymic mechanisms of thiamine participation in cellular metabolism.

As one of the methodological approaches, the derivatives of thiamine showing the properties of antagonists or agonists of thiamine, as well as compounds negative effect of which on the metabolism of thiamine shown previously (ethanol, acetaldehyde) have been

used in studies. We believe that a comparative analysis of results of the action of these derivatives on thiamine-dependent biochemical reactions and cells survival would provide an opportunity to answer the question, that from thiamine-dependent processes are most sensitive to its deficit. Taking in account the above, in their studies, we have focused on parameters such as absorption and binding of thiamine by isolated nerve terminals (synaptosomes), thiamine-binding and thiamine triphosphatase activity of thiamine-binding protein of plasma membrane of synaptosomes, activity of thiamine kinase (EC 2.7.6.2) - an enzyme responsible for synthesis of ThDP, activity of ThDP-dependent enzymes, in particular - PDC.

A comparison of kinetic parameters of inhibition by antagonists of thiamine (amprolium, oxythiamine, pirythiamine) of processes of thiamine metabolism in the nerve cells and action of these derivatives on the survival of neuronal cells show that the critical link, inhibition of activity which initiates cell death is thiamine-binding protein of plasma membrane.

МЕТАБОЛИЗМ ТИАМИНА КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ТИАМИНЗАВИСИМЫХ ЭНЗИМОВ

ПЕТРОВ С. А.

*Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: sergey1951@sana.od.ua*

Метаболизм тиамин в организме изучен недостаточно. Основное внимание исследователей уделялось процессам фосфорилирования этого витамина. Работ, посвященных его катаболизму, очень мало. В связи с этим, целью нашего исследования – детально изучить процессы метаболизма этого витамина и выявить его биологически активные катаболиты.

Работа проведена на крысах-самцах линии Вистар весом 170–200 г с использованием $2C^{14}$ -тиамина. В результате исследований было выявлено 22 катаболита тиамин, которые образовались в трех независимых направлениях катаболизма: тиаминазном, окислительном и тиол-дисульфидном. Конечными продуктами, которые были обнаружены в наибольших количествах, являлись соответственно: 4-метил-5β-оксиэтилтиазол, тиохром и смешанные дисульфиды. Количество этих катаболитов в тканях было тем большим, чем выше была доза вводимого тиамин.

Наиболее существенно увеличивалось количество тиохрома, менее значимо увеличивалось количество смешанных дисульфидов тиамин, и в наименьшей степени повышалось количество 4-метил-5β-оксиэтилтиазола.

Параллельно с уровнем катаболитов тиамин определялось содержание ТДФ и активность ПДК, 2-ОГДК и транскетолазы. Было установлено, что активность этих энзимов повышалась при введении тиамин только в относительно низких дозах. Увеличение дозы выше 10 мг/кг массы приводило к снижению активности ПДК и 2-ОГДК. Аналогичный эффект наблюдали при введении тиохрома. Введение тиаминпропилдисульфида в дозе 20 мг/кг массы снижало активность транскетолазы.

Полученные данные позволяют предположить, что введение тиамин в высоких дозах приводит к его усиленному катаболизму, что, в свою очередь, предотвращает аномально высокую активацию тиаминзависимых энзимов за счет их ингибирования образующимися катаболитами.

THE ADAPTOR PROTEIN RUK/CIN85 IS INVOLVED IN REGULATION OF HYPOXIA-INDUCED PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1) GENE EXPRESSION

¹SAMOYLENKO A., ²DIMOVA E., ¹KOZLOVA N., ¹MARCHENKO S.,
²KIETZMANN T., ¹DROBOT L.

¹*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*University of Kaiserslautern, Germany;
e-mail toljas@yahoo.com*

High levels of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) indicate an enhanced risk of ischaemic/hypoxic cardiovascular events and a poor prognosis. The expression of PAI-1 can be induced by various stimuli including hypoxia, insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1). The hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is critical for hypoxia or insulin/IGF-1 mediated PAI-1 induction, but the components involved in merging the signals are not known so far. The adaptor/scaffold protein Ruk/CIN85 may be a candidate since it plays important roles in the regulation of processes associated with cardiovascular and oncological diseases such as downregulation of receptor tyrosine kinases, apoptosis, adhesion and invasion. Therefore, it was the aim of this study to investigate the involvement of Ruk/CIN85 in regulation of PAI-1 expression. MCF-7 breast adenocarcinoma cells that either stably or transiently overexpress Ruk/CIN85 were used as a model.

It was found that Ruk/CIN85 induced PAI-1 mRNA and protein expression both under normoxia and hypoxia. The induction of PAI-1 expression by Ruk/CIN85 occurred at the transcriptional level since the half-life of PAI-1 mRNA was not affected in cells overexpressing Ruk/CIN85 and reporter gene assays using wild-type and mutant human PAI-1 promoter luciferase constructs showed that the hypoxia-responsive element was responsible for Ruk/CIN85 effects. Further, knocking down HIF-1 α abolished not only the hypoxia-dependent but also the Ruk/CIN85-dependent PAI-1 induction. In addition, transient or stable overexpression of Ruk/CIN85 also induced HIF-1 α protein levels and HIF-1 activity and knocking down Ruk/CIN85 reversed these effects. Thereby, Ruk/CIN85 interfered with the proline hydroxylation-dependent HIF-1 α protein destabilisation. Together, these results provide the first evidence that Ruk/CIN85 induces PAI-1 expression via modulation of HIF-1 α stability.

УЧАСТЬ ВУГЛЕВОДІВ У ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСАХ

СЕМЧИШИН Г. М.

Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: semchyshyn@pu.if.ua

Останнє десятиліття характеризується своєрідним вибухом у дослідженні біології оксидативного стресу у галузях біохімії, медицини, а також екології та еволюції. Це зумовлено тим, що при перевищенні стаціонарної концентрації активних форм та зростанні інтенсивності вільнорадикальних процесів організм зазнає стресу. Відомо, що вільні радикали задіяні у патогенезі багатьох захворювань та можуть прискорювати процеси старіння.

Інтенсивність вільнорадикальних процесів та окислення істотно залежить від швидкості метаболізму, зокрема вуглеводів. Добре відомо, що дієта ссавців, багата на вуглеводи, призводить до розвитку багатьох захворювань та ускладнень. Оксидативний стрес та процеси окислення вважаються однією з ймовірних причин виникнення таких станів. Проте, на відміну від протеїнів, ліпідів та нуклеїнових кислот, зв'язок між обміном вуглеводів та вільнорадикальними процесами вивчений недостатньо.

У наших експериментах, проведених в системах *in vivo* та *in vitro*, показано, що обмін вуглеводів тісно пов'язаний з вільнорадикальними процесами окислення. Зокрема, встановлено, що репродуктивна здатність, метаболічна активність пекарських дріжджів, а також рівень активованих форм та відповідь дріжджів на оксидативний стрес залежить від джерела вуглеводів та їхньої концентрації у середовищі культивування. Протягом тривалого культивування у середовищах з низькими концентраціями вуглеводів, дріжджі демонстрували вищу репродуктивну здатність та виживання, на відміну від клітин, які росли у присутності високих концентрацій вуглеводів. Незалежно від концентрації вуглеводів, здатність утворювати колонії на твердому живильному середовищі була нижчою у дріжджів, які вирощувались на фруктозі, порівняно з тими, які росли на глюкозі. Водночас, рівень карбонільних груп протеїнів та інтенсивність флуоресценції, які вважаються надійними індикаторами оксидативного стресу, були вищими у клітинах, які росли на фруктозі. Отримані нами результати свідчать про різну інтенсивність вільнорадикальних процесів у клітинах пекарських дріжджів, вирощених на різних вуглеводах. На відміну від дріжджів, які росли на глюкозі, клітини, які культивували на фруктозі, демонстрували вищий рівень активованих форм та більшу інтенсивність окисних процесів.

UNIVERSAL ROLE OF MOLECULAR CHAPERONS IN REGULATION OF STRESS-INDUCED SIGNALLING IN CARDIOMYOCYTES

SIDORIK L. L.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: sidorik@imbg.org.ua*

Heart failure is a leading cause of death in developed countries, which has been described as a “health epidemic” of the 21st century.

Cardiomyocytes respond to stress by induction of cell death program – apoptosis or necrosis depending on a subset of regulatory proteins involved (such as molecular chaperons (HSPs), Bcl-2 family of proteins, growth factors, calcium and oxidants) and on the balance between biosynthesis and degradation of proteins within the cell. The usual adaptive response of cardiomyocytes to stress lead to heart remodeling and to heart failure progression which is linked with development of the programmed cell death - apoptosis. Apoptosis in cardiomyocytes differs at morphological and biochemical levels from other types of cell. During the last decade the numerous data accumulated have supported the idea of a close link between apoptosis and autoimmunity. Cell death manifested in cardiomyocytes loss could be a major pathogenic factor in heart failure development and induction of pathologic autoimmunity which is characteristic of such pathology progression.

We studied the expression and cellular localization of abundant cytoplasmic (Hsp70, Hsp90) and mitochondrial (Hsp60) chaperons in the acute phase (myocarditis - MC) and chronic phase (dilated cardiomyopathy - DCM) of heart failure. The experimental mouse models of DCM-like and MC-like pathologies developed in our Laboratory allow to study the peculiarities of HSPs expression at heart failure progression in dynamics .

The significant changes of Hsp70 and Hsp60 expression levels have been observed by Western-blot and RT-PCR analysis in cardiomyocytes from DCM affected heart in comparison with MC-affected and normal ones. Besides, we revealed a cellular re-localization for Hsp60, Hsp90 and *in vivo* Hsp60-Bax and Hsp60-p70S6 kinase complexes formation in DCM-affected hearts which could be linked with altered regulation of stress-induced signal pathways of cardiomyocytes at heart failure development.

The results obtained taken together with recently published data concerning antiapoptotic role of cytosolic cardiac Hsp60 and Hsp70 and the role of Hsp90 in regulation of ubiquitin-proteasome degradation of proteins allow to propose a working hypothesis about possible involvement of HSPs at heart failure origin and progression.

The future perspectives of the investigation of HSPs regulatory role in stress-induced cardiomyocytes signaling linked with heart failure progression and new therapeutic strategies based on such researches will be discussed.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ ГИДРОБИОНТОВ
К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ ФОРМАМ
ГИПОКСИИ И АНОКСИИ**

*СОЛДАТОВ А. А., АНДРЕЕНКО Т. И., ПАРФЕНОВА И. А.,
НОВИЦКАЯ В. Н.*

*Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского
НАН Украины, Севастополь;
Севастопольский национальный технический университет, Украина;
e-mail: alekssoldatov@yandex.ru*

В условиях эксперимента исследовано состояние молекулярных систем транспорта и утилизации кислорода, особенности тканевого и клеточного метаболизма у морских рыб и моллюсков, обитающих в гипоксических и аноксических акваториях Черного моря.

Установлено, что дыхательная цепь митохондрий донных видов рыб, устойчивых к внешней гипоксии имеет нескомпенсированный тип организации с явным преобладанием содержания цитохромов терминальной группы – *aa3*. В их клеточных системах в условиях экстремально низких P_{O_2} отмечено сбалансированное угнетение метаболических и мембранных функций. Это выразилось в снижении активностей Na^+, K^+ -АТФ-азы и гексокиназы при сохранении основных показателей жизнеспособности клеток: градиентов по Na^+ и K^+ на мембране и внутриклеточной концентрации АТФ.

В гемоглобиновой системе бычка-кругляка (*Neogobius melanostomus* P.) устойчивого к экстремальным формам гипоксии, выявлена фракция с ранее не описанными функциональными свойствами. Она обладала одновременно высоким сродством к кислороду (P_{50} $7,74 \pm 0,98$ гПа при рН 8,3) и повышенной чувствительностью к рН (эффект Бора $-0,81 \pm 0,09$ при рН 8,3→7,5). При закислении инкубационной среды (рН 8,3→7,5) отмечали также снижение насыщения ее кислородом на $12,8 \pm 1,4\%$ (эффект Рута). В условиях экспериментальной гипоксии содержание данной фракции в крови повышалось на 41,8% ($P < 0,001$).

В условиях экспериментальной аноксии в тканях толерантных к дефициту O_2 моллюсков наблюдается снижение содержания протеина, рост уровня свободных аминокислот и мочевины. Гидролизу подвергаются преимущественно низкомолекулярные пептиды. Об этом свидетельствует уменьшение активности катепсина D на фоне роста активности γ -ГТП. Аноксия сопровождается ростом значений индекса МДГ/ЛДГ, что определяется существенным понижением активности ЛДГ. Это происходит на фоне усиления сукцинаттиокиназной и фумаратредуктазной реакций, контролируемых аланин- и аспаратаминотрансферазами. Они исключают накопление лактата в тканях и позволяют получать дополнительный ресурс макроэргов. Метаболические процессы в гепатопанкреасе моллюсков ориентированы на продукцию аминокислот.

АКТИВАЦІЯ КЛІТИННИХ СІАЛІДАЗ ПІД ЧАС АПОПТОЗУ

ТОМІН А. М., СТОЙКА Р. С., БІЛИЙ Р. О.

*Інститут біології клітини НАН України, Львів;
e-mail: amtomyn@gmail.com*

Як було показано нами раніше (Bilyu *et al.*, Autoimmunity, 2007), у плазматичній мембрані апоптичної клітини змінюється співвідношення експонованих вуглеводних залишків, а саме зростає кількість поверхневих β -галактозильних та α -маннозильних залишків за одночасного зменшення кількості термінальних сіалових кислот внаслідок підвищення рівня сіалідазної активності. У цьому дослідженні ми виявили ензим, відповідальний за даний процес, а також встановили шляхи його активації під час апоптозу. Показано, що тотальна нейрамінідазна активність зростає в апоптичних клітинах порівняно з інтактними. Після фракціонування лізатів клітин цю активність виявлено у фракції плазматичних мембран, а саме, серед інтегральних протеїнів плазмалеми. Нейрамінідазну активність визначали, використовуючи флуорогенний субстрат 4-метилумбеліферил- α -D-N-ацетилнейрамінат натрію, який при дії екзо- α -сіалідаз утворює флуоресцентний продукт. Проаналізовано вплив на нейрамінідазну активність антитіл до відомих еукаріотичних сіалідаз (Neu1, Neu2, Neu3 та Neu4). Встановлено, що антитіла до Neu3 та Neu4 пригнічують зростання нейрамінідазної активності апоптичних клітин. Крім того, у Neu3 та Neu4 виявлено можливі трансмембранні домени і сайти розщеплення каспазами. Інкубація клітин з пан-каспазним інгібітором z-VAD-fmk запобігала зростанню нейрамінідазної активності за умов апоптозу, що вказує на участь каспаз у даному процесі. Для встановлення шляхів активації нейрамінідаз використано активні форми каспаз та їхніх інгібіторів (BD Bioscience). Показано, що додавання каспаз 3 і 8 спричиняє в інтактних клітин таке ж за рівнем зростання нейрамінідазної активності, що й індукція апоптозу, тоді як каспаза 7 такого впливу не проявляє. Інгібування каспаз 3, 8 чи 9 призводить до зниження рівня сіалідазної активності за умов індукції апоптозу.

Таким чином, під час апоптозу відбувається каспазозалежна активація клітинних сіалідаз Neu3 та Neu4, за участі каспаз 3 та 8, і це призводить до появи десіалованих глікопротеїнів на поверхні апоптичних клітин.

Автори вдячні за фінансову підтримку в рамках гранту WUBMRC та Німецько-Українського двостороннього гранту UKR 08/035, а також проф. Мартіну Герману (Ерланген, Німеччина) за сприяння проведенню досліджень в рамках даної роботи.

РЕГУЛЯЦІЯ ТІОЛВМІЩУЮЧИМИ СПОЛУКАМИ АКТИВНОСТІ КАТЕПСИНУ L У НИРКАХ БЛИХ ЩУРІВ

УСТЯНСЬКА О. В., ШВАРЦОВА О. В., ПЕТРОВ С. А.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Україна;
e-mail: ustjansky_olga@ukr.net

Катепсини відіграють особливу роль у системі протеолітичних ензимів клітини, оскільки являються протеазами, які розпочинають процес деградації протеїнів. Механізми їхньої регуляції вивчені недостатньо. Зважаючи на те, що ці ензими є тіоловими протеазами, ми вирішили вивчити їхню можливу регуляцію тіолвміщуючими сполуками.

Серед досліджених сполук (цистин, цистеїн, глутатіон, ліпоева кислота, тіамін, бенфотіамін, тіохром) жодна, крім тіаміну та його похідних, не впливала на активність ензиму.

Тіамін та його похідні суттєво збільшували досліджуваний показник.

Для остаточного з'ясування механізму активаційної дії тіаміну та його похідних, ми вивчили стан SH- і SS-груп катепсину під час взаємодії з вищезгаданими тіоловими сполуками. Слід відмітити, що у молекулі нативного ензиму значно більше SS-груп, порівняно з SH-групами. Серед усіх вивчених сполук тільки тіамін суттєво зменшує кількість вільних SH-груп у ензимі, очевидно, за рахунок взаємодії цього вітаміну з вільними SH-групами активного центру.

Таким чином, серед усіх досліджених тіолвміщуючих сполук активатором катепсину L може вважатися тіамін і, можливо, його метаболіти. Такий ефект можна віднести до проявів некоензимних функцій цього вітаміну.

ПРИЧИНИ ВИНИКНЕННЯ НАДСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ У ДРІЖДЖІВ

ФЕДОРОВИЧ Д. В., БОРЕЦЬКИЙ Ю. Р., ПИНЯГА Ю. В.,
ПРОКОПІВ Т. М., БОРЕЦЬКИЙ В. Ю., ФАЮРА Л. Р.,
СИБІРНИЙ А. А.

Інститут біології клітини НАН України, Львів;
e-mail: fedorovych@cellbiol.lviv.ua

Декілька видів дріжджів, серед них умовно патогенні *Candida albicans*, промислово важливі — *Candida famata*, *Pichia (Candida) guilliermondii*, *Shwanniomyces occidentalis*, *Debaryomyces hansenii* за умов дефіциту заліза здатні до надсинтезу рибофлавіну (РФ). Зростання флавіногенної активності у цих видів дріжджів виникає також внаслідок вирощування в середовищі, що містить іони металів (кобальт, хром). Дефіцит заліза у середовищі викликає у *P. guilliermondii* значне зростання нагромадження транскриптів генів *RIB1* та *RIB7*, що кодують ГТФ-циклогідролазу та рибофлавінсинтазу (перший та останній ензими шляху біосинтезу РФ). Зростання рівня транскрипції цих генів показано також у мутантів, які здатні до над-

синтезу рибофлавіну в середовищі з високим вмістом заліза, а також у штаму дикого типу, вирощеного за умов підвищеної концентрації іонів Co(II) або Cr(VI). У *P. guilliermondii* описано 11 регуляторних мутацій негативного типу дії (*rib80*, *rib81*, *hit1*, *red1-red6*, *yfh1*, *vma1*) і дві позитивного типу дії (*sef1*, *rib84*). Пошкодження будь-якого із цих генів призводить до дефектів не тільки регуляції біосинтезу рибофлавіну, а й транспорту заліза в клітини. Наведені дані свідчать про тісний зв'язок між регуляцією біосинтезу РФ та гомеостазом металів у флавіногенних дріжджів, однак механізми та фізіологічна доцільність надсинтезу РФ дріжджами за умов дефіциту заліза та при надлишку іонів металів залишаються нез'ясованими. Висловлено припущення, що посилення синтезу РФ і асиміляції заліза у *P. guilliermondii* є відповіддю на оксидативний стрес, викликаний різними факторами. На користь цієї гіпотези свідчать декілька фактів. Мутації *rib80*, *rib81*, *hit1*, обробка кобальтом або хромом, а також дефіцит заліза викликають зростання вмісту малонового діальдегіду (МДА) в культурі. Ріст мутантів *rib80*, *rib81*, *hit1* сильніше пригнічується супероксидгенеруючими агентами (метилвіологен, менадіон, іони кобальту, кадмію), ніж штаму дикого типу. Супероксидгенеруючі агенти спричиняють також підвищення продукції РФ та вмісту заліза в клітинах цих дріжджів. Виявлено, що підвищена флавіногенна активність у мутантів з пошкодженою регуляцією біосинтезу РФ, а також штаму дикого типу за умов дефіциту заліза та завдяки дії іонів металів корелює із зниженням активності супероксидисмутази та каталази. Зміни флавіногенної активності, метаболізму заліза та чутливості до прооксидантів виявлено і в мутантів, отриманих за допомогою інсерційного мутагенезу, *vma1* (вакуолярна АТР-аза) та *fra1* (амінопептидаза). Делеція гена *YFHI* (кодує дріжджовий гомолог фратаксину, залучений у метаболізм заліза) призводить до зростання чутливості до пероксиду водню, підвищення рівня синтезу РФ та збільшення вмісту заліза в клітинах. Делеція гена *YAPI* (кодує дріжджовий активатор транскрипції, що контролює відповідь на оксидативний стрес) призводить до зниження вмісту заліза в клітинах, зниження рівня синтезу РФ за умов дефіциту заліза, що також свідчить про спільність деяких елементів, задіяних у регуляції досліджуваних процесів. Наведені дані свідчать, що надсинтез РФ є одним із елементів захисту від оксидативного стресу.

mTOR/S6K PATHWAY AS A REGULATOR OF CELL GROWTH, PROLIFERATION AND METABOLISM

FILONENKO V. V., GOUT I. T.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: filonenko@imbg.org.ua*

The mTOR (mammalian target of rapamycin) is central regulator of an evolutionary conserved signalling pathway which controls cellular metabolism, growth and proliferation.

Deregulation of mTOR-coordinated signalling has been associated with various human pathologies, including diabetes, inflammation and cancer. Rapamycin, a naturally occur-

ring mTOR inhibitor, and its homologues have been currently tested as anti-cancer drugs in numerous clinical trials. In contrast to yeast which have two TOR genes (TOR1 and TOR2), there is only one gene encoding mammalian TOR. The diversity of TOR-mediated signalling in mammals is compensated by the existence of two multienzyme complexes, mTORC1 and mTORC2, whose regulatory components and downstream effects mirror in part signalling mediated in yeast by TOR1 and TOR2 pathways. The mechanisms by which mTOR sensors and controls energy metabolism and cell growth are relatively well understood, while molecular events defining mTOR-mediated proliferation remain to be elucidated. We have recently identified a novel mTOR splicing isoform, TORb, which in contrast to the full length protein (mTORa), has the potential to regulate the G1 phase of the cell cycle and to stimulate cell proliferation. mTORb is an active protein kinase which mediates downstream signalling through complexing with Rictor and Raptor proteins. Furthermore, overexpression of mTORb transforms immortal cells and is tumorigenic in nude mice and therefore is a proto-oncogene. These findings define molecular events responsible for mediating mTOR-driven proliferation and oncogenic transformation.

Recent identification of CoA-synthase, enzyme responsible for the last two steps in CoA biosynthesis, as S6K binding partners revealed a possible link between cell signaling and regulation of CoA/CoA derivatives-dependent metabolic processes in the cell.

Further studies detected interaction of CoA synthase with other signaling molecules including regulatory subunit of p85 PI3K, tyrosine phosphatase (Shp2PTP) and some tyrosine kinases. In addition it was demonstrated for the first time that tyrosine-dependent phosphorylation/dephosphorylation of CoA synthase affects its catalytic activity that supports proposed idea.

ДІЯ ОКСИТОЦИНУ НА ТРАНСПОРТ ІОНІВ Ca В ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗАХ МАТКИ

ШЛИКОВ С. Г.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: sshlykov@biochem.kiev.ua*

Гладеньком'язові клітини матки є складною тензоелектричною системою, скоротлива активність якої контролюється чисельними факторами, а саме: гормонами, медіаторами, іонами, а також механічним розтягуванням. Механізм дії окситоцину на скоротливу активність гладеньких м'язів матки був і залишається предметом досліджень вчених багатьох лабораторій світу.

Нами було підтверджено, що дія окситоцину на гладенькі м'язи має видову специфічність. Встановлено, що при короткостроковій аплікації окситоцину гладенькі м'язи матки мурчака та щура відповідають скоротливою реакцією, що інгібується блокаторами кальцієвих каналів, нітрендипіном та ніфедипіном.

У клітинній лінії міометрія вагітних жінок (PHM1) та у первинній культурі клітин жіночого міометрія за допомогою полімеразної ланцюгової реакції показано експресію генів TrpC 1/3/4/5/6/7. Встановлено, що в гладеньких м'язах матки жінок експресуються TrpC протеїни, які приймають участь у регуляції вільної концентрації кальцію в клітинах міометрія. Активація окситоцинових рецепторів

або спустошення саркоплазматичного ретикулула за допомогою тапсигаргіна, інгібітора кальцієвої помпи, індукували вхід іонів кальцію з позаклітинного простору. Цей вхід інгібувався SKF 96365 та іонами гадолінію. Окситоцин та тапсигаргін індукували також вхід іонів Sr. У клітинній лінії РНМ1 та у первинній культурі клітин жіночого міометрія, мембранопроникливий аналог діацилгліцеролу, індукував вхід Ca^{2+} та Sr^{2+} . Вхід двовалентних катіонів не блокувався інгібіторами протеїнкінази С та активувався інгібітором ліпази діацилгліцеролу, РНС 80267. Показано, що до виникнення внутрішньоклітинних осциляцій концентрації іонів Са, за умов дії синтетичного аналогу діацилгліцеролу, має відношення тільки позаклітинний Ca^{2+} .

Доведено, що в клітинах міометрія щурів окситоцин гальмує активність кальцієвих pomp плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулула.

Запропоновано концептуальну узагальнюючу схему біохімічного механізму регуляції окситоцином транспорту Ca^{2+} у міометрії.

REGULATION OF REDOX STATE BY RHENIUM-PLATINUM ANTITUMOR SYSTEM CAPSULATED IN NANOLIPOSOMES

¹*SHTEMENKO N. I.*, ²*SHTEMENKO O. V.*

¹*Oles Gonchar Dnipropetrovs'k National University, Ukraine;*

²*Ukrainian State Chemical Technological University,*

Dnipropetrovs'k, Ukraine;

e-mail: ashtemenko@yahoo.com

The novel antitumor system including cluster rhenium compounds and cisplatin (Re-Pt 4 : 1 system) has been recently presented that was effective in the model of rat's carcinoma T8 and in the majority of experiments led to disappearance of cancer cells. The approach to circumvent such drawbacks of the drugs on the base of heavy metal compounds as dose-limiting toxicities (nephro-, hepato-, neurotoxicity, etc.) by encapsulation into a nanoparticle prevents by-side interactions is a very promising strategy. Oxidative stress-induced activation of NADPH oxidase and peroxisome proliferators-activated receptors, alterations of redox state of binding proteins, DNA mutations and induction of early response genes and hematopoietic activation, etc. seem to be common elements in the induction of hyperplasia, neoplasia, cancer metastasis, and angiogenesis. In the present work we show application of different nano-preparations of 20–100 nm size, nanoliposomes and solid nanoparticles loaded with Re-Pt system or with its components in different ratios in the model of tumor growth. The cluster rhenium compounds of tetracarboxylate and cis-dicarboxylate types were the matter of concern. Parameters of oxidative stress in blood of experimental animals were measured. Intensity of peroxide oxidation process, activity of defensive enzymes in plasma and red blood cells were very sensitive to tumor growth and to its prevention by the system. Introduction of the Re-Pt system in nanoliposomes and nanoparticles inhibited the tumor growth, except experiments, where quantity of cisplatin in capsules were lower (1 : 8). The lowering of the size of the introduced liposomes and particles did not influence the intensity of POL. Activities of the enzymes in plasma and

erythrocytes were higher, especially in experiments with solid nanoparticles (in 1.8 times in comparison with application of ordinary liposomes). This activation of the antioxidant enzymes was independent of the tumor of size and remained on the high level even in those experiments, where the ratio of the system components was 2 : 4. The Re-Pt system was shown to be effective in the form of nanoliposomes with mixed composition inside (encapsulation of both components), activated the redox defence in tumor bearing animals that opens great opportunities to use medicines with different properties in ratio of personal inquire in one preparation.

СТЕНДОВІ ПОВІДОМЛЕННЯ

NO-DEPENDENT RELEASE OF FREE IRON CAUSES OXIDATIVE DAMAGE AT THE LEVEL OF MITOCHONDRIA AND PLASMA MEMBRANE

АКОРОВА О. В., КОТСІУРУБА А. В., КОРКАЧ Ю. П., САГАЧ В. Ф.

*Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: circul@biph.kiev.ua*

Iron is known as the catalyst of toxic ROS production, such as •OH-radical. Mitochondria are the potent source of cellular ROS and RNS which cause oxidative damage to different cellular structures, but the role of free iron in the conversion of mitochondrial ROS has not been sufficiently elucidated. Earlier we have shown that NO donor, nitroglycerine (NG) *in vivo* causes dramatic rise in mitochondrial ROS and RNS production. The aim of this work was to study the influence of NG on Fe²⁺ release in mitochondria, Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat aorta and lipid peroxidation as the hallmark of oxidative damage of the cells.

It was shown that dose-dependent increase of Ca²⁺-uptake which is the result of NO-dependent inhibition of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) is accompanied not only by the rise in ROS and RNS production but also by dramatic increase in free iron (Fe²⁺) content and lipid peroxidation (LP). The rise in the level of ROS, RNS, LP and Fe²⁺ well correlates with dose-dependent inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase. It was established that Na⁺,K⁺-ATPase inhibition by NO *in vivo* is not cGMP-dependent, but is of oxidative nature. Hypothesis is put forward that the release of free iron initially caused by an increase in Ca²⁺-uptake and ROS formation as a result of MPTP inhibition leads to the burst of ROS production catalyzed by Fe²⁺ which could be the main cause of oxidative damage at the level of mitochondria and plasma membrane and inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity.

THE CONTRIBUTION OF K_{ATP}-CHANNEL TO TRANSMEMBRANE EXCHANGE OF K⁺ IN MITOCHONDRIA

АКОРОВА О. В.

*Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: circul@biph.kiev.ua*

In accordance with contemporary views, the role of mitochondrial K_{ATP}⁺-channel opening in cellular protection against apoptosis consists in “mild uncoupling” of respiratory chain as a result of acceleration of K⁺-cycling in mitochondria. Then it is of interest to estimate partial contribution of K_{ATP}⁺-channel to transmembrane exchange of K⁺ in the organelles. The rate of potassium transport was estimated by spectrophotometrical registration of the changes in mitochondrial volume.

With the aid of K^+ -channels blockers (non-selective, 4-aminopyridine, and selective blocker of K^+_{ATP} -channel, glibenclamide) it is shown that blockage of K^+ -influx in a stationary state established after K^+ -uptake leads to complete or partial demasking of K^+/H^+ -exchange which allows to estimate partial contribution of K^+_{ATP} -channel, relative to ATP-independent K^+ -channels, in K^+ -cycle. Based on the relation between initial rates of K^+ -efflux, it is established that ATP-independent glibenclamide-insensitive K^+ -uptake is not a constant, but a variable component of K^+ -cycle, and the contribution of K^+_{ATP} -channel to transmembrane exchange of K^+ increases to that extent as ATP-independent K^+ -uptake is decreased or inactivated. The mechanism of its decrease needs a more detailed analysis, but it could be supposed that the role of K^+_{ATP} -channel in K^+ -cycle under physiological conditions becomes especially important in energy-deficient or respiration inhibited mitochondria which could provide a background for clinical application of pharmacological K^+_{ATP} -channel openers.

ОКИСНИЙ СТРЕС ЯК МЕДІАТОР РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

*АНДРІЙЧУК Т. Р., РАКША Н. Г., ДРАГАН Л. П.,
ПОЛЯКОВА В. В., ЛУГОВА С. Л., ЦУДЗЕВИЧ Б. О.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: tatosha62@mail.ru*

Окисний стрес визначається за рахунок виявлення окисних пошкоджень, і є наслідком підвищення рівня активних кисневих метаболітів (АКМ), інтенсифікації вільнорадикальних процесів в цілому та дисбалансу у функціонуванні прота антиоксидантної ланки. Ініціюється за дії чинників різної природи, особливо іонізуючої радіації. На рівні клітини за дії променевого фактора патологічні зміни спостерігаються в усіх компартментах, але найвищий ступінь неспецифічних перетворень – у мембранних структурах клітини, що сприяє активації і реалізації клітиною програми загибелі шляхом апоптозу.

В умовах нашого експерименту в тимоцитах і спленоцитах шурів за дії променевого чинника було встановлено достовірне підвищення ступеня пероксидного окислення ліпідів, яке реєстрували за накопиченням ТБК-активних метаболітів. Активізація ПОЛ супроводжується зміною стану клітинних мембран, їхньої проникності, зростанням імовірності кластеризації рецепторів смерті на плазматичній мембрані, відбувається екстерналізація фосфатидилсерину на зовнішню її поверхню як результат активації Ca^{2+} -залежної скрамблази, отже спостерігається індукція стресзалежного апоптозу. Одним з прямих наслідків впливу АКМ і опосередкованих – пероксидації ліпідів – є окислення тіолових груп. Наші дані свідчать про залежне від дози та часу зниження кількості загальних SH-груп в імунокомпетентних клітинах, що призводить до дисбалансу в роботі іон-транспортувальних систем, внаслідок чого реєструється активація Ca^{2+} -залежних проапоптотичних факторів, а саме гідролітичних ензимів – кальпаїнів та Ca^{2+} -, Mg^{2+} -ендонуклеаз. Нами також виявлено залучення внутрішнього сигнального шляху апоптозу, а саме пригнічення функційної активності мітохондрій як результат порушення роботи мітохондріального електрон-транспортного ланцюга.

Таким чином окисний стрес супроводжується порушенням внутрішньоклітинних метаболічних зв'язків та шляхів сигнальної трансдукції, що сприяє радіаційно-індукованому апоптозу.

ВПЛИВ АФЛАТОКСИНУ В1 НА ПРОЦЕС ПОЛ ТА АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ В ЕРИТРОЦИТАХ ТВАРИН

^{1,2}АНТОНЯК Г. Л., ²ФЕДЯКОВ Р. О., ²КОВАЛЬ Н. К., ¹БАБИЧ Н. О.,
²СТЕФАНИШИН О. М., ³ПАНАС Н. Є.

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

²Інститут біології тварин НААН України, Львів;

³Львівський національний аграрний університет, Україна;
e-mail: bioferom@gmail.com

Афлатоксин В1 (AFB1) – це мікотоксин, який може надходити до організму тварин і людини у разі забруднення кормів і продуктів харчування мікроміцетами роду *Aspergillus*. Вплив AFB1 на метаболізм в еритроїдних клітинах не вивчено. Метою роботи було дослідити процес пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) та активність ензимів антиоксидантної системи в еритроцитах тварин за експериментального введення AFB1.

Дослідження проводили на 20 білих щурах, яким одноразово вводили AFB1 (0,5 мг/кг). Супероксиддисмутазу, каталазу, глутатіонредуктазу активність і вміст ТБК-активних продуктів визначали стандартними методами в гемолізатах еритроцитів, отриманих із крові тварин через 7, 14 і 21 добу після введення AFB1.

Установлено, що вміст ТБК-активних продуктів в еритроцитах щурів збільшується впродовж 21-добового періоду досліджень. Супероксиддисмутазна і каталазна активність зростає на 7-у та знижується на 14- і 21-у добу, а глутатіонредуктазна – знижується в усі терміни експерименту. Найвищий рівень продуктів ПОЛ виявляється на 21-у добу, а найвиразніше зменшення ензимної активності – на 7-у добу після введення тваринам AFB1.

Одержані результати свідчать, що активація процесів ПОЛ у клітинах може бути однією з ланок шкідливого впливу AFB1 на організм тварин і людини. Водночас зниження антиоксидантного потенціалу еритроцитів призводить до дисбалансу між інтенсивністю процесів утворення продуктів ПОЛ та їхньої детоксикації. Такі ефекти зумовлюють розвиток оксидативного стресу та порушення функціональних властивостей клітин крові.

ДИНАМІКА КОНЦЕНТРАЦІЇ ГЛЮКОЗИ У ПЛАЗМІ КОНСЕРВОВАНОЇ КРОВІ БИКІВ В УМОВАХ ГІПЕРКАПНІЇ

АРНАУТА О. В., ГРЕСЬКО Б. Л.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: alex_arnauta@mail.ru*

Однією з актуальних як у практичному, так і теоретичному аспектах у сучасній біохімічній науці є вивчення впливу високих концентрацій різних форм вугільної кислоти на різні біологічні об'єкти і, зокрема, консервовану кров. Як відомо, глюкоза є основним енергетичним субстратом для забезпечення метаболічних процесів в усіх клітинах крові. Метою нашої роботи було вивчення впливу високих концентрацій NaHCO_3 та pCO_2 на динаміку концентрації глюкози у плазмі консервованої крові биків у процесі її зберігання.

Дослідження проводили на базі стаціонару факультету ветеринарної медицини та кафедри біохімії тварин, якості і безпеки сільськогосподарської продукції ім. акад. М. Ф. Гулого. Кров контрольних зразків консервувалася глюкозо-цитратним гемоконсервантом «Глюгіцир». Для консервування крові дослідних зразків був використаний модифікований «Глюгіцир», що містить високу концентрацію NaHCO_3 та високий рівень pCO_2 . Іономіром «И-130 вимірювали» рН середовища. Концентрацію глюкози визначали на біохімічному аналізаторі «Microlab-200» (Нідерланди).

Аналіз результатів експериментів показав, що у зразках крові, яку було законсервовано середовищем із високим вмістом вуглекислотних компонентів, зниження рівня глюкози відбувалося значно повільніше, ніж у зразках крові, яку консервували стандартним глюкозо-цитратним консервантом. Зокрема, на десяту добу в дослідних зразках концентрація глюкози порівняно із вихідним значенням була на 12,1% меншою, тоді як у контролі – на 36,7%. Аналогічна динаміка спостерігалась у подальшому. Станом на тридцять добу рівень досліджуваного субстрату в дослідних зразках знизився на 55,3%, а в контрольних – на 89,8%.

Таким чином, у крові, законсервованої високими концентраціями вуглекислоти, спостерігалось менш інтенсивне зниження концентрації глюкози, порівняно з контрольними зразками. В умовах гіперкапнії відбувається сповільнення обмінних процесів, в яких використовується глюкоза, що у свою чергу попереджає інтенсивне накопичення в середовищі кінцевих продуктів метаболізму, а також раціональніше використовується сам субстрат.

**РІВЕНЬ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ ОБМІНУ ЛІПІДІВ
ЗАЛЕЖНО ВІД ДЖЕРЕЛА ЇХ У КОРМІ**

БАРИЛО Б. С., КИРИЛІВ Я. І.

*Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, Україна;
e-mail: BogdanBarulo@ukr.net*

Вивчали вплив використаного для фільтрації соняшникової олії перліту на деякі показники ліпідного обміну у курчат – бройлерів.

На першому етапі досліджень вивчали вміст загальних ліпідів та їхній склад за класами у використаному для фільтрації соняшникової олії перліті і встановили, що в ньому міститься 59,13% загальних ліпідів. За розподілом їх на класи встановлено, що в них міститься 55,98% триацилгліцеролів, 13,46% ефірів холестеролу, 9,06% фосфоліпідів, 7,98% неетерифікованих жирних кислот, 7,13% вільного холестеролу та 6,59% моно- і дигліцеролів.

Після цього було проведено дослід на курчатах-бройлерах кросу Кобб-500 з вивчення можливості заміни соняшникової олії на фільтроперліт та його вплив на показники ліпідного обміну, зокрема, вміст загальних ліпідів та співвідношення різних класів їх у тканинах печінки, грудних і стегових м'язах. Поряд з цим визначали вміст вітамінів А, Е та каротиноїдів у тканині печінки.

Внаслідок досліджень було встановлено, що додавання різних доз фільтроперліту до корму курчатам-бройлерам сприяло зниженню загальних ліпідів у тканині печінки на 9,92% порівняно з контрольною групою, яка отримувала натуральну соняшникову олію. Що стосується співвідношення класів ліпідів, то найвищим у печінці був рівень фосфоліпідів (24,03–31,99%), а найнижчим – неетерифікованих жирних кислот (10,51–13,92%). Найвищий рівень фосфоліпідів був у тканині печінки курчат-бройлерів, що отримували 6% фільтроперліту (на 4,31%). Рівень моно- і діацилгліцеролів був приблизно однаковим, а вільного холестеролу був дещо нижчим, ніж у контрольній групі курчат-бройлерів. Що стосується вмісту загальних ліпідів у тканинах м'язів, то у грудних м'язах він був дещо нижче, ніж у стегових. У грудних м'язах порівняно із стеговими рівень фосфоліпідів був вище на 3,87–19,64%. При визначенні вмісту вітамінів А і Е та каротиноїдів у печінці дослідних курчат-бройлерів встановлено підвищення вмісту вітаміну А на 13,61–32,16%, проте рівень вітаміну Е був нижче у дослідних групах на 5,76–53,88% порівняно з контрольною.

Рівень каротиноїдів у всіх дослідних групах був істотно вищим, порівняно з контрольною, зокрема на 1,20–2,70 мкг/г або на 30,77–69,23%.

Таким чином заміна натуральної соняшникової олії у складі корму для курчат-бройлерів на фільтроперліт, який містить значну кількість залишку соняшникової олії, впливає на рівень загальних ліпідів у тканинах печінки, стегових і грудних м'язів та вміст вітамінів А, Е і каротиноїдів.

**ВПЛИВ ОКСИДУ АЗОТУ
НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН МЕЛАНОМИ
ЛЮДИНИ ПІД ЧАС ГОЛОДУВАННЯ ЗА АРГІНІНОМ**

*БАРСЬКА М. Л., ЧЕНЬ О. І., БОБАК Я. П., ЛИНІВ Л. С.,
ВИННИЦЬКА Б. О., ВОВК О. І., ІГУМЕНЦЕВА Н. І.,
СИБІРНА Н. О., СТАСИК О. В.*

*Інститут біології клітини НАН України, Львів;
e-mail: marina_barska@yahoo.com*

Відомо, що конститутивна активність індукбельної NO-синтази (iNOS) у клітинах меланоми людини позитивно корелює з несприятливим прогнозом щодо виживання хворих. Разом з тим, в умовах обмеження вмісту L-аргініну (субстрату NOS-аз) у клітинах меланом гальмується ріст. Однак в організмі людини дефіцит аргініну зумовлює небезпеку вазоконстрикції через недостатню кількість вазодилататора — оксиду азоту (NO). Метою дослідження було вивчення впливу компенсації дефіциту NO під час голодування за аргініном на фенотип злоякісних клітин, включаючи їхню здатність до адгезії, росту та апоптозу.

Досліджено відмінні за експресією iNOS клітинні лінії меланом: WM1158 (iNOS-позитивна), SK-MEL-28 (iNOS-негативна). За набором інших ензимів метаболізму L-аргініну ці клітинні лінії не відрізняються. Активність NOSаз в клітинах досліджуваних меланом в цілому є вищою на повному середовищі культивування (СМ), ніж на середовищі без аргініну (АФМ); і на 2 порядки вищою у клітин WM1158, ніж в SK-MEL-28. Імунореактивні смуги, що відповідають нітрозильованому тирозину, виявлялись Вестерн-блот (WB) аналізом тільки в лізатах клітин WM1158 на СМ. На АФМ, детектований за допомогою підсиленої хемілюмінесценції сигнал, був відсутній як для WM1158, так і для SK-MEL-28.

Імуно- та лектинофлуоресцентним методами, а також лектиноблотаналізом встановлено зниження експресії $\beta 3$ інтегрину та зменшення кількості сіаловмісних глікопротеїнів у складі адгезивних молекул плазматичної мембрани клітин досліджуваних меланом на АФМ за впливу екзо- та ендогенного NO. Виявлені зміни в умовах голодування за аргініном можуть спричиняти активацію апоптозу, як однієї з форм апоптозу, індукованого втратою адгезії клітин до субстрату, оскільки взаємодія інтегринів з позаклітинним матриксом ініціює запуск внутрішньоклітинного сигналювання до проліферації та диференціації клітин. Зокрема, відомо, що інтегринопосередкована активація фосфатидилінозитол-3'-кінази (PI3K) та протеїнкінази В/Акт запобігає апоптозу, а інгібування цих ензимів спричиняє індукцію останнього. В клітинах WM1158 та SK-MEL-28 як на повному, так і на безаргініновому середовищі методом WB-аналізу виявлено високу експресію регуляторної субодиниці PI3-кінази p85 α . Однак за дії інгібітора PI3K вортманіну на СМ не відбувалось істотного пригнічення росту клітин досліджуваних меланомних ліній. Активація NOS-аз до продукції ендогенного NO за впливу індукторів та додавання до інкубаційного середовища низьких доз екзогенного оксиду азоту в кількості, домірних фізіологічним (0,01 та 0,1 мМ нітропрусида натрію), сприяли підтримці росту клітин WM1158 та SK-MEL-28 на СМ. На 24-у годину інкубації за умов впливу екзо- та ендогенного NO виявлено початкові етапи фрагментації

ДНК та розщеплена форма PARP в лізатах клітин WM1158 виключно на AFM, що свідчить про запуск каспазозалежного апоптозу, ймовірно шляхом аноїкозу.

Одержані дані свідчать про можливе використання комбінації голодування за аргініном із додаванням екзогенного донора NO для терапії меланом, що може призводити *in vivo* до зміни їхніх адгезивних властивостей з наступним запуском апоптозу.

РІВЕНЬ ВІДНОВЛЕНОГО ГЛУТАТІОНУ ТА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ЙОГО ОБМІНУ В ТИМУСІ ЩУРІВ ІЗ ТРАНСПЛАНТОВАНОЮ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА

БЕВЗО В. В., БРЕНЗАН Л. С.

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: Bevzob1@mail.ru*

Характерною рисою пухлинного росту є порушення функціонування прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та імунної системи, що проявляється дисбалансом гормонального контролю, порушенням регуляторних механізмів, накопиченням в організмі продуктів пероксидного окислення ліпідів та зниженням протипухлинної резистентності. Важливу роль у підтримці резистентності організму до злоякісного росту тканин відіграє тимус, тому метою дослідження було вивчення вмісту відновленого глутатіону та активності ензимів його обміну в щурів-пухлиноносіїв із перевитою карциномою Герена.

Показано, що рівень ТБК-активних продуктів ПОЛ у гомогенаті тимуса щурів-пухлиноносіїв зростає протягом всього періоду росту карциноми Герена та досягає максимальних значень на термінальній стадії, тоді як загальна антиоксидантна активність знижується на стадії інтенсивного розвитку пухлини в 1,5 раза, а на термінальній – майже в 2 рази порівняно з контролем. При цьому активність ензимів глутатіонової системи тимуса: γ -глутамілтрансферази, глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази вірогідно збільшується лише на стадії початкового росту пухлини. Починаючи із 18 доби і до термінальної фази пухлинної прогресії активність ензимів у гомогенаті тимуса щурів різко знижується порівняно з інтактними тваринами. Вміст відновленого глутатіону в гомогенаті тимуса щурів-пухлиноносіїв вірогідно зростає на початковій та інтенсивній стадії росту пухлини у 1,3 та 1,8 раза відповідно, тоді як на термінальному етапі розвитку пухлини відзначали зниження вмісту відновленого глутатіону на 25% у дослідних тварин порівняно з контролем.

Крім того, розвиток карциноми Герена у щурів-пухлиноносіїв супроводжується зменшенням коефіцієнта маси тимуса в 1,5 раза на початковій та в 2,5 раза на термінальній стадіях росту пухлини порівняно з інтактними тваринами, що приводить до його інволюції.

Такі зміни відновленого глутатіону на початкових етапах росту карциноми Герена можна розглядати як автоімунну реакцію організму тварин на пухлинну прогресію. Зниження активності ензимів обміну глутатіону, можливо, обумовлене гальмуванням їхньої активності токсичними метаболітами, які продукує пухлина,

а також зниженням синтезу їх за канцерогенезу, що в цілому ослаблює систему антиоксидантного захисту тимуса та сприяє пухлинній прогресії.

ВПЛИВ ІНФІКУВАННЯ ЗБУДНИКОМ ОЧКОВОЇ ПЛЯМИСТОСТІ НА ІНДУКЦІЮ мРНК ГЕНА ДЕФЕНСИНУ

¹БЕЛАВА В. Н., ²ЗЕЛЕНИЙ С. Б., ¹ПАНЮТА О. О.,
¹ТАРАН Н. Ю.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології

ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;

e-mail: v987@ukr.net

Досліджували динаміку вмісту мРНК захисного протеїну дефенсину на початкових етапах інфікування *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton проростків озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) різних за стійкістю сортів.

Кількість дефенсинової мРНК в неінфікованих проростках сприйнятливого сорту Миронівська 808 впродовж шести годин поступово зменшується на 27,5%, що не суперечить даним про наявність ДНК-вихідних транскриптів у насінні і майже повну відсутність у здорових листках. За інфікування (через 1,5 год) кількість мРНК дефенсину зменшилася у 4,0 рази відносно початкового значення, що пояснюється супресорним впливом гриба на імунну відповідь рослинної клітини. Впродовж наступних годин досліду зареєстровано поступове збільшення вмісту мРНК дефенсину. Проте, навіть, й через 6 год після інфікування їхня кількість у 3 рази була нижчою за початкову і у 2 рази – за контрольне значення. Це пояснюється нездатністю клітин проростків сприйнятливого сорту подолати інгібуючу дію імуносупресорів патогену.

У контрольних проростках резистентного сорту Roazon кількість мРНК впродовж шести годин зростає на 11%, що узгоджується з даними про евакуацію дефенсинів насіння, що проростає в оточуючий простір для формування захисного мікросередовища. За інфікування (через 1,5 год) кількість мРНК зменшується у 2,1 рази. Темпи наступного поступового відновлення рівня мРНК вдвічі вищі, ніж у сприйнятливого сорту.

Порівняння накопичення мРНК дефенсину у тканинах пшениці сприйнятливого та відносно резистентного сортів показує, що і в контролі, і за інфікування *P. herpotrichoides* характер зміни цього показника зберігається. Проте, межі, а отже, і коливання абсолютних значень для сприйнятливого сорту ширші, ніж для відносно резистентного.

Тобто, в даному разі нездатність підтримувати постійно високий рівень експресії генів захисних сполук негативно впливає на стійкість сорту. І навпаки, здатність рослинного організму навіть під впливом супресорів фітопатогенів менше знижувати рівень мРНК захисних сполук і швидше нормалізувати транскрипцію сприяє резистентності сорту.

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ
НЕЙРОНОВ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ КРЫС В УСЛОВИЯХ
НИТРОЗИРУЮЩЕГО СТРЕССА *IN VITRO* И НА ФОНЕ
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ**

*БЕЛЕНИЧЕВ И. Ф., ПАВЛОВ С. В., КУЧЕРЕНКО Л. И.,
БУХТИЯРОВА Н.*

*Запорожский государственный медицинский университет,
НПО «Фарматрон», Украина;
e-mail: cnilzgmu@rambler.ru*

Целью настоящей работы было изучить формирование энергопродуцирующей дисфункции митохондрий нейронов коры головного мозга крыс при воздействии токсических концентраций дериватов оксида азота (нитрозирующий стресс) *in vitro*, а также при введении антиоксидантного и противоишемического препарата «Кардиотрил» (НПО «Фарматрон», Запорожье). В суспензии митохондрий нейронов сенсомоторной коры головного мозга крысят линии Вистар на фоне введения донатора NO – динитрозольного комплекса железа II (DNIC) (600 мкМ) и кардиотрила (10^{-5} М) определяли содержание АТФ, интермедиатов цикла Кребса, активность митохондриальной креатинфосфокиназы (мх-КФК), скорость открытия митохондриальной поры, содержание bcl-2-протеина. Введение в суспензию митохондрий DNIC приводило к открытию поры митохондрий, падению мембранного потенциала. В митохондриях преинкубированных с DNIC, снижается уровень АТФ, за счет торможения реакций в цикле Кребса на трикарбоновом и дикарбоновых участках (снижение уровня изоцитрата и малата), угнетается транспорт энергии (снижение активности мх-КФК), а также понижается уровень антиапоптотического протеина bcl-2. Преинкубирование митохондрий с кардиотрилом на фоне введения DNIC приводит к торможению скорости открытия митохондриальной поры, повышению мембранного потенциала и повышению АТФ на фоне увеличения уровня малата ($P < 0,05$). Кардиотрил также повышает уровень bcl-2, что свидетельствует о торможении NO-обусловленного митоптоза.

**ВПЛИВ СПОЛУК КАДМІЮ НА АКТИВНІСТЬ
ТА КОМПОНЕНТНИЙ СКЛАД ПЕРОКСИДАЗИ
ПРОРОСТКІВ КУКУРУДЗИ**

БІЛЬЧУК В. С., ШУПРАНОВА Л. В.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: anna-rossihins@rambler.ru*

Пероксидаза є провідним ферментом системи захисту клітин від надмірної концентрації активних форм кисню, які утворюються внаслідок дії ксенобіотиків. Велика кількість ізоферментів пероксидази дозволяє окислювати різноманітні речовини, збільшуючи фізіологічну значимість ферменту. У зв'язку з цим метою роботи

було з'ясування участі пероксидази у реакції проростків кукурудзи на дію сполук кадмію. Об'єктом дослідження були проростки кукурудзи гібриду Дніпровський 310 МВ, які вирощували в модельному експерименті на середовищі розчину нітрату кадмію в концентрації 1,0; 0,1 та 0,03 мМ. Відбір проб здійснювали через добу. Активність пероксидази визначали фотометрично при 490 нм з бензидином, кількість протеїну – методом Бредфорд. Ізоензимні спектри пероксидази вивчали методом диск-електрофорезу і ізофокусування в ПААГ із гістохімічним виявленням ензиму. Аналізом одержаних даних було з'ясовано, що зміни активності пероксидази визначаються концентрацією іонів кадмію та органоспецифічністю проростків. За дії іонів кадмію відбувається гальмування терміну проявлення максимальної активності ензиму на 1–2 доби. В листках проростків відбувається підвищення питомої активності пероксидази в 1,3–1,5 раза до 9-ої доби проростання. У коренях проростків спостерігається зниження питомої активності ензиму відносно контролю на 20–30% за дії мінімальної та середньої концентрації токсиканту. Дослідження ізоензимного складу показали, що він є складнішим у коренях, ніж у проростаючому зерні та листках проростків. Контрольні зразки коренів у динаміці проростання містять від 5 до 8 компонентів із різною відносною електрофоретичною рухомістю (ВЕР). За дії іонів кадмію їх кількість зменшується на 1–2 компоненти. Аналіз денситограм показав, що вміст ензиму в компонентах із ВЕР 0,06 та 0,125 за дії кадмію суттєво знижується. Пероксидаза листків проростків представлена 4–6 основними ізоензимами. За дії іонів кадмію спостерігали як появу нових активних компонентів, так і ослаблення інтенсивності кількох смуг порівняно з контрольними рослинами. Метод ізоелектрофокусування дозволив визначити, що за дії кадмію відбуваються суттєві зміни у складі лужних ізоформ з рІ 7,8 і рІ 8,85 та вмісту активного протеїну в компонентах з рІ 4,4–4,7.

Таким чином, зміни в активності пероксидази за дії сполук кадмію зумовлено суттєвими перебудовами в компонентному складі ензиму.

PRESYNAPTIC PATHOLOGY: THE NEUROTOXIC EFFECT OF CADMIUM AND LEAD ON THE PROTON GRADIENT OF SYNAPTIC VESICLES AND GLUTAMATE TRANSPORT

BORISOV A. A.

*Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: arsenborisov@ukr.net*

The presynaptic mechanisms underlying the neurotoxic effects of non-essential heavy metals Cd^{2+} and Pb^{2+} were analysed. It was shown that the preincubation of rat brain nerve terminals with Cd^{2+} (200 μM) or Pb^{2+} (200 μM) for 15 min resulted in the attenuation of synaptic vesicles acidification, which was assessed by the steady state level of the fluorescence of pH-sensitive dye acridine orange. A decrease in L-[^{14}C]glutamate accumulation in digitonin – permeabilised synaptosomes after the addition of the metals, which reflected lowered L-[^{14}C]glutamate accumulation by synaptic vesicles inside of synaptosomes, may be considered in support of the above data. In this context, using isolated rat brain sy-

naptic vesicles, it was found that 100 μM Cd^{2+} or Pb^{2+} caused dissipation of their proton gradient, whereas the application of essential heavy metal Mn^{2+} did not do it within the concentration range of 50-500 μM . Thus, synaptic pathology associated with the influence of Cd^{2+} and Pb^{2+} may result from partial dissipation of the synaptic vesicle proton gradient that leads to: (*) a decrease in stimulated exocytosis, which is associated not only with the blockage of voltage-gated Ca^{2+} channels, but also with incomplete filling of synaptic vesicles; (**) an attenuation of Na^+ -dependent glutamate uptake.

ВПЛИВ КАДМІЮ НА ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

ВОРОШИЛОВА Н. М.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: kostya1972@voliacable.com*

Кадмієва інтоксикація спричинює розвиток оксидативного стресу в організмі тварин, посилює процеси пероксидного окислення ліпідів, порушує структурно-функціональну цілісність біологічних мембран, внаслідок чого відбуваються значні зміни у діяльності різних ензиматичних систем, зокрема, ензимів енергетичного обміну. Не з'ясованим залишається віковий аспект впливу кадмію на стан енергетичного обміну в організмі щурів. Тому метою нашої роботи було дослідження деяких показників енергетичного обміну, а саме активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) та вмісту глюкози у крові щурів різного віку, отруєних кадмієм. Дослід проводився на базі кафедри біохімії тварин, якості та безпеки сільськогосподарської продукції ім. акад. М. Ф. Гулого. У дослідженнях використано щурів різного віку: молоді, статевозрілі та старі відповідно віком 3, 6 та 18 місяців. Щури були отруєні кадмію сульфатом внутрішньочеревно в дозі 0,134 мг/100 г, що становить 1/50 DL_{50} . Експерименти було проведено за схемою: I група – інтактні щури; II група – щури, отруєні кадмію сульфатом відповідно для кожної вікової групи. Декапітацію проводили під ефірним наркозом, після чого відбирали кров. У плазмі крові визначали активність ЛДГ та вміст глюкози на біохімічному аналізаторі «Мікролаб – 200» (Нідерланди). Результатами проведених досліджень було встановлено зростання активності ЛДГ в крові отруєних щурів 3-місячного віку в 2 рази, 6- та 18-місячного віку – в середньому в 1,7 рази порівняно з інтактними тваринами. Також відзначається і збільшення вмісту глюкози: у крові отруєних щурів 3-місячного віку на 30%, 6-місячного – на 21%, натомість у щурів 18-місячного віку спостерігається лише тенденція до збільшення. Таким чином, одночасне збільшення активності ЛДГ та вмісту глюкози у крові отруєних щурів, з одного боку, пов'язане з активацією гліколітичного процесу, з іншого – з пригніченням окисних процесів й компенсаторного посилення окремих реакцій гліколізу, що в цілому свідчить про метаболічну компенсацію ацидотичного стану в організмі.

ІНТРОННІ мікроРНК ТА ІНШІ ЕЛЕМЕНТИ МЕХАНІЗМУ АЛЕЛЬНОГО ВИКЛЮЧЕННЯ ЛОКУСІВ ГЕНІВ ІМУНОГЛОБУЛІНОВИХ ЛАНЦЮГІВ

ГАЛИЦЬКИЙ В. А.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: volha@biochem.kiev.ua

Алельне виключення властиве багатьом генам, у т.ч. локусам генів імуноглобулінових ланцюгів. Завдяки цьому явищу досягається моноспецифічність імуноглобулінів, які синтезує лімфоїдна клітина. Передбачається, що ініціатором алельного виключення генів має виступати молекула мікроРНК (miRNA), котра утворюється внаслідок процесингу некодуючого транскрипта алелів та зв'язується з комплементарною ділянкою їхніх ДНК, спричинюючи нанесення епігенетичних маркерів репресії [Halytskiy, 2008]. Метою дослідження було підтвердження цієї гіпотези шляхом виявлення послідовностей miRNA у складі локусів генів імуноглобулінів, а також ідентифікація інших елементів, що забезпечують алельне виключення даних локусів.

Нуклеотидні послідовності локусів генів імуноглобулінів було отримано з бази даних Entrez, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>. Аналіз послідовностей проводилися за допомогою програм для аналізу нуклеотидних текстів, пошук інвертованих повторів (а саме послідовностей генів miRNA) – за допомогою програми RepeatMasker, пошук мішеней miRNA – за допомогою бази даних <http://www.microrna.org/>.

Внаслідок аналізу *in silico* було виявлено послідовність гена miRNA miR-650 у локусі гена легкого λ -ланцюга імуноглобуліну. Зазначений ген знаходиться в межах інтрону. Показово, що у послідовності зрілої miRNA miR-650 міститься відразу три сайти, комплементарні сайтам метилювання у ДНК, – один динуклеотид 5'-CG-3' та два тринуклеотиди 5'-CAG-3'. Імовірно, ця miRNA відповідає за алельне виключення локусів гена λ -ланцюга. Також у локусі λ -ланцюга передбачено наявність генів щонайменше 6 інших miRNA. Послідовності їхніх екзонів також містять по кілька сайтів 5'-C(N)G-3'.

Мішенями miR-650 є транскрипти кількох сотень генів, у т.ч. гена транскрипційного фактора MITF, а також генів компонентів проліферативного сигнального каскаду та компонентів цитоскелета. Тому дозріваюча В-клітина, розпочавши перебудову локусу гена легкого λ -ланцюга, не може ні ділитись, ні мігрувати, ні перейти на стадію зрілого В-лімфоцита, доки не припиниться експресія гена *miR-650* внаслідок того, що один з алельних локусів гена легкого λ -ланцюга зазнає репресії, інший – успішного реаранжування (під час перебудови локусу ділянка ДНК з геном даної miRNA втрачається).

Фланкуючі ділянки більшості генів та псевдогенів V_H -фрагментів містять сайти зв'язування транскрипційних факторів Pu.1, Pax5, EBF, Ikaros, NF- κ B, NF-AT, Oct, LEF1, сімейства E-протеїнів. Особливо поширеними виявились сайти зв'язування фактора Pu.1 та E-протеїнів, і оскільки сайти інших факторів не настільки розповсюджені, можна припустити, що для початку смислової транскрипції на ранніх стадіях лімфопоезу з метою швидкого звільнення досить протяжного локусу від

маркерів репресії потрібна велика кількість сайтів факторів Pu.1 та E-протеїнів, тоді як для підтримання транскрипції у локусі впродовж наступних стадій лімфопоезу достатня присутність значно меншої кількості сайтів факторів, які діють впродовж цих стадій.

На відміну від локусів генів важких ланцюгів, фланкуючі ділянки лише окремих генів легких V_k - та V_λ -фрагментів містять сайти зв'язування факторів сімейства E-протеїнів, NF- κ B, LEF1. Таким чином, у даних локусах перед алельним виключенням не відбувається тотальне деметилювання ДНК тому, що вони не зазнають достатньо активної транскрипції, оскільки не містять великої кількості сайтів зв'язування транскрипційних факторів. Очевидно, у локусах генів легких ланцюгів імуноглобулінів деметилювання повинна зазнавати лише ділянка, відповідальна за їхнє алельне виключення (імовірно та, що містить вищезазначені гени miRNA).

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА НА ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

ГАРМАЗА Ю. М., КОЗЛОВА Н. М., СЛОБОЖАНИНА Е. И.

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси», Минск;
e-mail: garmaza@yandex.ru*

Цель работы – выяснить, влияют ли ионы цинка на изменение структурного состояния поверхности мембран эритроцитов человека.

В работе использована кровь здоровых доноров в консерванте «глюгицир». Изменение структурного состояния поверхности мембран эритроцитов оценивали по степени экспонирования NH_2 -групп с использованием флуоресцентного зонда флуорескамина (Seriva). Перераспределение фосфатидилсерина оценивали с помощью FITC – конъюгированного рекомбинантного Annexin V (Beckman Coulter). Жизнеспособность эритроцитов контролировали по интенсивности флуоресценции кальцеина AM (Sigma).

Показано, что 2-часовая инкубация эритроцитов человека с субгемолитическими концентрациями сульфата цинка 0,01–0,1 мМ приводит к дозозависимому увеличению NH_2 -групп на поверхности мембран (~ на 30% при 0,1 мМ Zn^{2+}). Параллельно было обнаружено, что в эритроцитах, подвергшихся воздействию Zn^{2+} , не наблюдается изменения интенсивности флуоресценции кальцеина AM по отношению к контролю, т.е. образование дополнительных NH_2 -групп после воздействия Zn^{2+} не влияет на жизнеспособность клеток. Для оценки количества эритроцитов, на поверхности которых произошла экспозиция фосфатидилсерина после обработки 0,01–0,1 мМ Zn^{2+} , нами был использован аннексин V, который быстро и селективно связывается с фосфатидилсерином, находящимся на внешнем монослое липидов плазматической мембраны. Установлено, что воздействие Zn^{2+} в исследуемых концентрациях незначительно повышает процент аннексин-меченных эритроцитов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что краткосрочное воздействие 0,01–0,1 мМ ионов цинка на эритроциты человека *in vitro* приводит к экспонированию NH₂-групп на поверхности мембран клеток, но этот процесс не связан с изменением жизнеспособности клеток и перераспределением фосфатидилсерина на внешний монослой липидного бислоя эритроцитарной мембраны. Известно, что флуорескамин связывается с аминокруппами как протеинов, так и липидов. Таким образом можно заключить, что при действии ионов цинка на эритроциты человека происходит изменение структурного состояния поверхностных мембранных протеинов и липидов.

ПРОГРЕССИЯ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

¹ГАРМАНЧУК Л. В., ¹НЕПИЙВОДА К. Д., ²СКАЧКОВА О. В.,
²ХРАНОВСКАЯ Н. Н.

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Украина;

²Национальный институт рака, Киев, Украина

Известно, что прогрессия опухолевых клеток обеспечивается их неконтролируемой пролиферацией в первичных опухолях и метастатических узлах в условиях гипоксии и дефицита питательных веществ. В злокачественно трансформированных клетках активируется аутокринный механизм регуляции пролиферации опухолевых клеток, что способствует выживаемости клеток в таких условиях. Также важным свойством опухолевых клеток является их субстратнезависимая способность роста и формирование микросфероидов.

Целью настоящей работы было сравнительное исследование выживаемости, пролиферативной активности, про- и антиапоптотической активности и адгезионных свойств опухолевых клеток в условиях их роста в безсывороточной среде.

Для исследования использовали клетки линии рака молочной железы MCF-7, которые культивировали двое суток после достижения 100% плотности в монослое и выхода клеток в «стационарную» фазу роста в сфероидах в безсывороточных условиях. В качестве контроля для обеих моделей роста, использовали показатели культивирования клеток в полной ростовой среде. По окончании срока культивирования анализировали выживаемость клеток, апоптотический индекс, клеточный цикл и адгезионные свойства клеток.

Было выявлено, что выживаемость опухолевых клеток в условиях дефицита питательных субстратов выше в сфероидной культуре. На это указывает показатель количества живых клеток (80% в сфероидах и 67% в монослое). Свыше 70% клеток популяции сфероидов переходили в фазу G1/G0, в то время как при монослойном росте этот показатель ниже на 25%. Уровень апоптоза в монослойной культуре при дефиците субстратов выше в 2,2 раза по сравнению со сфероидной культурой. Также зафиксировано снижение адгезионных свойств в сфероидах на 25% по сравнению с контролем и повышение показателя прикрепленных клеток в монослойной культуре на 30%. Статистически значимыми были данные при $P < 0,05$.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о более высоком уровне прогрессии опухолевых клеток в сфероидах в сравнении с субстратзависимым монослойным ростом при дефиците ростовых факторов.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС ПРИ НАГРУЗКЕ ХЛОРИДОМ МАРГАНЦА И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ РАСТИТЕЛЬНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ

ГОНЧАРЕНКО А. В., ГАНУСОВА Г. В., ОХРИМЕНКО С. М.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: valeolog@univer.kharkov.ua*

Цель работы – изучение влияния ионов марганца на содержание ТБК-активных продуктов, интенсивность аскорбатзависимого пероксидного окисления липидов (ПОЛ), активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) в печени крыс, степень спонтанного гемолиза эритроцитов, а также возможную коррекцию токсического действия марганца путем введения сиропа «Валеотон».

Исследование проводили на крысах-самцах линии Вистар массой 180–250 г, которым вводили внутримышечно в дозе 5 мг/100г массы тела $MnCl_2$ в 0,9%-ом растворе NaCl. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Третьей группе крыс после инъекций $MnCl_2$ ежедневно вводили в желудок с помощью зонда по 0,5 мл сиропа «Валеотон», представляющего собой экстракт из 27 лекарственных растений без консервантов (Декларац. патент України №37554А, заявл. 05.11.1999, заявка № 99116083, кл. МПК А23L1/09. Спосіб приготування сиропу «Валеотон»/М. С. Гончаренко, І. Е. Шмараєва, О. В. Гончаренко, К. П. Лемешко/заявн.; Гончаренко М. С.; Опубл. 15.05.2001; Бюл. № 4).

Исследование нагрузки хлоридом марганца выявило достоверное увеличение спонтанного гемолиза эритроцитов. Этот процесс сопровождается достоверным увеличением активности АЛТ в печени крыс, что свидетельствует о нарушении функциональной активности гепатоцитов и об увеличении (а, возможно, и повреждении) их мембранной проницаемости. Также снижается содержание гликогена в печени и повышается содержание свободных жирных кислот (СЖК) в крови, что является свидетельством активирования глюконеогенеза. На вторые сутки после введения $MnCl_2$ наблюдается достоверное повышение содержания ТБК-активных продуктов и интенсивности аскорбатзависимого ПОЛ.

Введение сиропа «Валеотон» одновременно с хлоридом марганца производит защитный эффект. Так, активность АЛТ снижается до величин нормы, уменьшается уровень спонтанного гемолиза и концентрация СЖК в крови. Повреждающее действие марганца на функциональную активность биомембран уменьшается, о чем свидетельствует снижение содержания ТБК-активных продуктов и интенсивности аскорбатзависимого ПОЛ.

**CORRECTION OF OXIDATIVE PROCESSES
IN MITOCHONDRIA OF LYMPHOMA NK/Ly CELLS
BY *IN VIVO* TREATMENT WITH VINBLASTINE**

HORBAY R. O., MANKO B. O., MANKO V. V., STOIKA R. S.

*Ivan Franko Lviv National University, Ukraine;
e-mail: rosthor@gmail.com*

Vinblastine is known to cause transformation of many tumor cells to giant cells. In the last decade, a significant increase in a number of articles devoted to giant cell transformation was observed. It was found that murine NK/Ly lymphoma cells undergo such transformation after vinblastine treatment (Lootsik MD, Stoika RS and co-workers). In 1924, Otto Warburg postulated a hypothesis that cancer cells prefer anaerobic respiration to Krebs cycle. However, up to now there were no articles describing respiration of giant cancer cells.

The aim of our study was to evaluate mitochondrial respiration of giant murine NK/Ly lymphoma cells.

To obtain giant cell population, murine NK/Ly lymphoma cells were inoculated intraperitoneally (25 million cells per mouse) into C57 black 4-month mice. Animal weighting was performed every 24 hours. On the 7-10th day when the weight increased by 50-60%, mice got drained. Three days before drainage, we inoculated 1% vinblastine solution (maximum 50 µg). The mean value of cell sizes (average diameter) took 12 µm for intact and 25 µm for giant vinblastine treated cells. Cell suspension (approximately 5·10⁶ cells/ml) was washed twice from the ascitic fluid with solution containing KCl – 90.0 mM, NaCl – 15.0 mM, KH₂PO₄ – 2 mM, MgCl₂ – 1.0 mM, HEPES – 10.0 mM, EGTA – 0.5 mM, pH 7.2. Respiration rate was measured at 37 °C using intact and digitonin-permeabilized NK/Ly cells by the polarographic method with Clark oxygen electrode. Optimal concentration of digitonin was determined experimentally using trypan blue test and measurement of LDH release. Respiration was stimulated with α-ketoglutarate (1 mM), succinate (0.35 mM) and ADP (0.75 mM).

After vinblastine treatment, endogenous intact cell respiration rate increased from 0.12±0.01 ng-at. O / sec·10⁶ cells to 0.33±0.06 ng-at. O / sec·10⁶ cells (*n* = 6, *P* ≤ 0.01). Complete permeabilization of intact NK/Ly cells was achieved by their treatment with 20 µg/ml and 150 µg/ml of digitonin for giant cells. This caused a significant decrease in the endogenous respiration of both normal and giant cells. An addition of succinate or α-ketoglutarate to intensify respiration of the permeabilized intact and giant cells, consecutive ADP addition stimulated respiration in giant cells significantly more than in intact cells (*n* = 6, *P* ≤ 0.01). This may be considered as a result of higher respiration-phosphorylation coupling in giant cells, as compared to control.

Vinblastine treatment *in vivo* leads to correction of mitochondrial oxidative phosphorylation in the NK/Ly cells. The molecular mechanisms of such vinblastine effect needs further investigation. This study was partly supported by the WUBMRC grant awarded to Horbay R.

**ІНТЕНСИВНІСТЬ БІОСИНТЕЗУ ПРОТЕЇНІВ,
ВУГЛЕВОДІВ ТА ЛІПІДІВ У *Chlorella vulgaris* Beijer
ЗА ДІЇ ІОНІВ ЦИНКУ І СВИНЦЮ**

ГОРДА А. І., ГРУБІНКО В. В.

*Тернопільський національний педагогічний університет, Україна;
e-mail: hiazunt@mail.ru*

Мікрowodорості – одні з найбільш чутливих організмів до дії токсичних речовин, включно важких металів. Вивчали вплив іонів цинку (мікроелемент) і свинцю (токсикант) на біосинтез протеїнів, ліпідів і вуглеводів в одноклітинній водорості *Chlorella vulgaris* Beijer. В експерименті до культури додавали солі Zn^{2+} – 5 мг/л, і Pb^{2+} – 0,5 мг/л (тривалість дії – 1–7 діб). Інтенсивність біосинтезу оцінювали за включенням $[1-^{14}C]$ -ацетату та $[1-^{14}C]$ -бікарбонату натрію при 20 °С і освітленні 2500 лк. Протеїни, ліпіди та вуглеводи осаджували, промивали і вимірювали радіоактивність (LS-100С «Beckman» (США)).

Збільшення вмісту вуглеводів майже на 10% за рахунок включення бікарбонату спостерігали у разі впливу на хлорелу іонів цинку протягом трьох діб та іонів свинцю протягом першої доби дії, після чого інтенсивність процесу зменшувалася до контрольних значень або нижче них.

Накопичення протеїнів майже на 10% за рахунок включення бікарбонату мало місце за дії іонів цинку та свинцю (3 доби). У разі збільшення тривалості інкубації водоростей з металами до 7 діб вміст протеїнів стабілізується на рівні значень у контролі.

Зміни вмісту вуглеводів і протеїнів вважаємо первинною реакцією клітин водоростей на стресорну дію металів.

Включення ^{14}C -ацетату і ^{14}C -бікарбонату в ліпіди за дії іонів обох металів збільшується протягом усього періоду культивування водоростей: ^{14}C -ацетату за дії Zn^{2+} збільшується в 1,6 раза порівняно з контролем на 3-ю добу, в 2,2 рази – на 7-у; при дії Pb^{2+} – зростає в 2,0, 1,8 і 1,6 раза на 1-у, 3-ю і 7-у доби відповідно. Включення ^{14}C -бікарбонату в ліпіди при дії Zn^{2+} збільшується в 1,6 і 2,0 раза порівняно з контролем на 1-у і 7-у доби; Pb^{2+} – в 1,3; 1,5 і 1,2 раза на 1-у, 3-ю і 7-у доби відповідно. За дії цинку інтенсивність включення в ліпіди обох субстратів зростає зі збільшенням тривалості іншого впливу, а за дії іонів свинцю максимальне включення субстратів спостерігається протягом 1–3 діб, після чого інтенсивність процесу знижується. Виявлено зворотну залежність між інтенсивністю включення мітки в ліпіди та вмістом хлорофілу, що пов'язуємо з відомим для водоростей фактом посилення за стресового впливу ліпідсинтезної функції каротиноїдів (О. А. Rozentsvet et al., 2004).

Під впливом іонів важких металів відбувається активна структуризація метаболізму, що забезпечує підтримку клітинних структур і адаптацію до нових умов існування.

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА
Ca²⁺-ИНДУЦИРОВАННОГО ВЫБРОСА Ca²⁺
ИЗ САРКОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА
ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКИ**

ГОРЧЕВ В. Ф., КАРАХИМ С. А., ЖУК П. Ф.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: laserlab@biochem.kiev.ua*

Процесс сокращения-расслабления мышц зависит от концентрации свободного Ca²⁺ в цитозоле, поэтому изучение механизмов накопления Ca²⁺ в мышечной клетке и его удаления из нее является важным для понимания процессов мышечного сокращения и расслабления. Хотя и было проведено большое количество экспериментальных и теоретических работ, остается много неясных вопросов относительно процессов, которые сопровождают накопление Ca²⁺ в цитозоле, особенно в процессе Ca²⁺-индуцированного выброса Ca²⁺ (CICR) из ретикулума и в процессе входа Ca²⁺ в клетку через каналы SOC (store-operated channels), вызванного уменьшением запасов Ca²⁺ в саркоплазматическом ретикулуме (SR). Последний процесс носит название sarco-saracitative calcium entry (SCE).

Нами была разработана математическая модель кальциевого гомеостаза в гладкомышечной клетке, основанная на следующих представлениях:

1. гладкомышечная клетка окружена плазматической мембраной (PM), в которой присутствуют кальциевые каналы и кальциевый насос;

2. в клетке находится определенное число пузырьков SR. В мембране каждого пузырька SR присутствует постоянное число кальциевых каналов и кальциевый насос;

3. в стационарном состоянии существует небольшой постоянный поток Ca²⁺ внутрь клетки через закрытые кальциевые каналы PM и SR (т.н. медленный базальный поток Ca²⁺), который компенсируется его откачкой из цитозоля во внеклеточное пространство кальциевыми насосами PM и SR

4. на поверхности пузырьков SR расположены рецепторы, связывающие цитозольный Ca²⁺, в результате чего кальциевые каналы SR открываются, значительно увеличивая свою пропускную способность.

В результате проведенных исследований показано, что:

а. изменение концентрации цитозольного Ca²⁺ имеет сложную, нелинейную зависимость от времени, при этом основной вклад в увеличение его концентрации дает выброс Ca²⁺ из SR. В результате выравнивания потоков Ca²⁺ в цитозоль и обратно процесс накопления Ca²⁺ в цитозоле прекращается. Процесс CICR полностью определяется непосредственно самим Ca²⁺;

б. процесс, который можно интерпретировать, как перезаполнение SR ионами кальция, может протекать за счет медленного базального потока Ca²⁺ в цитозоль из внеклеточного пространства через закрытые кальциевые каналы PM. Этот процесс, напоминающий SCE, но не нуждающийся в отдельном типе кальциевых каналов — SOC-каналов — имеет исключительно кинетическую природу: поток Ca²⁺ из внеклеточной среды через цитозоль в SR вызван тем, что существует небольшой избыток Ca²⁺ во внеклеточном пространстве (по сравнению с базальным уровнем)

и недостаток Ca^{2+} в цитозоле и SR, что обуславливает появление движущей силы для переноса Ca^{2+} из внеклеточного пространства в цитозоль и из цитозоля в SR, причем этот процесс осуществляется (благодаря особенностям кинетики процесса) при концентрации цитозольного Ca^{2+} близкой к базальной.

РІВЕНЬ ЦИТОЗОЛЬНОГО Ca^{2+} У НОРМАЛЬНИХ І ТРАНСФОРМОВАНИХ Т-КЛІТИНАХ ЗА ДІЇ ПОЗАКЛІТИННОГО АТР ТА ФУЛЕРЕНІВ C_{60}

*ГРЕБНІК С. М., ГРИНЮК І. І., ПРИЛУЦЬКА С. В.,
МАТИШЕВСЬКА О. П.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: grebник_z@yahoo.com*

Позаклітинний АТР (АТР_0) залучений до регуляції багатьох процесів у клітинах імунної системи, зокрема дозрівання тимоцитів, цитолізу, апоптозу або неопластичної трансформації периферійних Т-лімфоцитів. Важливу роль у такій регуляції відводять родині АТР_0 -керованих пуринергічних Р2-рецепторів, активація яких супроводжується відкриванням катіонних каналів та підвищенням неспецифічної проникності плазматичної мембрани або ж активацією IP_3 -залежних рецепторів-каналів ЕПР, внаслідок чого зростають концентрації цитозольного Ca^{2+} та змінюється швидкість клітинної проліферації. Експресію представників Р2-рецепторів підтверджено в тимоцитах, Т-лімфоцитах крові, лейкомічних Т-лімфоцитах. Метою роботи було оцінити вплив позаклітинного АТР на рівень цитозольного Ca^{2+} у клітинах, активність екто-АТР-ази, яка контролює час існування АТР у позаклітинному просторі та оцінити можливість модифікації цих показників із застосуванням нанорозмірних вуглецевих структур фулеренів C_{60} , яким властиві мембранотропні ефекти.

Досліди виконано на нормальних (ізолювані тимоцити щурів лінії Вістар) та трансформованих (лінія МТ-4 лейкозу) Т-клітинах. Концентрацію вільного цитозольного Ca^{2+} вимірювали у клітинах, навантажених індо-1 або фура-2. Активність екто-АТР-ази вимірювали спектрофотометрично за швидкістю розщеплення АТР. У роботі використано стабільні колоїдні розчини фулеренів C_{60} (чистотою 95%), синтезовані у Технічному університеті Ільменау (Німеччина).

У клітинах обох типів не зафіксовано зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ після додавання АТР у безкальцієве середовище інкубації. Однак у Ca^{2+} -вмісному середовищі спостерігається підвищення показника, яке не пригнічується інгібітором фосфоліпази С – неомицином – і є набагато більше у клітинах МТ-4, ніж у тимоцитах, що вказує на значний АТР_0 -індукований вхід катіону через плазматичну мембрану трансформованих Т-клітин. Показано, що Т-клітинам лінії МТ-4 властивий значно вищий рівень екто-АТР-азної активності, більша спорідненість ензиму до активуючих іонів Mg та Ca, а також до субстрату порівняно з тимоцитами. Припускається, що такі особливості функціонування екто-АТР-ази можуть сприяти швидкій деградації АТР_0 та попередженню загибелі онкотрансформованих Т-лімфоцитів через неконтрольований вхід Ca^{2+} .

Встановлено, що фулерени C_{60} у концентрації 14,4 мкг/мл не впливають на екто-АТР-азну активність клітин МТ-4, але пригнічують екто-АТР-азну активність тимоцитів, знижуючи величину V_0 реакції на 58%, що може бути зумовлене відмінностями у розподілі фулеренів C_{60} у ліпідному бішарі та у швидкості проникнення їх у Т-клітини різних типів. Ще одна можлива причина модифікації проведення індукованого позаклітинним АТР Ca^{2+} -сигналу за дії фулеренів C_{60} – це вплив наноструктур на кальцієву проникність клітинних мембран. Встановлено, що фулерени C_{60} спричинюють швидкий вхід позаклітинного Ca^{2+} у Т-клітини, можливо, формуючи пори у плазматичній мембрані. Виявлено також, що фулерени C_{60} спричиняють підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у Т-клітинах і в умовах інкубації їх у безкальцієвому середовищі, тобто здатні вивільнювати Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо.

**ВМІСТ ПРОДУКТІВ ПЕРОКСИДНОГО
ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ І АКТИВНІСТЬ
АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМІВ У ТКАНИНАХ
КУРЕЙ–НЕСУЧОК ЗА РІЗНОГО РІВНЯ
ВІТАМІНУ D_3 В РАЦІОНІ**

ГУДИМА В. Ю., ЯНОВИЧ В. Г.

*Інститут біології тварин НААНУ, Львів;
e-mail: volgudyma@gmail.com*

Тривалий час вплив вітаміну D_3 в організмі курей-несучок в основному пов'язували із засвоєнням кальцію і фосфору та їхнім регуляторним впливом на метаболізм у кістковій тканині й у яйцепроводі під час формування шкаралупи яєць. В останні роки з'явилися дані про вплив вітаміну D_3 на вміст ліпідів і їхній жирнокислотний склад у крові і тканинах курей-несучок у разі підвищення рівня вітаміну D_3 в раціоні. У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідження впливу різних доз вітаміну D_3 в раціоні курей-несучок на вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) у крові і тканинах (печінці, яйцепроводі, скелетних м'язах) птиці за різного рівня вітаміну D_3 в раціоні. Така мета роботи зумовлена ініціацією пероксидних процесів у тканинах курей-несучок за підвищення вмісту поліненасичених кислот у складі ліпідів.

Дослід проведено на трьох групах курей-несучок породи Хайсекс коричневий в умовах птахофабрики. Вміст вітаміну D_3 в раціоні курей-несучок першої, другої і третьої груп становив відповідно 2500, 5000 (норма) і 7500 ІО/кг комбікорму. Через 30 днів курей-несучок забивали шляхом декапітації і в одержаних від них зразках крові, печінки, яйцепроводу і грудних м'язів визначали вміст дієнових кон'югатів, гідропероксидів ліпідів і продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активних продуктів) та активність супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і каталази.

Встановлено, що вміст всіх досліджуваних продуктів ПОЛ у крові, вміст дієнових кон'югатів у печінці, ТБК-активних продуктів у яйцепроводі і скелетних м'язах курей-несучок першої групи вірогідно більший ніж у курей-несучок другої і третьої груп. В останніх різниці вмісту продуктів ПОЛ у крові і тканинах невір-

гідні. При цьому активність глутатіонпероксидази у крові, печінці, яйцепроводі і скелетних м'язах курей-несучок першої групи вірогідно нижча порівняно з активністю їх у курей-несучок другої і третьої груп. Із цих даних випливає, що дефіцит вітаміну D₃ в раціоні курей-несучок приводить до посилення пероксидних процесів в їхньому організмі внаслідок зниження активності глутатіонпероксидази, а надлишок вітаміну D₃ суттєво не впливає на ці показники.

ОБМЕН АМИНОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

ГУДКОВА О. А., ЛАТЫШКО Н. В.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: ogudkova@biochem.kiev.ua*

В ответ на стресс в крови резко повышается уровень адреналина. В результате окислительного дезаминирования этого амина при участии аминоксидаз генерируются альдегиды и пероксид водорода. В свою очередь ферменты-антиоксиданты поддерживают физиологический уровень активных форм кислорода. Таким образом, метаболизму аминов может принадлежать важная роль связующего звена между реакциями свободнорадикального окисления и обменом одноуглеродистых соединений. В модельном опыте *in vivo* на крысах, влияя на метаболизм альдегидов с помощью их акцептора семикарбазида, мы исследовали поведение моноаминоксидаз (MAO) и семикарбазидчувствительной аминоксидазы (SSAO) как прооксидантов, а также ключевых антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы и каталазы. Суточные дозы реагента, который вводился крысам перорально в хроническом или в остром опыте, составляли 6,7 ммоль/кг и 1,8 моль/кг массы крыс. Семикарбазид подавляет активность как аминоксидаз, так и антиоксидантных ферментов, что явилось причиной оксидативного стресса. Об этом свидетельствует двукратное увеличение количества свободных радикалов в крови и двукратное увеличение уровня окислительной модификации протеинов в крови и печени крыс при использовании миллимолярной и молярной дозы соответственно. Наблюдается значительная корреляция между изменениями активности антиоксидантных ферментов и активностью SSAO, что свидетельствует о взаимосвязи этих метаболических путей. Кроме того, SSAO, локализованной в плазматической мембране с активным центром, экспонированным наружу, и генерирующей активные формы кислорода и альдегиды как сигнальные молекулы, может принадлежать важная роль в инициации сигнала тревоги в условиях стресса с целью мобилизации защитных ресурсов клетки.

**МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТКАНЕЙ
КАРАСЯ СЕРЕБРЯНОГО *Carassius auratus* В УСЛОВИЯХ
ТЕМПЕРАТУРНОЙ АККЛИМАЦИИ**

*ГУЛЕВСКИЙ А. К., ГРИЩЕНКОВА Е. А., РЕЛИНА Л. И.,
ПОГОЖИХ Е. Г.*

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: lianaisaakovna@rambler.ru*

Исследовано изменение биохимических характеристик различных тканей карася серебряного *Carassius auratus* под влиянием сезонной акклимации, смены температурных условий и низкомолекулярных соединений из ткани мозга холодоадаптированных «зимних» рыб.

Было показано, что спектр протеинов тканей *C. auratus* претерпевает сезонные изменения, которые проявляются в появлении протеинов с молекулярной массой 205 кДа в красных мышцах, миокарде и протеина с молекулярной массой 172 кДа в печени рыб в зимний период.

Обнаружено, что на состав протеинов оказывает влияние как сезон, так и температура содержания, поскольку после 2-недельной акклимации при 20–22 °С в зимний период протеиновые спектры красных мышц, миокарда и печени рыб не отличаются от таковых в летний период, а в весенний период у рыб, содержащихся при температуре 4–5 °С, только в красных мышцах сохраняется протеин с молекулярной массой 205 кДа, характерный для зимних условий.

Резкая смена температуры с 20–22 до 4–5 °С в летний период приводит к гибели рыб в течение 3–5 суток, что сопровождается существенным снижением активности ЛДГ в направлении пируват → лактат. После акклимации при 4–5 °С активность ЛДГ составляет в белых мышцах всего лишь 11,7 и 13,2% относительно «летнего» и «зимнего» значений соответственно, а в красных мышцах — 20 и 15,2% относительно «летнего» и «зимнего» значений соответственно. Содержание лактата после холодовой акклимации рыб в летний период значительно повышено в обоих типах мышц по сравнению с контролем. При этом количество АТФ сохраняется на прежнем уровне.

В ткани мозга холодоадаптированных «зимних» рыб выявлена низкомолекулярная (до 5 кДа) фракция, содержащая регуляторные соединения, контролирующие переход организма на новый физиолого-метаболический режим. Внутривенное введение фракции до 5 кДа (в количестве 4–5 мг на особь со средней массой 30 г) перед помещением рыб в резервуар с водой, температура которой 4–5 °С, способно обеспечивать выживание рыб при холодовой акклимации в летний период.

Введение фракции, выделенной из мозга «зимних» карасей, приводит к значительному снижению уровня АТФ в мышцах, а также к изменениям активности ЛДГ и содержания лактата в направлении нормализации этих параметров.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют о том, что при температурной адаптации карася серебряного *Carassius auratus* происходит перестройка метаболизма, которая регулируется обнаруженными в ткани мозга холодоадаптированных рыб низкомолекулярными соединениями.

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ГІДРОЛАЗ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ СВИНЕЙ ЗА ВПЛИВУ ЕКЗОГЕННИХ ЕНЗИМНИХ ПРЕПАРАТІВ

¹ГУЦОЛ А. В., ²КИРИЛІВ Я. І.

¹Вінницький національний аграрний університет, Україна;
²Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, Україна

Ензимні препарати мікробного походження за функціональною дією аналогічні ензимам травного тракту, проте мають ширший оптимум дії та краще розщеплюють протеїни, вуглеводи, ліпіди і підвищують засвоєння макро- та мікроелементів із рослинних інгредієнтів, які знаходяться у вигляді погано розчинних фітатних комплексів. Ензимні препарати містять комплекс целюлозодеполімеризуючих ензимів.

Застосування їх у складі комбикормів для свиней з переважним вмістом зернових інгредієнтів значно підвищує коефіцієнт перетравлення та всмоктування поживних і біологічно активних речовин в кишково-шлунковому тракті.

У дослідах використовували новий вітчизняний ензимний препарат мацеразу, який компенсує відсутність в організмі свиней ензимів, що здатні гідролізувати рослинні некрохмальні полісахариди, розчеплює міжклітинну структуру рослинної сировини та сприяє вивільненню поживних і біологічно активних речовин.

Визначали активність глюкоамілази, гліцинлейциндипептидази, загальної протеолітичної та ліполітичної активності в гомогенаті слизової оболонки, слизових нашаруваннях і хімосі 12-типалої кишки.

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що найвищу активність досліджуваних груп гідролаз виявляють слизові нашарування.

Загальна протеолітична і глюкоамілазна активність у хімосі була нижчою порівняно із слизовими нашаруваннями і гомогенатом слизової оболонки, активність дипептидаз в якому була приблизно на рівні активності у слизових нашаруваннях, а у хімосі нижче.

Що стосується ліполітичної активності гідролаз, то нами не виявлено суттєвих змін в 12-типалій кишці. Встановлено, що активність глюкоамілази вище у слизових нашаруваннях, ніж у хімосі. Суттєвих міжгрупових різниць не виявлено.

Отже, істотного впливу на активність гідролітичних ензимів екзогенний ензимний препарат «мацераза» не виявляв. Проте спостерігалася значна продуктивна дія, зокрема жива маса поросят, які отримували ензимний препарат, була вище в середньому на 20%, а витрати кормів на одиницю приросту знижувалися на 16–18%, що, на наш погляд, в першу чергу пов'язано з підвищенням трансформації поживних та біологічно активних речовин корму в продукцію живої маси.

ВПЛИВ ЛІПІДІВ РАЦІОНУ ЩУРІВ НА ВМІСТ N-6 ТА N-3 ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ У ЛЕЙКОЦИТАХ

¹ДІДОВИЧ А. П., ^{1,2}ВУДМАСКА І. В., ²ВІЩУР О. І.

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, Україна;

²Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: adidovych@ukr.net

Більшість наявних у клітинах жирних кислот входить до складу двох ліпідних структур – клітинних мембран та цитоплазматичних жирових включень. Особливістю жирових включень лейкоцитів є високий вміст поліненасичених жирних кислот. Очевидно вони не виконують функції енергетичного депонування, а служать резервом попередників синтезу ейкозаноїдів. Кількість жирових включень у лейкоцитах зростає за стимулювання імунної функції.

Дослід проведено на трьох групах щурів, по 10 особин у групі. Тварини отримували стандартний корм, що містив 5% жиру. Жировим компонентом раціону тварин 1-ї групи була соняшникова олія, 2-ї – ріпакова олія, а 3-ї – риба'чий (трісковий) жир.

Міжгрупових різниць за міристиною, пальмітиною, стеариною, олеїною, лінолевою та ліноленою кислотами у лейкоцитах не виявлено, незважаючи на значні відмінності у вмісті цих кислот у плазмі крові. У лейкоцитах щурів 2-ї групи було менше, ніж у лейкоцитах щурів 1-ї групи арахідонової (20:4 n-6) та більше ейкозапентаєнової (20:5 n-3) кислоти, тоді як для докозапентаєнової (22:5 n-3) та докозагексаєнової (22:6 n-3) кислот різниці не виявлено. Лейкоцити щурів 3-ї групи відрізняються від лейкоцитів щурів 1- та 2-ї груп меншим вмістом арахідонової кислоти та більшим вмістом ейкозапентаєнової, докозапентаєнової та докозагексаєнової кислот. Кількість ейкозапентаєнової, докозапентаєнової та докозагексаєнової кислот у них була у 6,2; 3,4 і 2,3 раза більшою, ніж у лейкоцитах щурів 1-ї групи та у 4,2; 4,1 і 2,1 раза більшою порівняно з лейкоцитами щурів 2-ї групи. Різниця за арахідоновою кислотою в лейкоцитах щурів 3-ї групи не така значна, її кількість порівняно з лейкоцитами щурів 1-ї та 2-ї груп менша у 1,6 і 1,2 раза. Співвідношення n-6/n-3 в лейкоцитах щурів 1-, 2- та 3-ї груп: 14,38; 9,69 і 4,24, тоді як у плазмі крові ці показники становлять лише 8,93; 4,90 і 1,89. Таким чином, ліпідний склад раціону впливає на жирнокислотний склад лейкоцитів, що може мати значення для регуляції імунної відповіді.

ФОРМАЛЬДЕГІД МОДУЛЮЄ ЦИТОПРОТЕКТОРНУ ДІЮ АЗИДОТИМІДИНУ НА ТИМОЦИТИ ЩУРІВ

ДМИТРЕНКО М. П., КИШКО Т. О.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: dmitrenko@biochem.kiev.ua*

Азидотимідин (АЗТ), як один із нуклеозидних аналогів інгібіторів оборотної транскриптази (NARTIs), широко використовується в хіміотерапії хворих на СНІД. За тривалого використання АЗТ виникають значні побічні ефекти, які охоплюють широкий спектр патологічних змін в організмі та обмежують дози і тривалість використання цього препарату.

У пошуку засобів, що ефективно протидіють ускладненням, нашу увагу привернув формальдегід (ФА). Він утворюється у процесі клітинного метаболізму та є його регулятором. Існують дані про захисну дію ФА в концентраціях, близьких до фізіологічних, на клітини міокарда і головного мозку при ішемічних станах, а також за консервації тканин.

У досліджах *in vitro* на тимоцитах щурів досліджено цитопротекторну дію ФА, його донорів (тіопроліну, форміату та уротропіну) на загибель клітин, що індукована АЗТ.

У разі нетоксичних для тимоцитів концентрацій (0,05 мМ, 0,1 мМ) формальдегід значно (на 47%) зменшує індуковану АЗТ загибель клітин. З підвищенням концентрації формальдегіду його цитопротекторний ефект зменшується, а при концентраціях вище 0,4 мМ він потенціює цитотоксичну дію азидотимідину.

Додавання в середовище інкубації тимоцитів акцептора ФА – димедону значно знижує як цитопротекторну дію (низьких концентрацій ФА), так і цитотоксичну дію формальдегіду (високих концентрацій ФА).

Тіопролін, форміат і уротропін також виявляють цитопротекторний ефект за дії АЗТ, який знімається димедоном.

Таким чином, в умовах цитотоксичної дії азидотимідину, формальдегід та його донори (тіопролін, форміат та уротропін) в нетоксичних для клітин концентраціях виявляють цитопротекторну дію, яка знімається акцептором ФА – димедоном.

ОБМЕН ФОРМАЛЬДЕГИДА И ОКСИДА АЗОТА ПРИ СЕМИКАРБАЗИДНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

*ДМИТРЕНКО Н. П., ШАНДРЕНКО С. Г., ПЕТРУНЬ Л. М.,
КИШКО Т. О., СИЛОНОВА Н. В., ЛАТЫШКО Н. В.,
СУШКОВА В. В.*

*Інститут біохімії ім. А. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: dmytrenko@biochem.kiev.ua*

Все более очевидно, что одним из ведущих патогенетических факторов, формирующим многие заболевания, является гиперпродукция альдегидов. Альдегиды, будучи намного устойчивей, чем АФК, и способными к диффузии через клеточные

мембраны, могут осуществлять модификацию нуклеиновых кислот и посттрансляционные необратимые превращения протеинов в конечные продукты гликирования (AGE) и липоксигенирования (ALE). Среди эндогенных альдегидов формальдегид (ФА) отличается способностью легко образовывать аддукты и сшивки в макромолекулах. Метаболизм ФА тесно взаимосвязан с метаболизмом оксида азота (NO) через глутатионзависимую формальдегиддегидрогеназу (АДГЗ), семикарбазидчувствительную аминоксидазу (SSAO), NO-синтазы, метаболизм тиопролина и др. Для профилактики и лечения заболеваний, связанных с гиперпродукцией альдегидов, используются ингибиторы синтеза и акцепторы альдегидов. В частности, заслуживает внимания семикарбазид, который через карбонильные группы активных центров ингибирует лизилоксидазу и SSAO, участвующие в метастазировании опухолей.

В настоящей работе субхроническое введение семикарбазида использовалось для устранения формальдегида в организме с тем, чтобы выявить взаимосвязь между обменами ФА и NO, а также состоянием оксидантно-антиоксидантной системы. Опыты проведены на белых крысах массой 55–65 г, которые в течение 45 суток пили воду с 0,075% семикарбазида. Определяли: активность SSAO, каталазы и супероксиддисмутазы в тканях легких, сердца и печени; содержание ФА, GSH, мочевой кислоты, ПОЛ и ДНК-протеиновые сшивки ядерной фракции, активность АДГЗ и ксантиноксидазы в ткани печени; ЕПР-спектроскопические характеристики образцов крови и ткани печени; содержание нитритов, нитратов, мочевины и формиата в крови и моче.

Установлено, что при патологическом состоянии, сформированном под влиянием семикарбазида, в организме крыс значительно усиливаются процессы образования свободных радикалов, активных форм кислорода и NO на фоне уменьшения уровня альдегидов, что связано с акцепторными свойствами семикарбазида, а также с торможением синтеза формальдегида и ускорением его превращения в формиат. Результаты исследования также указывают на то, что формальдегид играет существенную роль в формировании соединительнотканых патологий.

ІМУНОБІОЛОГІЧНИЙ СТАТУС КРОВІ ТЕЛИЦЬ ЗА УМОВ ВИПОЮВАННЯ СОЄВОГО МОЛОКА З НАТИВНОЇ ТА ТРАНСГЕННОЇ СОЇ

ДОЛАЙЧУК О. П., ФЕДУК Р. С., КОВАЛЬЧУК І. І., ЦАП М. М.

*Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: Dolaychuk@gmail.com*

Метою нашої роботи було дослідити імунобіологічний статус крові телиць, яким в молочний період випоювали соєве молоко з насіння трансгенної та нативної сої. Для цього було сформовано три групи з новонароджених теличок української червоно-рябої молочної породи, по 8 голів у кожній. Тваринам контрольної групи в молочний період випоювали цільне і збиране молоко за прийнятою в господарстві схемою. Друга та третя дослідні групи одержували замість збираного молока соєве молоко. При цьому телиці другої дослідної групи отримували соєве

молоко виготовлене з бобів трансгенної сої, а тварини третьої групи з нативної сої. За періодами досліджень від тварин із кожної групи, а саме на 2-му місяці (підготовчий період), а також на 4-, 5- і 7-му місяцях життя відбиралися зразки венозної крові для біохімічних досліджень. У крові визначали вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), молекул середньої маси (МСМ), гаптоглобіну, сероглікоїдів, церулоплазміну, фукози, сіалових кислот та гексоз, пов'язаних із протеїнами, а також фагоцитарну активність (ФА), фагоцитарний індекс (ФІ), фагоцитарне число (ФЧ) лейкоцитів.

Внаслідок досліджень встановлено, що вміст МСМ вірогідно зростає на 16,0 та 8,2% відповідно у крові тварин II і III груп порівняно з контролем на 4-му місяці випоювання соєвого молока як із нативної, так і трансгенної сої. У наступні періоди дослідження, на 5-му і 7-му місяцях випоювання, концентрація МСМ вірогідно зростає у крові тварин II групи, яким випоювали соєве молоко з трансгенної сої порівняно з контролем. Концентрація ЦІК впродовж всього періоду дослідження була вищою у крові тварин II і III дослідних груп порівняно до контролю.

Рівень гаптоглобіну та сіалових кислот залишався на рівні контролю в обох дослідних групах. Протягом усього періоду досліджень у крові тварин двох дослідних груп спостерігається тенденція до підвищення концентрації гексоз, зв'язаних з протеїнами, а на 7-му місяці життя, цей показник вірогідно зростає на 18,8% у крові телиць III групи. Вміст фукози у крові телиць, яким випоювали соєве молоко з нативної сої достовірно підвищується на 61% на 5-му місяці життя. На 4-му та 7-му місяцях життя тварин спостерігається тенденція до підвищення рівня фукози у крові телиць обох груп, проте вірогідних змін не спостерігається. Активність церулоплазміну вірогідно підвищується протягом всього періоду досліджень у крові тварин обох дослідних груп. Зокрема, даний показник підвищується у крові тварин II групи на 28, 23 та 14% відповідно на 3-, 5- і 7-му місяцях життя, в той час як у крові телиць III групи цей показник зростає у 1,2 та 1,1 раза на 5- і 7-му місяцях життя відповідно.

Під час визначення ФА лейкоцитів вірогідних змін не спостерігається протягом усього дослідного періоду. Проте такі показники як ФІ та ФЧ вірогідно збільшуються на всіх етапах досліджень у крові тварин обох дослідних груп порівняно з контролем. Зокрема, ФІ вірогідно вище на 9,2 та 11,8% у тварин, яким випоювали соєве молоко із трансгенної сої на 5- та 7-му місяцях відповідно. Тоді як у групі тварин, яким випоювали соєве молоко з нативної сої цей показник достовірно зростає на 17,8, 13,4 та 15,7% відповідно на 4-, 5- та 7-му місяцях життя тварин. Фагоцитарне число лейкоцитів достовірно збільшується на 5- та 7-му місяцях життя тварин обох дослідних груп порівняно з контролем.

Одержані результати можуть свідчити про певний вплив соєвого молока на стан імунної системи організму телиць. Зокрема, вірогідне підвищення вмісту ЦІК, МСМ та тенденція до вищого рівня деяких глікопротеїнів у крові тварин дослідних груп може бути спричинене імуномодулюючими властивостями сої. Вірогідне збільшення ФІ та ФЧ у крові тварин дослідних груп може свідчити про посилення захисних реакцій їхнього організму. Вірогідне підвищення вмісту церулоплазміну у крові телиць дослідних груп підтверджує здатність сої посилювати дію антиоксидантних ензимів.

**ВПЛИВ СПІРОКАРБОНУ ТА ПОХІДНИХ
ПІРОЛОПІРИМІДИНДІОНІВ НА СПОРІДНЕНІСТЬ
ГЕМОГЛОБІНУ ДО ОКСИГЕНУ *IN VITRO***

¹ДУДОК К. П., ²РЕЧИЦЬКИЙ О. Н., ³ШКАВОЛЯК А. В.,
¹СИБІРНА Н. О.

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
²Херсонський державний університет, Україна;
³Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького, Україна;
e-mail: j007@ifp.lviv.ua

Відомо, що спіросполуки та похідні піролопіримідиндіонів проявляють високу біологічну активність. Це було підставою для вивчення впливу таких речовин на компоненти системи периферичної крові. Ми досліджували дію *in vitro* спірокарбону (речовина № 1), та дві – похідні піролопіримідиндіонів: 1,6-диметил-4-феніл-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-е]-піримідиндіон-2,5(1H) (речовина № 2) і 1,6-диметил-4-(2-трифлуорофеніл)-1,2,3,4,5,7-гексагідропіроло-[3,4-е]-піримідиндіон 2,5(1H) (речовина № 3) на активність ензимів антиоксидантного захисту, на резистентність еритроцитів до кислотного гемолітика, на стійкість гемоглобіну до денатуруючих агентів, його пероксидазну активність та спектральні характеристики лігандних форм гемоглобіну. Проведені дослідження певною мірою висвітлюють вплив речовин № 1, № 2 та № 3 *in vitro* на окремі фізико-хімічні та функціональні властивості еритроцитів і гемоглобіну. Однак відкритим залишається питання впливу досліджуваних сполук на функцію гемоглобіну щодо транспорту кисню. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження спорідненості гемоглобіну до кисню за дії речовин № 1, № 2 та № 3 *in vitro*.

У роботі використовували цільну периферичну кров практично здорових донорів. Еритроцитарну масу інкубували у присутності приготованих на ізотонічному розчині NaCl (0,150 M) досліджуваних речовин у співвідношенні 1 : 3. Після одноденної інкубації готували гемолізати, використовуючи 3,3 мМ К,Na-фосфатний буфер, рН 7,36. Спорідненість гемоглобіну до кисню вивчали методом побудови кривих оксигенації цього протеїну. Результати досліджень показали, що параметр P_{50} становить: для гемолізатів еритроцитів крові здорових донорів 3,86–4,12 кПа, для гемолізатів еритроцитів після інкубації з речовиною № 1 знижується до 2,39 кПа, для гемолізатів після інкубації з речовиною № 2 – до 2,66 кПа, а з речовиною № 3 – до 2,92 кПа. Отже, одержані дані дозволяють зробити висновок, що досліджені в роботі сполуки, очевидно, взаємодіють з протеїновим компонентом гемоглобіну, впливаючи, таким чином, на спорідненість останнього до кисню.

ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДОВ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН В ПЕЧЕНИ КАРПА

ЖИДЕНКО А. А., МИЩЕНКО Т. В., ПОЛЕТАЙ В. Н.

*Черниговский национальный педагогический университет
им. Т. Г. Шевченко, Украина;
e-mail: chgpu@chgpu.cn.ua; zaa2006@ukr.net*

В настоящее время к наиболее опасным химическим загрязнителям водной среды относятся пестициды. Печень рыб является главным органом биохимической трансформации ксенобиотиков. В связи с этим, целью нашего исследования было показать влияние структуры и физических свойств гербицидов на метаболизм липидов в печени карпа. Количество рыб – более ста особей, используемые гербициды 2 и 4 ПДК (предельно допустимые концентрации): раундап (0,04 мг/дм³) и зенкор (0,2 мг/дм³). Действующее вещество раундапа – глифосат, хорошо растворим в воде (1,2 г в 100 г воды при 25 °С), значение Log P = -2,36 ± 0,64 доказывает высокую скорость его проникновения в организм рыб. Уже на 7-е сутки действия раундапа (2 ПДК) у рыб начинается жировая инфильтрация печени, о которой мы судим по морфологическим и тканевым ее изменениям. На 14-е сутки эксперимента в печени двухлеток карпа происходит увеличение активности липазы в 1,5 раза, поэтому количество общих липидов возрастает только на 6,9%, хотя присутствуют признаки жирового перерождения печени. На 14-е сутки действия раундапа (4 ПДК) наблюдается снижение уровня общих липидов в крови и печени на 6 и на 6,5% соответственно, но повышение их в желчи на 24,8% за счет количественного роста холестерина на 15% и увеличение в 2,34 раза концентрации жирных кислот. Эти результаты свидетельствуют об ускоренном распаде триглицеролов, некрозе гепатоцитов. Для зенкора – метрибузина – характерна низкая скорость проникновения в организм (Log P = 1,3 ± 0,21) и плохая растворимость в воде (0,12 г в 100 г воды при 20 °С), что отражается на ответной реакции рыб: колбообразном изменении формы респираторных ламелл, увеличении дистанции «кровь-среда», уменьшении поступления токсиканта. Под действием зенкора (2 ПДК) уровень общих жиров возрастает на 9,5%, активность липазы уменьшается в 2,4 раза. В условиях действия зенкора (4 ПДК) фосфолипиды являются доминирующей липидной фракцией, их уровень увеличивается в крови на 35,1%, в тканях печени на 24,5%. Рост общего количества липидов в крови (на 30,9%), в печени (на 16,5%), в желчи (на 32,9%) не сопровождается значительными структурными изменениями ткани печени. Таким образом, высокая скорость проникновения раундапа через жабры в кровь и далее в печень затрудняет синтез фосфолипидов вследствие ингибирования энзимов и, возможно, недостатка холина, что приводит к жировой дистрофии и к тотальному некрозу гепатоцитов. Сложность проникновения зенкора через жабры задерживает его поступление в печень и способствует формированию долговременной адаптации, выражающейся в преобладающем синтезе фосфолипидов для лучшей сохранности структуры печени двухлеток карпа.

**ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСМЕМБРАННОГО
РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА
В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЭГ-1500:
РОЛЬ АТР-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ**

ЗЕМЛЯНСКИХ Н. Г., КОФАНОВА О. А., БАБИЙЧУК Л. А.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: nzemliansky@gmail.com*

Одной из особенностей плазматических мембран эукариотических клеток является ассиметричное трансмембранное распределение фосфолипидов. Различные воздействия химической и физической природы, способные индуцировать структурные и функциональные изменения мембран, могут привести к нарушению ассиметрии липидного бислоя и экспонированию фосфатидилсерина (ФС) на поверхности клетки.

Цель работы состояла в оценке влияния экзоцеллюлярного криопротектора ПЭГ-1500 на перераспределение ФС, а также изучении роли АТР-зависимых процессов в регуляции липидной ассиметрии в мембранах эритроцитов в условиях экспонирования в криопротекторной среде. Экстернализацию ФС на поверхности эритроцитов оценивали по связыванию клетками аннексина V-FITC методом проточной цитометрии (FACS Calibur, Becton Dickenson). Было установлено, что в присутствии ПЭГ-1500 происходит трансмембранное перераспределение ФС. После 1 часа инкубирования количество клеток, экспонирующих ФС на поверхности мембраны, составляет $12 \pm 3\%$, а спустя 24 часа — увеличивается до $40 \pm 5\%$. Несмотря на возможность нарушения ассиметрии липидного бислоя эритроцитов в присутствии ПЭГ-1500, трансмембранное распределение фосфолипидов контролировалось АТР-зависимыми энзимами. Ингибирование ванадатом АТР-зависимых реакций двукратно увеличивает экспонирование ФС на поверхности эритроцитов.

Выявленная в ходе исследования картина ассиметричного трансмембранного распределения ФС свидетельствует о возможности формирования дефектов в клетках на этапе инкубирования их с ПЭГ-1500, предшествующем замораживанию.

**МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ У КРОВІ
ПОРΟΣЯТ ЗА ДІЇ ХРОМУ**

ІСКРА Р. Я.

*Институт біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: ruslana_iskra@inenbiol.com.ua*

Метою роботи було дослідити метаболічні процеси у крові поросят 3–5-місячного віку за дії хрому — есенціального мікроелемента для тварин, дія якого в організмі в основному пов'язана з впливом на секрецію інсуліну.

Дослідження проведено на поросятах великої білої породи. Тваринам дослідної групи, на відміну від контрольної, протягом 2 місяців додавали 400 мкг хрому на кг комбікорму у вигляді неорганічної сполуки $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Проведені дослідження показали, що згодовування поросят комбікорму з добавкою хрому зумовлювало зростання концентрації інсуліну в плазмі крові в 2,5 раза, порівняно із вмістом його у контрольній групі. Це свідчить про стимулюючий вплив хрому на синтез інсуліну в організмі тварин. У той же час, у поросят дослідної групи зниження концентрації глюкози свідчить про гіпоглікемічну дію хрому. Одержані дані підтверджують зв'язок між метаболізмом глюкози і продукцією інсуліну в підшлунковій залозі поросят, оскільки цей моносахарид є основним стимулятором синтезу інсуліну.

Встановлено, що концентрація гідропероксидів і ТБК-активних продуктів у плазмі крові поросят дослідної групи у 5-місячному віці в 1,3 раза менша, ніж у поросят контрольної групи ($P < 0,01$). Ці дані свідчать про інгібуючий вплив підвищеного рівня хрому в раціоні поросят на пероксидне окислення ліпідів в організмі, що обумовлено опосередкованою дією інсуліну на продукцію кортизолу. У той же час, хром стимулює впливає на антиоксидантний захист організму, про що свідчить зростання в крові поросят дослідної групи активності супероксиддисмутази в 1,4 раза ($P < 0,05$), каталази в 1,1 раза, глутатіонпероксидази в 1,1 раза та концентрації відновленого глутатіону в 1,2 раза. Крім того, у плазмі крові поросят дослідної групи за дії хлориду хрому зростає вміст вітаміну Е в 1,5 раза ($P < 0,01$), що у свою чергу захищає поліненасичені жирні кислоти в ліпідах клітинних мембран від пероксидного окислення.

Кількість поліненасичених жирних кислот у плазмі крові свиней дослідної групи ($C_{20:3}$, $C_{20:4}$, $C_{22:2}$, $C_{22:4}$, $C_{22:6}$) вірогідно більша ($P < 0,05$), ніж у свиней контрольної групи, що свідчить про підвищення активності ензимів, які каталізують десатурацію лінолевої і ліноленової кислот в організмі свиней.

Отже, доданий до комбікорму поросят хром у дозі 400 мкг/кг стимулює секрецію інсуліну в організмі, підвищує вміст вітаміну Е, поліненасичених жирних кислот у плазмі, активність ензимів антиоксидантної системи та інгібує пероксидне окислення ліпідів у крові.

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ КІЛЬКІСНОГО РОЗПОДІЛУ КАТАЛАЗИ ТА АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ В РОСЛИНАХ ЦИБУЛІ РІПЧАСТОЇ СОРТУ «ВЕСЕЛКА»

КАЗНАЧЄЄВА М. С.

*Кіровоградський державний педагогічний університет
ім. В. К. Винниченка, Україна;
e-mail: kazna4eeva@gmail.com*

Актуальність дослідження полягає в недостатньому вивченні динаміки змін залежності активності антиоксидантів від типу та функціональної здатності тканин, рівня фотопродукції, а також від стадії онтогенезу рослини.

Метою роботи було дослідити особливості розподілу основних антиоксидантів у рослинному організмі, дати кількісну оцінку їхньої активності.

В експериментах використовували рослини цибулі ріпчастої сорту «Веселка» (середня група стиглості, продуктивності, стійкості до хвороб). Для біохімічного

аналізу відбирали верхівки пера, поперечний переріз середини пера, луски цибулі-ріпки, стрілки, квітки (на стадії цвітіння), корені, насіння в стані спокою та при ініціації процесу проростання. Досліджували активність каталази (титриметрія за Бахом і Зубковою) та рівень малонового діальдегіду (спектрофотометрично).

Встановлено: 1) найвища активність каталази спостерігається у фотосинтезуючих перах цибулі ($3,41 \pm 0,01$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну, для верхівки пера та $2,14 \pm 0,03$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну для середини пера), найнижча – в стрілці ($0,24 \pm 0,02$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну) та коренях ($1,08 \pm 0,04$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну); 2) активність каталази квітки цибулі у фазі цвітіння ($2,47 \pm 0,03$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну) в 1,3 раза вища, ніж у лусках цибулі-ріпки ($1,96 \pm 0,02$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну); 3) квітки цибулі мають найвищий вміст аскорбінату ($2,11 \pm 0,05$ ммоль/кг), що в 19,2 раза вищий, ніж у коренях ($0,11 \pm 0,01$ ммоль/кг), в 2,7 раза вищий, ніж у стрілці ($0,79 \pm 0,03$ ммоль/кг) та в 4,2 раза перевищує показники для лусок цибулі-ріпки ($0,50 \pm 0,01$ ммоль/кг); вміст аскорбінату середини пера цибулі ($1,79 \pm 0,03$ ммоль/кг) в 2,3 раза більший, ніж верхівки пера ($0,79 \pm 0,02$ ммоль/кг); 4) ініціація проростання підвищує активність каталази в 1,2 раза ($4,18 \pm 0,02$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну) порівняно зі станом спокою ($3,63 \pm 0,03$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну), а вміст аскорбінату – в 1,3 раза ($0,06 \pm 0,004$ та $0,08 \pm 0,005$ ммоль/кг відповідно).

Одержані дані дозволяють дійти висновків: 1) фотосинтезуючі органи рослин цибулі ріпчастої характеризуються посиленою активністю каталази та найбільшим вмістом аскорбінової кислоти; 2) активність каталази значно вища в тих органах рослини, клітини яких активно діляться; 4) ініціація процесу проростання прямопропорційно пов'язана з посиленням антиоксидантної ланки.

СТАН ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЦИБУЛІ РІЗНИХ ЗА РІВНЕМ СТІЙКОСТІ СОРТІВ

¹КАЗНАЧЄЄВА М. С., ²ЦЕБРЖИНСЬКИЙ О. І.

¹Кіровоградський державний педагогічний університет
ім. В. К. Винниченка, Україна;
e-mail: kazna4eeva@gmail.com;

²Миколаївський державний університет
ім. В. О. Сухомлинського, Україна;
e-mail: tsebrzhinsky@mail.ru

Посилене утворення активних форм кисню хлоропластами, пероксисомами мікосомальних та плазматичних мембран, цитозолем і клітинною стінкою рослин, що зумовлює потужну активність антиоксидантів є недостатньо вивченим.

Метою роботи було дослідити особливості стану прооксидантно-антиоксидантної системи (ПАС) стійких та нестійких до хвороб сортів цибулі ріпчастої, дати кількісну оцінку основних її показників; порівняти значення показників стану ПАС для фотосинтезуючих органів та тих, що не здійснюють фотопродукцію.

У дослідах використовували поперечний зріз пера та лусок рослин цибулі сорту «Глобус» (високостійкий до хвороб) та «Донецька золотиста» (малостійкий сорт). Досліджували активність каталази, концентрацію аскорбінату, вміст МДА (фоновий, стимульований та приріст), рівень та джерела генерації супероксиду (фоновий та стимульований НСТ-тест).

Було встановлено: 1) активність каталази в перах цибулі «Глобус» ($3,40 \pm 0,02$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну) в 1,8 раза вища, ніж у «Донецької золотистої» ($1,89 \pm 0,01$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну), а в лусках цибулі-ріпки – в 1,4 раза ($2,34 \pm 0,03$ та $1,72 \pm 0,04$ мкмоль/хв на 1 мг протеїну); 2) вміст аскорбінату в перах цибулі «Глобус» ($1,93 \pm 0,03$ ммоль/кг) є в 1,12 раза вищим, ніж «Донецької золотистої» ($1,72 \pm 0,04$ ммоль/кг), в лусках ріпки – в 1,7 раза ($0,66 \pm 0,01$ та $0,39 \pm 0,01$ ммоль/кг відповідно); 3) для пера цибулі нестійкого сорту характерний менший фоновий рівень МДА, але значно вищий його приріст ($MDA_0 = 10,9 \pm 0,54$ мкмоль/кг, $\Delta MDA = 133 \pm 1\%$), ніж для стійкого сорту ($MDA_0 = 19,78 \pm 2,13$ мкмоль/кг, $\Delta MDA = 39 \pm 7\%$) в лусках цибулі-ріпки, ніж у фотосинтезуючих перах, для цибулі-ріпки характерна зворотна закономірність: $MDA_0 = 22,52 \pm 3,75$ мкмоль/кг, $\Delta MDA = 32 \pm 5\%$ для стійкого сорту, та $MDA_0 = 47,7 \pm 2,28$ мкмоль/кг, $\Delta MDA = 21 \pm 4\%$ – для нестійкого; 4) показники фонового та стимульованого рівня генерації $\cdot O_2^-$ цибулі сорту «Глобус» складають $0,247 \pm 0,008$ нмоль $\cdot O_2^-$ /г·с та $0,264 \pm 0,003$ нмоль $\cdot O_2^-$ /г·с відповідно, для «Донецької золотистої» – $0,201 \pm 0,010$ та $0,222 \pm 0,001$ нмоль $\cdot O_2^-$ /г·с.

Одержані дані дозволяють дійти висновків: 1) стійкість сорту пов'язана з посиленням обох ланок прооксидантно-антиоксидантного балансу; 2) фотосинтезуючі органи рослин характеризуються посиленням утворенням АФК, тому виявляють потужніший антиоксидантний захист порівняно з органами, що не здійснюють фотопродукцію.

РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ТРАВНОМУ ТРАКТІ ГЕКСОЗАНАМИ Й СОРБЕНТАМИ

¹КАЛАЧНЮК Л. Г., ^{1,2}МІК-САБАТ М. Я., ²БАРАН М.,
¹⁻³САВКА О. Г., ¹КАЛАЧНЮК Г. І.

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, НДІ біотехнологічних основ підвищення продуктивності тварин, Львів;

²Інститут фізіології тварин Словацької АН, Кошице;

³Інститут фізіології і генетики тварин Чеської АН, Прага

Мета роботи – з'ясувати доцільність застосування гексозанів у поєднанні з кліноптилолітом (Кл) для регуляції метаболічних процесів у травному тракті тварин. Показано, що манани в цекальному середовищі вірогідно підвищують продукцію пропіонату (C_3) і бутирату (C_4) на тлі вірогідного зниження C_5 - C_6 жирних кислот (ЖК) та активності інулінази, а фруктани у поєднанні з Кл – суму летких ЖК, C_3 , активність ензимів інулінази, целюлази і пектинази за зниження рівнів рН, C_5 - C_6 -ЖК і NH_4^+ . Інулін також використовується цекальною мікробною попу-

ляцією переважно як джерело енергії і пластичного матеріалу, а манани – ще й як своєрідні регулятори мікробного метаболізму. Рослинний фруктан (інулін) та мікробний (леван) неоднаково утилізуються клітинами різних мікробних асоціацій рубця. У фракції бактеріальної асоціації знаходиться більше клітин, які швидше утилізують леван, ніж інулін. Амонієгенез залежить від швидкості деградації азотвмісних сполук і вуглеводів.

ВІДНОВЛЕННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ ЗА РОЗВИТКУ АЛКОГОЛЬНДУКОВАНОГО ГЕПАТОСТЕАТОЗУ

^{1,2}КАЛАЧНЮК Л. Г., ¹⁻³СИДІР-БАСАРАБ І. М., ²МЕЛЬНИЧУК Д. О.,
^{1,2}КАЛАЧНЮК Г. І.

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, НДІ біотехнологічних
основ підвищення продуктивності тварин, Львів;

²Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;

³Інститут фізіології і генетики тварин Чеської АН, Прага

Мета роботи – одержати нові дані з досліджень внутрішньоклітинного метаболізму в гепатоцитах за дії алкоголю та нових біопротекторів. Встановлено, що під впливом алкоголю відбуваються зміни структурно-функціонального стану гепатоцитів: вірогідно знижується активність мікросомної ензимометаболізуючої системи, алкогольдегідрогенази, ацетальдегіддегідрогенази, супероксиддисмутази і каталази у разі підвищення концентрації триацилгліцеролів, холестеролу, малонного діальдегіду та активності ліпогенних ензимів – малік-ензиму, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази і 6-фосфоглюкоуронатдегідрогенази. Це вказує на розвиток алкогольндукованого гепатостеатозу, що підтверджується відхиленнями у крові та живій масі. Застосування фосфоліпідвмісних препаратів рослинного і тваринного походження наближає наведені показники до фізіологічної норми. Найвищий ефект відновлення спостерігається за застосування ліпосомної біологічно активної добавки “LP FLP-MD”, виготовленої на основі фосфоліпідів молока.

**ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЕФЕКТИ
МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ 8E8, ОДЕРЖАНИХ
ПРОТИ ПРОТЕЇНАЗО-АКТИВОВАНОГО РЕЦЕПТОРА
ТРЕТЬОГО ТИПУ, НА КЛІТИНИ ЕНДОТЕЛІЮ
МІКРОСУДИН ТА В-ЛІМФОЦИТИ**

*КАЛАШНИК О. М., ЛИХМУС О. Ю., ПЕТРОВА Ю. І.,
МИХАЛОВСЬКА Л. І., СКОК М. В.*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
Школа фармації та біомолекулярних наук Брайтонського
університету, Велика Британія*

Антитіла до рецепторів клітин є потужним інструментом для дослідження експресії рецептора в живих клітинах та клітинних екстрактах. Крім того, такі антитіла, зв'язуючись з рецептором живої клітини, можуть симулювати або запобігати дії ліганду. Об'єктом наших досліджень є протеїназо-активовані рецептори (ПАР3 та ПАР1), які активуються «прив'язаним лігандом», що вивільнюється під час розщеплення самого рецептора тромбіном. *In vitro* дія «прив'язаного ліганду» може бути імітована активаційним пептидом із відповідною послідовністю. Вважається, що ПАР3 не може самостійно генерувати внутрішньоклітинні сигнали, а працює як корецептор ПАР1 чи ПАР4. Нами створено моноклональні антитіла 8E8 (мАТ 8E8) проти послідовності 31–47, що містить сайт щеплення ПАР3 тромбіном, які чинили тромбіноподібний ефект на клітини гібридоми. Метою представленої роботи було з'ясувати функціональні ефекти цих антитіл на активовані В-лімфоцити та ендотеліальні клітини судин, взаємодія яких з тромбіном відіграє суттєву роль під час розвитку запалення і атеросклерозу.

Дослідження проводили на В-лімфоцитах миші, виділених із селезінки магнітним сортином за маркером CD45R (B220), та на клітинах лінії НРМЕС-ST1.6R, яка походить з ендотелію мікросудин людини. Методом проточної цитофлуориметрії за допомогою мАТ 8E8 та поліклональних антитіл проти послідовності 1-160 ПАР1 (АТ ПАР1) показано, що обидва типи клітин несуть на поверхні як ПАР3, так і ПАР1.

Тромбін пригнічує проліферацію свіжевиділених В лімфоцитів як самих по собі, так і активованих антитілами проти CD40. мАТ 8E8 зменшують пригнічувальну дію тромбіну і самі чинять активуючий ефект, сприяючи проліферації і бласттрансформації В-лімфоцитів. АТ ПАР1, навпаки, відтворюють дію тромбіну та посилюють її у разі сумісного додавання. Згідно з результатами сандвіч-ІФА, ПАР3 фізично зв'язаний з IgM у мембрані В-лімфоцитів. Можна припустити, що мАТ 8E8 екранує сайт щеплення ПАР3 тромбіном, а також зумовлює димеризацію ПАР3, генеруючи IgM-залежний та ПАР1-незалежний активаційний сигнал в В-лімфоцитах.

В клітинах НРМЕС-ST1.6R тромбін стимулює продукцію інтерлейкінів 6 і 8 (IL-6 і IL-8) та представлення на поверхні молекул васкулярної міжклітинної адгезії VCAM-1. Вплив мАТ 8E8 на продукцію IL-6 і 8 подібний до впливу тромбіну та активаційного пептиду ПАР1 SFLLRN (P1), але значно перевищує їх за абсолютним значенням. Як показано проточною цитофлуориметрією з антитілами

проти VCAM-1 та ICAM-1, експресію VCAM-1, крім тромбіну та мАТ 8E8, стимулюють також АТ ПАР1 та Р1, в той час як експресія ICAM-1 зростає тільки під час інкубації клітин з мАТ 8E8 або активаційним пептидом ПАР3 TFRGAR. Дійшли висновку, що в клітинах НРМЕС-ST1.6R ПАР3 і ПАР1 функціонують у тандемі. Продукція цитокінів і експресія VCAM-1 регулюється через ПАР1, за участю ПАР3 як корецептора, в той час як експресія ICAM-1 контролюється ПАР3 без участі ПАР1.

В цілому, одержані дані свідчать про те, що мАТ 8E8 є функціонально активними. Зв'язування їх з ПАР3 генерує потужний внутрішньоклітинний сигнал, що приводить до активації В-лімфоцитів та продукції прозапальних цитокінів і експресії молекул міжклітинної адгезії ендотеліальними клітинами НРМЕС-ST1.6R. Разом це сприяє розвитку запалення і руху лейкоцитів по поверхні ендотелію судин.

ВПЛИВ МІДІ НА АКТИВНІСТЬ ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНИХ ЕНЗИМІВ У КРОВІ ЩУРІВ

КАЛІНІН І. В., САС М. А.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: ikalin@rambler.ru*

Сучасне загострення екологічної ситуації є однією з найважливіших проблем, що обумовлює необхідність вивчення механізмів адаптації живих організмів до важких металів, як найнебезпечніших забруднювачів. У тканинах організму мідь виконує роль каталізатора життєво важливих процесів, незважаючи на її низьку концентрацію. Як за недостатньої, так і за надлишкової концентрації міді, в організмі тварин розвиваються порушення метаболічних процесів. При довготривалому надходженні міді в організм небезпеку можуть представляти хронічні інтоксикації, оскільки мідь виявляє виражені кумулятивні властивості. Слід зазначити, що оцінка ризику для тварин і людини, пов'язаному з дією міді та її сполук, ускладнені за рахунок її ролі як мікроелемента. Метаболічні процеси в організмі отруєних щурів пов'язані з активацією ензимів біотрансформації ксенобіотиків. Глутатіон та зв'язані з ним ензимні системи прямо або опосередковано беруть участь у функціонуванні різних ланок детоксикації.

Метою дослідження було вивчення впливу міді сірчаної кислоти на активність глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонтрансферази (ГТ) та вмісту відновленого глутатіону (GSH) в сироватці крові щурів.

Дослідження проводили на базі кафедри біохімії, якості та безпеки сільськогосподарської продукції ім. акад. М. Ф. Гулого та Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК. Об'єктом проведених досліджень були білі лабораторні щури, експеримент проводився протягом 30 днів. Отруєння тварин проводили згідно із загальноприйнятими методами. Вміст міді визначали у крові на атомно-абсорбційному спектрофотометрі ААС-30 (Німеччина). Визначали активність ГП, ГТ і концентрацію відновленого глутатіону.

Одержані дані свідчать, що рівень міді після отруєння щурів вірогідно збільшується у крові в півтора рази. Проведені нами дослідження показали, що інтокси-

кація міді сульфатом призводить до зниження активності ГП та ГТ у крові щурів відповідно на 38 і 41% порівняно з інтактними тваринами. Концентрація GSH зменшується у 2 рази в сироватці крові отруєних щурів відносно контролю.

Таким чином, одержані результати можуть вказувати на зниження функціональної активності антиоксидантної системи захисту організму та допомогти у пошуку нових ефективних засобів для захисту живого організму за дії ксенобіотиків.

ТЕСТУВАННЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ МИТОХОНДРІЙ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ МОДЕЛІ ПЕРМЕАБІЛІЗОВАНИХ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ

*КАНДАУРОВА Н. В., БАБІЧ Л. Г., ШЛИКОВ С. Г.,
КОСТЕРІН С. О.*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

e-mail: natanau@rambler.ru

Мембранний потенціал мітохондрій відіграє вирішальну роль у забезпеченні обміну іонів Са як у самих цих органелах, так і в клітинах в цілому. Отже, подальше розширення методів тестування мітохондріального потенціалу є актуальним питанням. Використання моделі пермеабілізованих клітин для дослідження мембранного потенціалу мітохондрій має низку суттєвих переваг порівняно з фракцією ізольованих мітохондрій: досліджуються всі клітинні популяції мітохондрій і, що найважливіше, мітохондрії вивчаються в їхньому природному оточенні.

Метою даної роботи було відпрацювання методу тестування трансмембранного потенціалу мітохондрій на моделі пермеабілізованих клітин міометрія. Експерименти проводили на проточному цитометрі COULTER EPICS XLTM (Beckman Coulter, США) з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM (tetramethylrhodaminemethyl ester, $\lambda_{\text{збуд.}} = 488 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{фл.}} = 590 \text{ нм}$).

Тестування відносних значень мембранного потенціалу мітохондрій здійснювали в середовищі інкубації наступного складу: 20 мМ HEPES (рН = 7,4), 125 мМ KCl, 25 мМ NaCl, 5 мМ сукцинат, 2 мМ P_i (у вигляді K^+ -фосфатного буфера, рН = 7,4); 0,1 мг/мл дигітонін.

Флуоресцентний зонд TMRM досить швидко навантажується у мітохондрії. Так, клітини, що навантажувались зондом протягом 3, 5 та 30 хв, мають однаковий рівень флуоресценції. За зміни концентрації TMRM в діапазоні від 20 до 200 нМ, спостерігається лінійна залежність інтенсивності флуоресценції від концентрації зонда. Додавання протонофора CCCP спричинює швидке падіння інтенсивності флуоресценції зонда, що обумовлюється дисипацією мітохондріального потенціалу.

Також показано, що мембранний потенціал мітохондрій є стабільним у часі. Інтенсивність флуоресценції зонда TMRM знаходиться на стаціонарному рівні протягом часу реєстрації (10 хв) і швидко спадає за додавання протонофора CCCP.

Проведено дослідження впливу азиду натрію та іонів Са на мембранний потенціал мітохондрій. Показано, що дані ефектори призводять до дисипації мембранного потенціалу мітохондрій.

Таким чином, відпрацьовано умови для проведення досліджень трансмембранного потенціалу мітохондрій на моделі пермеабілізованих клітин міомеріа з використанням проточного цитометра та флуоресцентного зонда.

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
ПРОЛИНА, ТИОПРОЛИНА, НИТРОЗОПРОЛИНА
И НИТРОЗОТИОПРОЛИНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ ПРИ ПОМОЩИ ТОНКОСЛОЙНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ И ФЛУОРИМЕТРИИ**

КАПУСТЯНЕНКО Л. Г., ОВЧАРЕНКО В. И., ДМИТРЕНКО Н. П.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: dmytrenko@biochem.kiev.ua*

Пролин и тиопролин являются циклическими аминокислотами, которые легко нитрозируются и выводят оксид азота из организма, выступая, таким образом, как акцепторы NO, экранирующие организм от его токсического действия.

Существующие методы мониторинга подобных процессов дорогостоящи и не всегда доступны в рядовых лабораториях. Разработан простой и чувствительный метод определения в едином эксперименте содержания пролина, тиопролина, нитрозопролина и нитрозотиопролина в биологическом материале при помощи тонкослойной хроматографии и флуориметрии. Метод основан на принципе разделения дансилпроизводных аминокислот при помощи двухмерной ТСХ. При определении нитрозопролина и нитрозотиопролина для получения их дансилпроизводных разработана методика предварительного денитрозилирования этих соединений на пластине при помощи жесткого УФ-излучения. Подобраны системы для разделения аминокислот и условия предварительной подготовки биологического материала. Флуориметрию проводили при $\lambda_{ex} = 340$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм (Biotek FLx800, США). Экспериментальные данные были обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Общая чувствительность метода ограничивается чувствительностью стандартной методики проведения ТСХ дансильированных производных и составляет 1×10^{-10} М. Метод обладает воспроизводимостью $\pm 3\%$ для обычных аминокислот и $\pm 5\%$ — для их нитрозопроизводных.

С помощью разработанного метода нами было определено содержание пролина, тиопролина, нитрозопролина и нитрозотиопролина в печени крыс в условиях одноразового (200 мг/кг) и субхронического (0,075%-й раствор семикарбазида в течение 45 суток) введения перорально семикарбазида, который связывает альдегиды и может вызывать существенные изменения в функции энзимов с карбонильным активным центром и в состоянии соединительной и костной ткани. Показано, что в первом случае содержание пролина, тиопролина и нитрозотиопролина возрастает, а во втором — содержание пролина и нитрозопролина уменьшается, а нитрозотиопролин возрастает в 1,7–2 раза, что соответствует повышению концентрации нитритов и нитратов в образцах сыворотки крови и моче.

ДИФЕРЕНЦІЙНІ ФУНКЦІЇ РІЗНИХ СУБТИПІВ НІКОТИНОВИХ АЦЕТИЛХОЛІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ В АКТИВАЦІЇ В-ЛІМФОЦИТІВ

КОВАЛЬ Л. М., ЛИХМУС О. Ю., СКОК М. В.,
КОМІСАРЕНКО С. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: lkoval@biochem.kiev.ua*

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (нАХР) відіграють важливу роль у функціонуванні клітин імунної системи. Наші попередні дослідження показали, що В-лімфоцити миші експресують $\alpha 4\beta 2/\beta 4$, $\alpha 7$ і $\alpha 9\alpha 10$ субтипи нАХР, кількість яких змінюється у процесі їхнього диференціювання та розвитку. Ці субтипи нАХР також залучені в регуляцію активації В-лімфоцитів та гуморальної імунної відповіді, однак детальні функції їх та механізми дії залишаються невідомими.

Методом протокової цитофлуориметрії нами було визначено, що співвідношення різних субтипів нАХР на зрілих В-лімфоцитах детерміновано генетично: так, селезінки мишей лінії Balb/c містили достовірно більше $\alpha 7$ -позитивних В-лімфоцитів, тоді як всі інші субодиниці були краще представлені у мишей C57Bl/6J, вибраних нами для подальших досліджень. Активація свіжевиділених В-лімфоцитів антитілами проти CD40 призводить до підвищення зв'язування $\alpha 4$ -, $\beta 2$ - і $\alpha 7$ -специфічних, але не $\alpha 9$ - або $\beta 4$ -специфічних антитіл, визначаючи $\alpha 7$ і $\alpha 4\beta 2$ як основні субтипи, залучені в активацію В-лімфоцитів. Кількість $\alpha 7$ нАХР також збільшувалась після імунізації мишей цитохромом *c*.

На відміну від клітин м'язів та автономних гангліїв, функціонування нАХР в лімфоцитах не очевидно пов'язано з функціонуванням іонного каналу, а скоріше полягає в регуляції діяльності інших рецепторів. Щоб визначити потенційних партнерів нАХР у В-лімфоцитах, ми провели дослідження з інтерференції антитіл методом протокової цитофлуориметрії, а також сандвіч-аналіз безпосереднього зв'язку різних субтипів нАХР з відомими рецепторами В-лімфоцитів. Було показано, що зв'язуванню CD40-специфічних антитіл перешкоджали $\alpha 7$ - або $\alpha 9$ -специфічні антитіла, тоді як зв'язуванню IgM- або CD23-специфічних антитіл перешкоджали $\alpha 4$ -, $\beta 2$ - або $\beta 4$ -специфічні антитіла. За даними сандвіч-аналізу, $\alpha 7$ і $\alpha 9$ нАХР виявились зв'язаними з CD40, а $\alpha 4\beta 2/\beta 4$ нАХР – з BCR (IgM) і Fc ϵ RII (CD23). Відповідно, CD40-опосередкована мітогенна відповідь В-лімфоцитів значно підсилюється за впливу метиллікаконітину і холіну (лігандів $\alpha 7$ нАХР), але майже не змінюється за впливу епібатидину та дигідро- β -еритроїдину (лігандів $\alpha 4\beta 2/\beta 4$ нАХР). Одержані дані було підтверджено *in vivo*. У мишей, імунізованих цитохромом *c* у присутності метиллікаконітину, первинна імунна відповідь, опосередкована IgM, розвивається значно швидше порівняно з мишами, імунізованими лише цитохромом *c*. При цьому блокування $\alpha 7$ нАХР на впливає на переключення синтезу імуноглобулінів з IgM на IgG, що було показано на В-лімфоцитах, стимульованих *in vitro* анти-CD40 та інтерлейкіном-4 у присутності/за відсутності лігандів нАХР.

Одержані результати свідчать про те, що $\alpha 4\beta 2/\beta 4$ і $\alpha 7$ субтипи нАХР скооперовані з різними рецепторами зрілих В-лімфоцитів і, відповідно, регулюють різні

функції цих клітин. $\alpha 7$ nAHPR сполучені з CD40 і контролюють мітогенний сигнальний шлях, але не впливають на переключення синтезу класу імуноглобулінів. З В-клітинним рецептором сполучені $\alpha 4\beta 2/\beta 4$ nAHPR і, вірогідно, регулюють опосередковані ним сигнальні події.

СТАН ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕННЯ ТА АКТИВНІСТЬ СИСТЕМИ АНТИРАДИКАЛЬНОГО ЗАХИСТУ В ОВАРІЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ З МЕТАБОЛІЧНИМ СИНДРОМОМ

КОЗАР В. В., УСТЕНКО Н. В.

*Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології
ім. В. Я. Данилевського АМН України», Харків;
e-mail: admin@iper.com.ua*

Важливу роль у формуванні та/або прискоренні розвитку ускладнень, характерних для метаболічного синдрому (МС), особливо за умов поєднання з дефіцитом естрогенів, відіграє оксидативний стрес, характерними ознаками якого є порушення в системі вільнорадикального окислення (ВРО). Тому становило певний інтерес дослідити зміни ВРО та ензиматичної ланки антирадикального захисту (АРЗ) в оваріектомованих щурів із метаболічним синдромом.

Метою роботи було визначити спрямованість та ступінь змін процесів ВРО та системи АРЗ у щурів з МС на тлі дефіциту естрогенів.

Гіпоестрогенію відтворювали шляхом двусторонньої оваріектомії у статевозрілих щурів-самиць під легким ефірним наркозом. Модель метаболічного синдрому індукували шляхом хронічного введення 30%-го розчину сахарози з питною водою (ВВД - високовуглеводна дієта). Групи тварин: 1 – інтактний контроль; 2 – оваріектомовані щури («оваріектомія»); 3 – оваріектомовані щури, які отримували 30%-й розчин сахарози («оваріектомія + ВВД + плацебо»). Загальна тривалість експерименту – 7 тижнів. Визначали вміст дієнових кон'югатів (ДК) і ТБК-активних продуктів та активності каталази в печінці, селезінці, тимусі, загальну окислювальну (ЗОА) та антиокислювальну (ЗАО) активність плазми крові, рівень церулоплазміну, ДК у сироватці крові, активність СОД та каталази в еритроцитах у щурів із МС на тлі гіпоестрогенії.

Дослідження показали, що вміст ДК у печінці, селезінці, тимусі, ТБК-активних продуктів у селезінці значуще не змінюється в жодній із піддослідних груп тварин. Проте, рівень ТБК-активних продуктів у печінці є вірогідно зниженим у групах «оваріектомія» та «оваріектомія + ВВД + плацебо» порівняно з інтактним контролем ($P < 0,05$), що свідчить про певні порушення обмінних процесів у печінці. У тимусі цей показник є підвищеним у групі «оваріектомія + ВВД + плацебо» порівняно з інтактними тваринами ($P < 0,05$). У даному разі МС сприяє деякій інтенсифікації окисних процесів у тимусі.

Дослідження ЗОА плазми крові, яку оцінюють за накопиченням у модельній системі кінцевого продукту пероксидного окислення ліпідів – МДА, показали, що лише у тварин групи «оваріектомія» спостерігається зниження цього показника

по відношенню до інтактного контролю (відповідно $34,7 \pm 3,1$ проти $50,2 \pm 4,6\%$, $0,05 < P < 0,1$). Тобто, гіпоестрогенія є основним чинником зниження ЗОА крові, оскільки наявність МС на тлі дефіциту естрогенів додатково не впливає на зазначені показники. Визначення загальної антиокислювальної активності в експериментальних тварин не встановило вірогідних змін у жодній із піддослідних груп.

Стосовно ензимів антиоксидантної системи та рівня ДК у сироватці крові вірогідних змін в жодній із груп не спостерігали, за винятком зниження активності каталази в селезінці у групі «оваріектомія» у вигляді тенденції ($0,05 < P < 0,1$).

Таким чином, можна констатувати, що дефіцит естрогенів, у тому числі і в поєднанні з МС, обумовили зміни показників ВРО. Слід також зазначити, що наявність МС в умовах гіпоестрогенії посилює дисбаланс процесів ВРО у тканинах.

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ^{14}C -НІКОТИНАТУ ТА АКТИВНОСТІ ІЗОФОРМ МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗИ І АЛКОГОЛЬДЕГІДРОГЕНАЗИ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ОДНОРАЗОВОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

КОКОШКІНА О. О., ЗАПОРОЖЧЕНКО О. В.

*Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Україна;
e-mail: sana332@ukr.net*

Метою роботи було вивчення вмісту метаболітів ^{14}C -нікотинату та активності електрофоретичних ізоформ NAD-залежних дегідрогеназ у тканинах щурів після одноразового рентгенівського опромінення їх.

Дослідження проведено на 72 щурах лінії Вістар. 1-а група тварин – контрольна, 2-ій групі – внутрішньом'язово вводили нікотинову кислоту (НК) в дозі 10 мг/кг маси, тварин 3-ї групи піддавали рентгенівському опромінюванню (РО) в дозі 6 Гр (апарат РУМ – 17), 4-й групі – вводили НК в дозі 10 мг/кг маси тіла і опромінювали в дозі 6 Гр (РО+НК). У першій серії експериментів (48 тварин) через 1 та 6 год у цитозольній і мітохондріальній фракціях печінки, тонкого кишечника, нирок та мозку щурів визначали активність електрофоретичних ізоформ (ЕФІ) малатдегідрогенази (МДГ) і алкогольдегідрогенази (АДГ). У другій серії експериментів щурам всіх зазначених груп (24 тварини) вводили внутрішньом'язово ^{14}C -НК (загальна активність 0,1 мКи (37 мБк), удільна активність 4,2 ГБк/ммоль) в дозі 1 мг/кг маси тварини. Через 6 годин за допомогою радіохроматографічного методу вивчали вміст нікотинату, NAD+NADP, NADH+NADPH і нікотинурової кислоти у тканинах. Аналізом електрофореграм встановлено модифікуючу дію РО на ЕФІ МДГ і АДГ у тканинах щурів, яка зумовлює як зміну їхньої активності залежно від часу і виду тканини, так і появу нових ізоформ. За дії РО і НК спостерігали зміни активності окремих ЕФІ ензимів у тканинах щурів через 1 і 6 год експерименту. Введення НК не виявляє істотного впливу на рівень суми відновлених нікотинамідних коензимів, у разі поєднання з РО сприяє значному зростанню рівня суми NADH+NADPH в мозку, тонкому кишечнику і печінці, сприяючи збільшенню відновного потенціалу тканин.

Таким чином, наявність більшої кількості ЕФІ МДГ і АДГ у тканинах щурів у різні строки експерименту після РО і введення НК може бути зумовлена модифікуючою дією радіаційного впливу, а відносне збільшення у тканинах вмісту суми відновлених нікотинамідних коензимів дозволяє рекомендувати НК як радіопротекторний засіб.

ДІЯ СЕЛЕНОВМІСНОЇ БІОМАСИ ДРІЖДЖІВ *Phaffia rhodozyma* НА ОРГАНІЗМ ЩУРІВ

КОЛІСНИК Г. В., КАМІНСЬКА М. В., БОРЕЦЬКА Н. І.,
НЕЧАЙ Г. І., ГУРАЛЬ С. В.

Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: hv_kolisnyk@ukr.net

У зв'язку з частим порушенням збалансованості антиоксидантної та прооксидантної систем в організмі людини і тварин виникла потреба в пошуку способів захисту клітин від пошкоджуючої дії вільнорадикального окислення. Раніше нами показано антиоксидантну дію біомаси каротиносинтезувальних дріжджів *P. rhodozyma* за розвитку оксидативного стресу в щурів. Аналіз даних літератури дозволяє зробити припущення, що у разі збагачення біомаси цих дріжджів селеном може виявитися синергічна дія таких антиоксидантів, як каротиноїди та селен.

Метою роботи було селекціонувати селенорезистентні штами дріжджів *P. rhodozyma* та з'ясувати вплив добавки біомаси таких штамів дріжджів до корму на окремі показники системи антиоксидантного захисту в щурів в умовах оксидативного стресу, індукованого тетрахлорметаном.

Нами одержано групу мутантів дріжджів *P. rhodozyma*, які акумулюють значно вищу кількість селену, ніж селенорезистентні штами дріжджів *S. cerevisiae*. За наявності селену 7,5 мг/л середовища вміст селену у клітинах дріжджів *P. rhodozyma* і *S. cerevisiae* досягає відповідно 118 і 55 мкг/г.

Добавки біомаси дріжджів *P. rhodozyma*, яка містила 2 мкг селену/г сухої маси, до раціону щурів знижують спричинене тетрахлорметаном зростання концентрації дієнових кон'югатів у печінці щурів у 3,6 раза, ТБК-активних продуктів – на 18%, а карбонільних груп протеїнів – на 54%. При дослідженні ензимів-антиоксидантів у печінці інтоксикованих тварин, яких утримували на раціонах із добавкою біомаси дріжджів *P. rhodozyma*, не виявлено вірогідних змін в активності каталази, а активність глутатіонпероксидази зростає на 70% порівняно з тваринами стрес-контролю. Введення в раціон селенізованої біомаси дріжджів *P. rhodozyma* зменшує токсичну дію тетрахлорметану на організм щурів, про що свідчить зниження активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази у плазмі крові порівняно з інтоксикованими тваринами.

Порівняльний аналіз показників пероксидного окислення ліпідів, протеїнів та ензимів системи антиоксидантного захисту дозволяє дійти висновку, що введення в раціон інтоксикованих тетрахлорметаном щурів біомаси дріжджів *P. rhodozyma*, яка містить 2 мкг селену/г сухої маси, виявляє кращу захисну дію, ніж згодовування неселенізованої біомаси цих дріжджів.

**САЛИЦИЛОВАЯ И ЯНТАРНАЯ КИСЛОТЫ
ПОВЫШАЮТ АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ
ЭНЗИМОВ И ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТЬ
ПРОРОСТКОВ ПРОСА**

КОЛУПАЕВ Ю. Е., ЯСТРЕБ Т. О., КАРПЕЦ Ю. В.

*Харьковский национальный аграрный университет
им. В. В. Докучаева, Украина;
e-mail: plant_biology@mail.ru*

Салициловая и янтарная кислоты (СК, ЯК) ныне используются в практике растениеводства для повышения урожайности и устойчивости сельскохозяйственных растений к стрессорам. Способность СК повышать устойчивость растений к стрессорам связывают с ингибированием каталазы, что вызывает временное накопление в клетках пероксида водорода и активацию сигнальных путей, приводящих к формированию адаптивных реакций. ЯК рассматривается как миметик СК, также способный ингибировать каталазу (Тарчевский и др., 1999). В то же время имеются сообщения, что каталаза многих видов растений ингибируется лишь нефизиологическими концентрациями этих кислот (Rao et al., 1997). При этом предполагается участие других энзимных систем в реализации эффектов СК и ЯК.

На момент начала нашей работы отсутствовали исследования, в которых бы сравнивалось влияние СК и ЯК в условиях *in vitro* и *in vivo* на активность ключевых энзимов, причастных к регуляции содержания активных форм кислорода в клетках — супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы — в связи с индуцированием устойчивости растений к абиотическим стрессорам. Это и определило цель нашей работы — изучить влияние обработки семян проса (*Panicum miliaceum* L., сорт Константиновское) растворами СК и ЯК на теплоустойчивость проростков и активность в них СОД, каталазы и пероксидазы.

Под действием СК и ЯК, применяемых для обработки семян в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ, отмечалось увеличение активности всех трех энзимов в 4–5-суточных проростках и повышение их теплоустойчивости. В условиях *in vitro* (при добавлении к экстракту энзимов) СК и ЯК увеличивали активность СОД, незначительно ингибировали каталазу и не влияли на активность пероксидазы. При этом предобработка семян СК и ЯК в определенных концентрациях вызывала заметное повышение теплоустойчивости проростков и уменьшала накопление в них тиобарбитуратактивных продуктов пероксидного окисления липидов после повреждающего нагрева. Предполагается, что данный эффект связан с активацией антиоксидантной системы.

ОСОБЛИВОСТІ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В УМОВАХ ПОЄДНАНОЇ ДІЇ ФТОРИСТОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА МАЛИХ ДОЗ РАДІАЦІЇ

¹КОНИК У. В., ²КОЗАК Л. П.

¹Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна;

²Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького, Україна;
e-mail: konykm@ukr.net

Метою нашої роботи було виявити особливості оксидативного стресу у разі бінарної дії фтористої інтоксикації та малих доз радіації.

Для досліджень використовували білих щурів масою 160–180 г. Бінарну дію моделювали шляхом чотириразового опромінення тварин по 0,25 Гр з використанням приладу «Агат» (джерело ⁶⁰Со) на четвертому тижні перорального введення натрію фториду в дозі 10 мг на 1 кг маси. Визначали вміст малонового діальдегіду (МДА), активність ензимів антиоксидантного захисту, пероксидний гемоліз еритроцитів, вміст метаболітів оксиду азоту, вміст молекул середньої маси у сироватці крові.

Встановлено, що поєднана дія фтористої інтоксикації та малих доз радіації призводить до зниження у крові, відносно контрольних величин, вмісту проміжних продуктів ліпопероксидації – МДА (на 17,7%). Одночасно у крові відмічено зменшення активності супероксиддисмутази (на 21,1%), каталази (на 29,8%), глутатіонпероксидази у 2,7 рази стосовно контролю. Сумісний вплив радіації та фтористої інтоксикації виявляється у підвищенні рівня молекул середньої маси на 35,2% відносно контролю; у збільшенні гемолізу еритроцитів на 87%. Вміст продуктів оксиду азоту – нітрит-іонів у мозку зменшений на 31,55% відносно контролю, що вказує на зниження адаптаційних резервів організму.

Зниження рівня МДА на фоні пригнічення активності ензимів антиоксидантного захисту за сумісної дії досліджуваних чинників ми пов'язуємо з виснаженням пулу оксигеназних реакцій. Така метаболічна ситуація, виявлена за бінарної дії фтористої інтоксикації та малих доз радіації, полягає у виснаженні пулу оксигеназних реакцій, зростанні ендогенної інтоксикації і є прогностично несприятливою, характерною ланкою розвитку оксидативного стресу.

Таким чином, корекція за бінарної дії екологічних екстремальних чинників має бути спрямована на підтримання балансу пероксидних та антиоксидантних процесів через адекватну інтенсифікацію окисних реакцій і засвоєння енергії у процесі формування нових стаціонарних рівнів.

**АКТИВНІСТЬ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА МОРФОЛОГІЯ
КЛІТИН КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА В УМОВАХ ДІЇ
РЕНІЙ – ПЛАТИНОВОЇ СИСТЕМИ**

¹КОНОНОВА Г. С., ²АНТОНЮК С. В., ¹ШТЕМЕНКО Н. І.

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;

²Міський онкологічний центр, Дніпропетровськ, Україна;

e-mail: kononovaann@rambler.ru

Дослідження протипухлинних властивостей кластерних сполук ренію з органічними лігандами показали, що деякі сполуки ренію виявляють ефективну антипроліферативну активність у моделі пухлинного росту (карцинома Герена Т-8), підсилюють дію цис-платину з одночасним зниженням його токсичності [Anticancer Research 2007, Dalton Transaction 2009]. Для з'ясування механізму дії металоорганічних сполук ренію та платини необхідним є дослідження морфологічних змін клітин пухлини, що відбуваються за гальмування росту новоутворень. Метою роботи було вивчення інтенсивності проліферації пухлини під дією системи реній–платина (Re–Pt) та морфологічних змін пухлинної тканини у цих дослідах. Експеримент проводили на білих щурах лінії Вістар віком 2–3 місяці, вагою 100–180 г, яким було трансплантовано пухлину Т-8. Введення комплексів ренію проводили за схемою антиоксидантної терапії. Вивчалися динаміка росту новоутворень, морфологічні показники пухлинної тканини, проводилось імуногістохімічне вивчення зразків за допомогою антитіл до PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). З'ясовано, що введення більшості сполук ренію окремо призводить до гальмування пухлинного росту до 60%. У разі застосування системи Re–Pt відбувається значне пригнічення росту пухлини (до 13 разів порівняно з цис-платиновою групою), яке за введення комплексів ренію з тетраізобутиратними лігандами та цис-платином у ліпосомній формі та тетраацетатодифосфатного комплексу ренію та цис-платину у вигляді наночастинок сягало близько 50 разів. При цьому в цис-платиновій групі спостерігалася поява багатоядерних гігантських клітин (20–30% пухлинних клітин), кількість яких у разі використання системи Re–Pt знижувалась на 93–95%. Застосування системи Re–Pt призводить до зменшення полів некрозу на 98% та патологічних мітозів на 20–25% порівняно з контролем, зменшення ділянок ослизнення приблизно на 50%, збільшення кількості апоптотичних клітин у 2–5 разів. Кількість PCNA-позитивних клітин у препаратах Т-8 становить 90–98% у разі застосування системи Re–Pt їхня кількість знижувалась до 77%. Виявлена проліферативна активність гігантських клітин. Отже, використання системи Re–Pt призводить до деструкції пухлинної тканини, зміни її морфологічних показників, які вказують на виражені ознаки лікувального патоморфозу.

5'-НУКЛЕОТИДАЗНА АКТИВНІСТЬ ГЕПАТОЦИТІВ І КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ЩУРІВ, ПОПЕРЕДНЬО ОПРОМІНЕНИХ МАЛИМИ ДОЗАМИ РАДІАЦІЇ

КОПИЛЬЧУК Г. П., БУЧКОВСЬКА І. М.

*Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru*

Мета роботи – дослідити 5'-нуклеотидазну активність у клітинах печінки та карциноми Герена щурів-пухлиноносіїв на фоні їхнього попереднього фракціонованого опромінення малими дозами радіації.

У клітинах злоякісного новоутворення щурів-пухлиноносіїв динаміка 5'-нуклеотидазної активності змінюється в міру росту пухлини, досягаючи максимальних значень на термінальних етапах канцерогенезу. У групі тварин із карциномою Герена, трансплантованою на фоні попереднього фракціонованого опромінення малими дозами радіації, досліджувана ензиматична активність 5'-нуклеотидази досягає максимальних значень на логарифмічній стадії росту пухлини, перевищуючи аналогічні показники неопромінених пухлиноносіїв у 2 рази. У період стаціонарного росту та метастазування пухлини попереднє опромінення малими дозами призводить до зниження нуклеотидазної активності, що зумовлено посиленням гіпоксії та некротичних процесів неоплазми на термінальних етапах канцерогенезу.

У гепатоцитах щурів-пухлиноносіїв впродовж усього експериментального періоду має місце підвищення нуклеотидазної активності із досягненням максимальних значень на стаціонарній стадії пухлинного росту, що, очевидно, не стільки пов'язано з компенсаторно-приспосувальними функціями печінки, скільки репрезентує вплив пухлини на організм. У клітинах печінки попередньо опромінених щурів на латентній стадії росту неоплазми відбувається вірогідне підвищення 5'-нуклеотидазної активності, яке нівелюється на термінальних етапах канцерогенезу.

Отже, ріст карциноми Герена в організмі тварин, попередньо опромінених малими дозами радіації, характеризується зниженням нуклеотидазної активності в гепатоцитах на логарифмічній та стаціонарній стадіях на фоні активації досліджуваної активності в клітинах новоутворення в період посиленого росту неоплазми.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН
ХРОМАТИНУ ТА СИСТЕМ ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ
КЛІТИН ПЕЧІНКИ ПОПЕРЕДНЬО ОПРОМІНЕНИХ
ПУХЛИНОНОСІЇВ**

КОПИЛЬЧУК Г. П., ВОЛОЩУК О. М.

*Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: kopilchuk@gmail.com*

Мета роботи – вивчення структурно-функціонального стану хроматину та систем енергозабезпечення клітин печінки щурів із карциномою Герена, трансплантованою на фоні попереднього тотального фракціонованого низькодозового опромінення.

Дія двох потужних пошкоджуючих чинників на організм, якими є низькодозове фракціоноване опромінення та канцерогенез, виражається в поглибленні процесів розбалансування функціонування мітохондріального геному та систем енергозабезпечення клітин печінки порівняно з групою неопромінених тварин-пухлиноносіїв, починаючи вже з латентної стадії росту карциноми Герена.

Посилена генерація супероксиданіону спричинює зміни молекулярних структур мітохондрій, що виявляються в підвищенні рівня фрагментації і ампліфікації дефектної мтДНК, інтенсифікації процесів окислювальної деструкції та фракційному перерозподілі продуктів мітохондріальної трансляції, що супроводжується змінами ензиматичної активності сукцинатдегідрогенази та АТР-ази. За таких умов дихальний ланцюг мітохондрій стає потужним продуцентом активних форм кисню, які, ймовірно, виступають у ролі тригерного фактора в запуску порушень структурно-функціональної організації хроматину клітин печінки.

За умов збільшення продукування активних форм кисню в печінці щурів посилюються процеси окислювальної деструкції ядерних протеїнів порівняно з пухлиноносіями, які не зазнавали впливу радіації. Це супроводжується активацією гістонспецифічної протеїнази, підвищенням рівня фрагментації ядерної ДНК та зниженням її матричної активності.

Отже, ріст карциноми Герена на фоні попереднього опромінення організму малими дозами радіації супроводжується порушеннями структурно-функціонального стану хроматину та систем енергозабезпечення клітин печінки, вже починаючи з латентної стадії онкогенезу.

ДИНАМІКА РІВНЯ ЕНДОГЕННИХ БРАСИНОСТЕРОЇДІВ ЗА ДІЇ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

¹КРАВЕЦЬ В. С., ¹КРЕТИНІН С. В., ²ДРАЧ С. В.,
¹ДЕРЕВ'ЯНЧУК М. В., ²ЛИТВИНОВСКА Р. П., ²ХРИПАЧ В. А.

¹Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua;

²Інститут біоорганічної хімії НАН Білорусі, Мінськ;
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Брасиностероїди (БС) – унікальний клас високоактивних полігідроксильних стероїдних гормонів рослин. Позитивний фізіологічний вплив БС на відміну від інших гормонів виявляється у значно нижчих – наномолярних – концентраціях. Подібно до стероїдних гормонів у тварин БС регулюють ключові процеси росту і розвитку в рослин. Останнім часом акцент біологічного впливу БС зміщується на їхню роль в адаптаційних реакціях рослин. Було встановлено, що за стресових чинників середовища БС індукують експресію цілої низки генів, продуктами яких є протеїни теплового шоку, антиоксидантні системи, компоненти фотосинтетичного апарату. Зниження рівня ендogenous брасиностероїдів методами генетичної інженерії – «вимикання» гена, залученого до їхнього біосинтезу, призводить до редукованого фенотипу рослин. Наше дослідження присвячене аналізу динаміки рівня ендogenous БС у процесі адаптації рослин до дії низьких температур як механізму регуляції метаболізму.

Проведений нами аналіз БС у різних тканинах рослин кукурудзи виявив значний вміст БС в ендоспермі і зародку насіння і порівняно незначну кількість у проростках. За дії холодового стресу у проростках рослин на порядок збільшується рівень ендogenous БС. Підвищений рівень БС спостерігається упродовж всього експерименту – сім діб низькотемпературного стресу. Максимум зростання рівня БС (у двадцять разів) зафіксований на сьому добу. Аналіз вмісту різних брасиностероїдів методами імуноцитохімії в загальній фракції БС виявив значне зростання (у тридцять разів) гомобрасиноліду вже на першу добу низькотемпературного стресу. Менш значним було зростання рівня епібрасиноліду, брасиноліду та інших лактонів. Наведені дані свідчать про важливу роль брасиностероїдів в адаптації рослин до низьких температур. Біосинтез БС імовірно пов'язаний з регуляцією і адаптацією метаболізму клітин у відповідь на дію стресорного чинника.

Робота виконана при підтримці Фонду фундаментальних досліджень України (грант №Ф29.4/019) і Білоруського республіканського фонду фундаментальних досліджень (грант № Х07К-045).

**УЧАСТЬ ПРОТЕЇНКІНАЗИ С В РЕГУЛЯЦІЇ
ПРОЦЕСУ ЗАХОПЛЕННЯ ГЛУТАМАТУ НЕРВОВИМИ
ЗАКІНЧЕННЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ
В УМОВАХ ЗМІНЕНОЇ ГРАВІТАЦІЇ**

КРИСАНОВА Н. В., СІВКО Р. В., БОРИСОВА Т. О.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: tborisov@biochem.kiev.ua*

L-глутамат є одним з основних збуджуючих медіаторів в ЦНС. В той же час, тривале підвищення його позаклітинної концентрації може призвести до розвитку глутаматної нейротоксичності, що виникає внаслідок надмірної стимуляції рецепторів та призводить до загибелі нейронів. Таким чином, підтримання позаклітинної концентрації глутамату на низькому рівні є надзвичайно важливим. Єдиним шляхом швидкого видалення нейромедіатора з позаклітинної рідини є його поглинання клітинами за участю високоафінних Na^+ -залежних глутаматних транспортерів. Швидка регуляція активності транспортерів глутамату здійснюється за рахунок зміни поверхневої експресії їх на плазматичній мембрані, що може відбуватися за участю протеїнкінази С.

Раніше нами було показано, що після гіпергравітаційного навантаження активність транспортерів глутамату зменшується, що може бути спричинене зменшенням їх кількості на плазматичній мембрані. Тому метою роботи було дослідити можливість участі протеїнкінази С в регуляції активності транспортерів глутамату в умовах гіпергравітації. З використанням радіоізотопних методів було проаналізовано вплив інгібіторів протеїнкінази С (GF 109 203X та бісіндолілмалеїмід II) на захоплення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами.

Інкубація з GF 109 203X призводить до зменшення захоплення приблизно на 15% в контрольних синаптосомах та майже не впливає на захоплення в синаптосомах після гіпергравітації. У контролі початкова швидкість захоплення глутамату у присутності інгібітора знижується з $2,5 \pm 0,2$ до $2,17 \pm 0,1$ нмоль/хв на 1 мг протеїну, в той час як після гіпергравітації цей показник знижується з $2,05 \pm 0,1$ до $2,04 \pm 0,1$ нмоль/хв на 1 мг протеїну. Схожий ефект призводить і вплив бісіндолілмалеїмід II, який знижує початкову швидкість захоплення L-[^{14}C]глутамату в контролі до $2,0 \pm 0,1$ нмоль/хв на 1 мг протеїну ($P \leq 0,05$), а після гіпергравітації початкова швидкість у присутності інгібітора навіть незначно підвищується до $2,08 \pm 0,1$ нмоль/хв на 1 мг протеїну. Таким чином, зміни поверхневої експресії глутаматних транспортерів на плазматичній мембрані, що відбуваються за участю протеїнкінази С, можуть спричинювати зменшення активності транспортерів глутамату після впливу гіпергравітації.

**АКТИВАЦІЯ ПРЕСІНАПТИЧНИХ ГЛУТАМАТНИХ
РЕЦЕПТОРІВ СТИМУЛЮЄ ГАМКЕРГІЧНУ
НЕЙРОТРАНСМІСІЮ ТА УТВОРЕННЯ АКТИВНИХ
РАДИКАЛІВ КИСНЮ**

КРУПКО О. О., ТАРАСЕНКО А. С., ГІММЕЛЬРЕЙХ Н. Г.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: olya_krupko@mail.ru*

Наша робота спрямована на дослідження подій, які відбуваються в нервовій терміналі внаслідок активації пресинаптичних глутаматних рецепторів. З цією метою після додавання агоністів глутаматних рецепторів (глутамату, каїнату та НМДА) оцінювали вивільнення гальмівного нейромедіатора ГАМК і генерацію активних форм кисню (АФК). Як інструменти дослідження було використано $^3\text{[H]}$ -ГАМК і АФК-чутливий флуоресцентний барвник дихлорфлуоресцеїн діацетат. Робота проводилась на ізольованих нервових закінченнях із гіпокампу та кори мозку щурів.

Результати експериментів показали, що глутамат, каїнат та НМДА дозозалежно стимулюють вивільнення $^3\text{[H]}$ -ГАМК із нервових терміналей, після чого спостерігається зворотнє захоплення нейромедіатора. Такий характер відповіді вказує на те, що вивільнення ГАМК відбувається з везикулярного пулу, тобто внаслідок Ca^{2+} -залежного екзоцитозу.

Збільшення рівня секреції ГАМК може бути пов'язане безпосередньо із входом Ca^{2+} внаслідок активації іонотропних глутаматних рецепторів чи з подіями, що опосередковані змінами внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , зокрема з генерацією АФК. Відомо, що активація нейрональних глутаматних рецепторів ініціює розвиток різних подій, включаючи вхід катіонів та активацію NO-синтази і утворення супероксиду, що є необхідною умовою розвитку довготривалої потенціації. Як показано нами, за активації пресинаптичних рецепторів відбувається також стимуляція процесу утворення АФК. За допомогою специфічних агоністів (каїнату та НМДА) продемонстровано, що активація як каїнатних, так і НМДА-рецепторів призводить до підсилення генерації АФК. В обох випадках цей ефект попереджається додаванням відповідних антагоністів (CNQX та APV). Цей процес залежить від іонів Ca^{2+} і у разі видалення Ca^{2+} з зовнішнього середовища підсилення генерації АФК не спостерігалось.

Ca^{2+} -залежна генерація АФК у нервових терміналях може забезпечуватись мітохондріями і/або NADP-оксидазою. Для з'ясування, який з цих шляхів задіяний в активації пресинаптичних глутаматних рецепторів, було використано різні енергетичні субстрати та неспецифічний блокатор NADP-оксидази дифеніленіодоніум хлорид (DPI). Результати досліджень свідчать, що в активації каїнатних рецепторів, на відміну від НМДА, як основне джерело АФК виступає NADP-оксидаза.

Таким чином, активація пресинаптичних глутаматних рецепторів спричинює стимуляцію вивільнення ГАМК та Ca^{2+} -залежну генерацію АФК. Виявлено, що активація різних типів глутаматних рецепторів ініціює різні механізми утворення АФК: NADP-оксидаза задіяна у разі каїнатного типу рецепторів і не бере участі в НМДА-індукованій генерації АФК.

ВЛИЯНИЕ ДИОЛОВ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ СПЕРМЫ ПТИЦ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

¹ЛИННИК Т. П., ¹ОВСЯННИКОВ С. Е., ¹МАРТЫНЮК И. Н.,
²НИКИТЧЕНКО Ю. В., ³ТЕРЕЩЕНКО А. В.

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: cryo@online.Kharkov.ua;

²Харьковский государственный университет
им. В. Н. Каразина, Украина;

³Институт птицеводства УААН, п. Борки,
Харьковская обл., Украина

Цель исследования – определить степень влияния диолов, используемых в качестве криопротекторов, на свободнорадикальное окисление липидов спермы петуха и индюка при хранении *in vitro*.

Использована сперма петухов и индюков коллекционных пород возрастом 10–12 месяцев. После эякуляции сперму петухов и индюков, разбавленную раствором глюкозы (320 мОсмоль), выдерживали 24 часа при 0 °С. Определяли содержание вторичных (гидропероксиды липидов (ГПЛ) и конечных (основания Шиффа) продуктов переокисления ненасыщенных жирных кислот, активность глутатионпероксидазы в образцах спермы петуха и индюка (109 клеток в мл) общепринятыми методами после инкубации в течение 30 мин при 20 °С с этиленгликолем (ЭГ), 1,2-пропандиолом (1,2-ПД) и 2,3-бутандиолом. Параллельно оценивали подвижность и количество сперматозоидов с поврежденной мембраной на конфокальном микроскопе Observe. Z1, окрашивая клетки пропидиум иодидом.

Установлено, что интенсивность свободнорадикального окисления (СРО) липидов в сперме индюка выше, чем в сперме петуха, а содержание ГПЛ на 25% больше, оснований Шиффа выше в 2,5 раза. Липиды сперматозоидов индюка содержат 84% фосфолипидов, 16% холестерина, петуха – 72 и 20% соответственно. Отношение полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) $n = 6/n = 3$ в сперме индюка ниже, чем в сперме петуха (9 и 16,8 соответственно), но содержание ПНЖК с $n = 9$ в 2,5 раза выше. Видимо, это обуславливает более высокую текучесть и активность СРО липидов в мембранах сперматозоидов индюка. Активность глутатионпероксидазы в мембранах сперматозоидов индюка на 35% также выше, что согласуется с известными данными литературы.

Инкубация спермиев петуха и индюка с криопротекторами приводит к изменению всех изученных характеристик СРО липидов их мембран. При применении в качестве криопротекторов ЭГ, 1,2-ПД и 2,3-БД наблюдается уменьшение содержания ГПЛ в сперме петуха, повышения активности глутатионпероксидазы не выявлено. В сперме индюка только под влиянием ЭГ и 2,3-БД отмечена такая же закономерность, но под влиянием 1,2-ПД содержание ГПЛ повышается. Содержание оснований Шиффа при инкубации с ЭГ и 1,2-ПД в сперме петуха и индюка по сравнению с контролем не изменяется, существенные отклонения наблюдаются только в присутствии 2,3-БД. Подвижность сперматозоидов петуха после инкубации с диолами уменьшается и одновременно увеличивается количество клеток с

поврежденными мембранами в следующей последовательности: ЭГ>1,2-ПД>2,3-БД, а у сперматозоидов индюка в последовательности: ЭГ > 2,3-БД > 1,2-ПД, что согласуется со степенью влияния изученных диолов на СРО липидов спермы петуха и индюка.

Обсуждается возможный механизм действия диолов на СРО липидов спермы птиц, обусловленного как физико-химическими свойствами веществ, в частности их мембранотропностью, проницаемостью в клетки и способностью влиять на транспорт других молекул через мембрану, так и особенностями липидного состава мембран и метаболизма сперматозоидов петуха и индюка.

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ЛІПІДИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ДОРΟΣЛИХ ЩУРІВ

¹ЛІТОВКА І. Г., ²ВЕСЕЛЬСЬКИЙ С. П., ¹БЕРЕЗОВСЬКИЙ В. Я.,
¹ЗАМОРСЬКА Т. М., ³ВЕСЕЛЬСЬКА Л. П.

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: litir@biph.kiev.ua;

²Інститут фізіології ім. Петра Богача КНУ
імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: SPVESEL@ukr.net;

³ДУ «Науковий центр радіаційної медицини АМН України», Київ

Відомо, що мелатонін – основний гормон епіфізу активно впливає на фізіологічну регенерацію кісткової тканини. Він регулює циркадні ритми метаболізму в кістковій тканині, модулює процес диференціації остеобластів та остеокластів, сприяє мінералізації матриксу у культурі, посилює синтез колагенових та неколагенових протеїнів органічного матриксу кістки.

Ліпіди є важливою складовою сполучної тканини. Проте їхня роль у мінералізації кісткової тканини вивчена недостатньо. Зокрема, це стосується ролі протеїново-ліпідних комплексів у процесах остеогенезу, в утворенні ядер кристалізації. Мета цієї роботи дослідити вплив екзогенного мелатоніну на якісний і кількісний склад ліпідів та їхні фракції у кістковій тканині дорослих щурів.

Досліди тривалістю 28 діб виконано у весняний період на 40 щурах-самцях лінії Вістар віком 11 та 15 місяців. Тваринам досліджуваних груп перорально у дозі 1 мг/кг маси тіла вводили 1 мл водної суспензії мелатоніну (Unipharm Inc., США) о 17.00, тобто у той час, коли його фізіологічна концентрація була мінімальною. Контрольним щурам у той самий час вводили еквівалентну кількість дистильованої води. У кістковій тканині визначали загальні ліпіди та їхні фракції за допомогою тонкошарової хроматографії.

Ліпідні фракції у стегновій кістці контрольних 11-місячних щурів розподілялися наступним чином: 28% припадало на загальні фосфоліпіди, 31% – на загальний холестерол, 20% – на тригліцероли і 21% – вільні жирні кислоти. Співвідношення між цими фракціями у загальному пулі ліпідів дорівнювало 1,1:1,2:0,8:0,9. За порівняння даних контрольної і дослідної груп тварин цього віку було виявлено вірогідне підвищення концентрації фосфоліпідів на 19%, зниження вмісту загаль-

ного холестеролу і вільних жирних кислот відповідно на 22,4 і 23,0%. Зміна вмісту загального холестеролу відбувається за рахунок вільного холестеролу, концентрація якого знижується на 26% ($P < 0,05$) відносно контрольних значень. Все це призводить до перерозподілу ліпідних фракцій у кістковій тканині досліджуваної групи тварин. 35% припадає на загальні фосфоліпіди, 25% – на загальний холестерол, 22% – на тригліцероли і 18% – вільні жирні кислоти. Відповідно змінюється і співвідношення між ліпідними фракціями як 1,4:1,0:0,9:0,7.

У контрольних 15-місячних щурів розподіл ліпідних фракцій відбувається наступним чином: 33% припадає на загальні фосфоліпіди, 30,4% – на загальний холестерол, 18,5% – на тригліцероли і 18,1% – вільні жирні кислоти або 1,3:1,2:0,8:0,7. Спрямованість змін ліпідних фракцій у 15-місячних щурів після впливу мелатоніну така сама, що і в 11-місячних тварин. Але ліпідні фракції в загальному пулі ліпідів розподіляються дещо по-іншому, а саме: 38% припадає на загальні фосфоліпіди, 28% – на загальний холестерол, 19% – на тригліцероли і 15% – вільні жирні кислоти або 1,5:1,1:0,7:0,6.

Одержані нами дані свідчать, що після впливу екзогенного мелатоніну у 11- і 15-місячних тварин зростає концентрація загальних фосфоліпідів. Це забезпечує умови для підвищення здатності фосфоліпідів приєднувати кальцій та інші катіони, посилює зв'язок між полярними ліпідами і протеїном, забезпечує повноцінне функціонування кісткової тканини.

ПОРІВНЯННЯ ВПЛИВУ КСЕНОБІОТИКІВ НА РОЗВИТОК *Drosophila melanogaster* ТА ЇХНІЙ ЗВ'ЯЗОК З АНТИОКСИДАНТНОЮ СИСТЕМОЮ

ЛОЗІНСЬКИЙ О. В., ЛУЩАК В. І.

Прикарпатський національний університет імені Василя
Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lozinsky_o@ukr.net

Drosophila melanogaster є зручним модельним об'єктом для вивчення впливу ксенобіотиків та токсикологічних досліджень загалом. Метою даної роботи було дослідження впливу ксенобіотиків – алоксану, кофеїну та нітропрусиду натрію на розвиток *D. melanogaster* лінії W^{1118} та стан антиоксидантної системи. Об'єктом дослідження були мухи лінії W^{1118} . Для одержання експериментального матеріалу мухи від стадії яйця до імаго розвивались на вуглеводно-дріжджовому середовищі з додаванням різних концентрацій ксенобіотиків: алоксану (0–20 мМ), кофеїну (0–4 мМ) нітропрусиду натрію (0–1,5 мМ). Активність антиоксидантних ензимів (глутатіон-S-трансферази, ізоцитратдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та аконітази) визначали загальноприйнятими методами. Розвиток і виживання *D. melanogaster* оцінювались як відсоток лялечок, які розвинулися після внесення яєць у кількості 150 штук на 20 мл середовища з різними концентраціями ксенобіотиків.

Внаслідок проведених досліджень було виявлено, що алоксан у концентрації 0–5 мМ не виявляє інгібуючої дії на розвиток мух. За вищої концентрації (20 мМ)

розвиток сповільнюється на 30 годин. Схожа тенденція спостерігається за дії кофеїну. Так, за його концентрації 0,5–4 мМ розвиток затримується в середньому на 35 годин. Нітропрурид натрію вже при концентрації 1 мМ сповільнює розвиток *D. melanogaster* на 40 годин. Активність ізоцитратдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази була вищою за дії всіх досліджуваних сполук, тоді як активність глутатіон-S-трансферази була вищою тільки за дії кофеїну. Активність аконітази знижувалася за дії високих (сублетальних) концентрацій ксенобіотиків. Слід зауважити, що відмічається чітка позитивна кореляція між активністю аконітази та виживанням мух.

Таким чином, можна дійти наступних висновків: всі досліджувані ксенобіотики за сублетальних концентрацій призводять до зниження активності аконітази і зростання активностей ізоцитратдегідрогенази і глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Найбільший вплив на розвиток *D. melanogaster* спричиняє нітропрурид натрію, тоді як найменш токсичну дію виявляє алоксан.

ВПЛИВ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ НА БІОХІМІЧНІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ У ПРОРОСТКАХ КУКУРУДЗИ

ЛУЩАК Ю. В., ЛУЩАК В. І.

*Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: julialushchak@ukr.net*

Актуальною проблемою для рослинництва є засолення ґрунтів. Метою даної роботи було дослідити вплив сольового стресу на ріст та біохімічні показники у проростків кукурудзи.

Експеримент проводили на десятиденних проростках кукурудзи, які вирощували на рідкому середовищі Хохланда. Експозицію проводили на різних концентраціях NaCl (0, 50, 100 та 200 мМ) протягом 1, 2 та 3 діб.

Внаслідок проведених досліджень було виявлено, що перенесення проростків на 100 та 200 мМ концентрації NaCl сповільнює ріст та накопичення маси стебла, тоді як 50 мМ NaCl не впливає на ці показники протягом трьох діб. Затримка росту кореня спостерігається на всіх використаних концентраціях на 1 добу, однак на 2 та 3 доби вірогідна різниця спостерігається тільки при концентрації 200 мМ. Маса кореня за даних умов достовірно не відрізняється.

Експозиція на концентраціях NaCl 100 та 200 мМ призводить до зростання концентрації всіх пігментів на 1-у добу. Однак на 3-ю добу при концентрації NaCl 200 мМ спостерігається зниження концентрації хлорофілу *b* та антоціанів. Концентрація ТБК-активних продуктів зростає на 26–45% на 1-у добу за дії всіх використаних концентрацій NaCl порівняно до контролю. На 2-у добу вірогідних змін не спостерігається. На 3-ю добу концентрація ТБК-активних продуктів зростає на 25% при найвищій концентрації NaCl. Дві концентрації NaCl (100 та 200 мМ) призводять до зростання активності гваяколпероксидази на 16 і 41% відповідно після 24 год впливу. Активність каталази зростає на 2-у та 3-ю доби за дії концент-

рації NaCl 50 мМ на 24 та 27% відповідно, а також на 3-ю добу при концентрації NaCl 200 мМ на 41%. Концентрація карбонільних груп протеїнів практично не змінюється протягом трьох діб впливу різних концентрацій NaCl. Винятком є концентрація NaCl 200 мМ за дії на 1-у добу, яка призводить до вірогідного зниження цього показника на 19%. Концентрації загальних тіолів вище контрольних значень при концентраціях 100 та 200 мМ на 1-у добу, при 50 та 200 мМ – на 2-у добу та при 200 мМ на 3-ю добу. Концентрація високомолекулярних тіолів вища за контрольні значення при концентрації NaCl 200 мМ на 1–3-ю добу. Концентрація низькомолекулярних тіолів зростає на 1-у добу при концентрації NaCl 100 мМ, при 50–200 мМ на 2-у добу. Однак на 3-ю добу концентрація їх є нижчою при концентрації NaCl 100 мМ порівняно з контролем.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРАНСФОРМАЦИИ *Agrobacterium rhizogenes* НА БИОСИНТЕЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ БАРВИНКА МАЛОГО (*Vinca minor*)

ЛЁШИНА Л. Г., БУЛКО О. В.

*Институт биоорганической химии и нефтехимии
НАН Украины, Киев;
e-mail: llioshina@bpci.kiev.ua*

Барвинок малый (*Vinca minor* L.) – лекарственное и декоративное растение из семейства кутровых (*Apocynaceae*), которое является уникальным источником ценных вторичных метаболитов, используемых фармацевтическими компаниями при производстве препаратов, улучшающих мозговое кровообращение. Это многолетнее, медленно растущее растение, размножающееся, в основном, черенками, поэтому его количество ограничено. Разработка биотехнологических приемов культивирования этого растения *in vitro* и способов повышения в нём биосинтеза биологически активных веществ является актуальной.

Исходя из этого, целью нашей работы было изучение влияния на биосинтез вторичных метаболитов трансформации барвинка малого почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes*, которая вызывает разрастание тканей, называемое «hairу root».

Для трансформации использовались стеблевые экспланты асептического растения барвинка малого, которые инкубировали с агробактериальными штаммами А4, R-1601, 8196, 15834 (любезно предоставленными И. Н. Кузовкиной, Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Россия), с последующим размещением их на безгормональной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 500 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий. Трансформация разными агробактериальными штаммами имела неодинаковую интенсивность. Самым эффективным оказался штамм R-1601. Наименьшее количество трансформантов для получения растительных эксплантов наблюдалось при применении штамма 15834. Образовавшиеся адвентивные корни характеризовались быстрым неорганизованным ростом и отсутствием геотропизма, что является непрямым доказательством культуры «hairу root».

Побеги из корешков были регенерированы на среде МС с добавлением 1 мг/л нафтилуксусной кислоты. Растения-регенеранты имели частично этиолированные листовые пластины, утолщенный стебель и более развитую корневую систему.

Интактные растения, культура корней и регенеранты были исследованы с помощью тонкослойной хроматографии на содержание в них алкалоидов. Для этого использовали подкисленный водный экстракт биомассы с подвижной фазой: *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (5:1:4). После хроматографирования высушенные пластины окрашивались реактивом Драгендорфа.

Визуальная оценка полученных хроматограмм показала, что уровень содержания алкалоидов был выше всего в интактных растениях. В растениях *in vitro* наблюдалось небольшое уменьшение количества алкалоидов. У каллусных культур отмечена минимальная концентрация вещества. В культуре корней содержание алкалоидов увеличивалось. Наибольшее количество их синтезировалось в растениях-регенерантах.

Таким образом, установлено, что в результате трансформации барвинка малого агробактериальным штаммом R-1601, в растениях-регенерантах повышается содержание алкалоидов по сравнению с интактными растениями и это повышение биосинтеза вторичных метаболитов наблюдается как результат трансформации растения почвенной бактерией *A. rhizogenes*.

РОЗВИТОК АПОПТОЗУ ТА АДЕНІННУКЛЕОТИДИ

МАЙДАНЮК А. В.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Уявлення про основні форми клітинної загибелі – апоптоз і некроз значно змінилися. Якщо раніше апоптоз вважався формою запрограмованої загибелі клітини на відміну від неконтрольованої – некрозу, то тепер дослідники вважають, що це по різному детерміновані, але запрограмовані форми клітинної загибелі. Одержані експериментальні результати, які вказують на те, що загибель клітин, яка починалась шляхом апоптозу, за певних умов, може закінчитись шляхом некрозу. Тобто при певних фізіологічних умовах механізми та ефектори цих альтернативних форм клітинної загибелі можуть бути пов'язаними та взаємозалежними. Якщо раніше розвиток апоптозу обмежували дією ефекторів на плазматичні мембрани, мітохондрії та ядро, то зараз значно розширилось коло цих субклітинних компонентів. Показано, що протеїнові ефектори лізосом, саркоплазматичного ретикулуму, апарату Гольджі беруть безпосередню участь в апоптозі. Більш сталим виявився висновок, що саме величина аденілатного енергетичного заряду Аткинсона визначає форму клітинної загибелі – апоптоз чи некроз. До відомого факту зниження продукції H_2O_2 (АФК) мітохондріями (МХ) у разі внесення в середовище інкубації ADP, слід додати закриття МХ-пор (РТР), а відповідно і ініціації апоптозу за наявності високих концентрацій аденіннуклеотидів. Наведені результати свідчать про контролюючу роль аденілатного енергетичного заряду в індукції апоптозу як на мітохондріальному рівні, так і на рівні активності ключових ензимів амфіболічних шляхів. Збільшилось і число претендентів на роль «АТР-сенсорів» які пов'язують із протеїнкіназою з низькою спорідненістю до АТР, МХ K^+ -АТР-залежними ка-

налами, МХ–АТР-залежною протеїназою, АМР-активуючою протеїнкіназою. Всі зазначені чинники є стресзалежними і беруть участь у регуляції енергетичного і метаболічного гомеостазу.

Нами показано зниження рівня АТР (на 25%), значення аденілатного енергетичного заряду (на 10%) та зростання АМР (на 40%) порівняно з контролем, через 2,5 години після рентгенівського опромінення суспензії тимоцитів в дозі 4,5 Гр, що може привести до «включення АТР-сенсорів» і мітохондріальної дисфункції, а зрештою до генетичної нестабільності, що і виявляється розвитком апоптозу.

АНТИФЕРМЕНТНЫЕ СВОЙСТВА БИОФЛАВОНОИДОВ

МАКАРЕНКО О. А., ЛЕВИЦКИЙ А. П., РОССАХАНОВА Л. Н.,
ХОДАКОВ И. В.

ГУ «Институт стоматологии АМН Украины», Одесса;
e-mail: igal64@gmail.com

Структурное многообразие биофлавоноидов предопределяет широкий спектр их биологического действия, в механизме которого важное место занимает взаимодействие с ферментами. Известно, что активация фосфолипазы А₂ (ФЛА₂) и тканевой протеолиз носят универсальный характер в качестве факторов патогенеза практически всех заболеваний.

Это и определило цель нашего исследования, в котором *in vitro* изучили способность некоторых флавоноидов ингибировать ФЛА₂ из пчелиного яда и ряд коммерческих протеолитических ферментов (химотрипсин, эластазу и трипсин из поджелудочной железы свиньи и коллагеназу из *Clostridium histolyticum*). В работе использовали 12 синтетических флавоноидов (Sigma, США) и 4 биофлавоноида, выделенных из растительного сырья (ГНЦЛС, г. Харьков). Степень ингибиторной активности препаратов изучали в трех повторностях в нескольких молярных концентрациях, позволяющих рассчитать IC₅₀.

Проведенные исследования показали, что флавоноиды обладают различной антипротеазной активностью. Самыми активными ингибиторами эластазы и трипсина оказались кверцетин, апигенин и лютеолин. Эти же флавоноиды обладали очень низкой активностью по отношению к коллагеназе и химотрипсину. Наоборот, гесперитин и нарингенин на фоне высокой способности ингибировать коллагеназу и химотрипсин, оказались весьма слабыми ингибиторами трипсина и эластазы. Генистеин, дайдзеин, катехин и флоретин – флавоноиды со средней ингибиторной эффективностью. Гликозиды флавоноидов по сравнению с их агликонами оказались более активными ингибиторами трипсина и коллагеназы. У растительных биофлавоноидов отмечена высокая ингибиторная активность по отношению к коллагеназе (байкалин) и трипсину (софорикозид и флаволигнаны расторопши).

Выраженной антифосфолипазной активностью обладали все изученные препараты, среди которых наиболее активными ингибиторами ФЛА₂ оказались биофлавоноиды байкалин и софорикозид, а также агликаны синтетических флавоноидов.

Полученные данные позволяют считать, что в механизме лечебно-профилактического действия флавоноидов и растений, содержащих эти соединения, наря-

ду с выраженными антиоксидантными свойствами существенную роль играет их способность ингибировать ФЛА₂ и протеолиз, т.е. воздействовать одновременно на универсальные звенья патогенеза многих заболеваний.

МЕТАБОЛІЧНИЙ ПРОФІЛЬ КРОВІ ДВОРІЧОК КОРОПА ЗА РІЗНОГО РІВНЯ ХРОМУ В РАЦІОНІ

МАРИНИЧ І. М., ЯНОВИЧ В. Г.

*Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: marynychirina@gmail.com*

В останні роки встановлено, що додавання неорганічних і органічних сполук хрому до раціону тварин і птиці позитивно впливає на деякі фізіологічні функції і ланки обміну речовин та різні сторони їх продуктивності. Зокрема, під впливом хрому у крові різних тварин знижується концентрація глюкози, холестеролу, триацилгліцеролів і продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), підвищуються їхні прирости і резистентність. Цим зумовлена актуальність вивчення впливу сполук хрому на обмін речовин в організмі ставових риб і їхня продуктивність, що зумовлено відсутністю таких даних в літературі.

У зв'язку з цим метою роботи було дослідження впливу неорганічної сполуки хрому CrCl₃·6H₂O на метаболічний профіль крові дворічок коропа за введення його в різній кількості у згодовуваний рибама комбікорм. Дослід проведено на чотирьох групах дворічок лускатого коропа (*Cyprinus carpio*) у дослідних ставах Львівської дослідної станції Інституту рибного господарства НААНУ. Риби першої групи, яким згодовували комбікорм без добавки хрому правили за контроль, рибама другої, третьої і четвертої груп згодовували комбікорм з добавкою хрому в кількості 200, 400 і 800 мкг/кг. Риби кожної групи вирощувалися в окремому ставу площею 0,2 га, щільність посадки 1500 риб/га, тривалість досліду три місяці. У крові риб після закінчення досліду визначали загальний вміст протеїну і відносний вміст окремих його фракцій, вміст глюкози, триацилгліцеролів, холестеролу, продуктів ПОЛ (дієнових кон'югатів, гідропероксидів ліпідів, ТБК-продуктів) і антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, каталази).

Встановлено, що концентрація протеїну в сироватці крові коропів другої, третьої і четвертої груп є меншою в 1,12; 1,62 і 1,45 раза, вміст холестеролу у плазмі крові – в 1,21; 1,25; 1,35 раза, а вміст триацилгліцеролів – більший в 1,44; 1,29 і 2,22 раза, ніж у коропів першої групи. При цьому концентрація дієнових кон'югатів у плазмі крові коропів другої, третьої і четвертої груп є меншою відповідно в 1,29; 1,28; 1,38 раза, концентрація гідропероксидів ліпідів – в 1,05; 1,55; 2,14 раза, концентрація ТБК-продуктів – в 1,05; 1,12 і 1,36 раза, порівняно до їхнього вмісту у коропів першої групи, різниця в активності супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази і каталази при цьому відсутня.

Одержані результати свідчать про дозозалежний регуляторний вплив хрому у разі підвищення його рівня в раціоні коропів на синтез сироваткових протеїнів, холестеролу і триацилгліцеролів та про інгібуючий вплив на пероксидні процеси в їхньому організмі.

**ВПЛИВ ІЗАТІЗОНУ НА МЕТАБОЛІЧНИЙ
СТАТУС ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ**

¹МАРТИНЕНКО О. І., ¹КИРИЛЕНКО Т. К., ¹СТЕПАНЮГІН А. В.,
²АДАМЧУК-ЧАЛА Н. І., ¹ЮРКЕВИЧ Л. Н., ¹ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А. І.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: Martynenko.Olena@gmail.com;

²Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

Дослідження молекулярних механізмів формування відповіді рослин на дію біологічних, фізичних та хімічних екзофакторів – актуальне і екологічно важливе завдання сучасної фітобіології. Питання впливу відомого противірусного, протипухлинного, імуномодуючого і антибактеріального препарату ізатізону на онтогенез рослин поки що залишається нерозв'язаним. Тому метою нашої роботи на початковому етапі було дослідити певні експериментальні закономірності дії ізатізону на рослинні організми в ранніх фазах їхнього розвитку. Враховуючи, що відповідь організму на дію екзофакторів формується на всіх рівнях його організації, у роботі застосовано комплексний підхід.

В експериментах використовували проростки пшениці «Асоціативна». Термін обробки ізатізоном попередньо зволоженого посівного матеріалу становив 1 годину. Рослини вирощували в лабораторних умовах протягом 20 днів на твердому носії (пісок) за температури 20 °С.

Показано, що ізатізон стимулює проростання посівного матеріалу на 15% і забезпечує синхронність цього процесу. Кількісну оцінку *in situ* метаболічного статусу дослідних рослин у процесі раннього періоду їхнього розвитку (20 днів) проводили з використанням РНК/ДНК-аналізу. Встановлені тенденції змін співвідношення РНК/ДНК – важливого індикатору метаболічного стану контрольних і дослідних зразків – істотно різняться. Підвищення метаболічної активності клітин проростків, оброблених ізатізоном, припадає на 5-й і 18-й день росту, тоді як у контролі – на 6-й і 10-й день експерименту. Всі піки метаболічної активності клітин дослідних проростків збігаються з мінімальними значеннями РНК/ДНК-показників відповідних контрольних рослин та навпаки. Одержані результати цілком узгоджуються з даними оцінки приросту надземної частини проростків та підтверджуються електронно-мікроскопічним аналізом структури ядер клітин апікальних меристем експериментальних рослин. Роль ізатізону в регуляції метаболічних процесів рослин при реалізації їхніх генетичних програм росту і розвитку обговорюється.

**ВМІСТ ПРОДУКТІВ ПЕРОКСИДНОГО
ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ І АКТИВНІСТЬ
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ У КРОВІ ВІДЛУЧЕНИХ
ПОРΟΣЯТ ЗА РІЗНОГО РІВНЯ ЦИНКУ В РАЦІОНІ**

МАРТИНИШИН І. М., СНІТИНСЬКИЙ В. В.

*Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: Kuchuni@ukr.net*

Цинк відіграє важливу роль у регуляції багатьох фізіологічних функцій і різних ланок обміну речовин в організмі тварин. Дефіцит цинку в раціоні поросят раннього віку призводить до затримки їхнього росту, порушення обміну вуглеводів і активності антиоксидантної системи, а підвищення його рівня – позитивно впливає на їхній ріст та зменшує негативну дію стресу на організм відлучених поросят внаслідок інгібування продукції кортикостероїдних гормонів. З метою з'ясування біохімічних механізмів, що лежать в основі антистресової дії цинку ми провели дослідження впливу різного його рівня в раціоні поросят на вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) і продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) та активність супероксиддисмутази (СОД) в їхній крові через різні терміни після відлучення від свиноматки.

Дослід проведено на шести групах підсисних поросят великої білої породи 24-денного віку. Поросятам всіх груп впродовж дослідів згодовували комбікорм, що містив відповідно 30, 60, 75, 100, 120 і 150 мг/кг цинку у вигляді $ZnSO_4$. Через 20 днів поросят відлучали від свиноматки і утримували в окремих клітках. Для досліджень одержували кров із передньої порожнистої вени поросят за 3 дні до відлучення від свиноматки, у день відлучення та через 5 і 10 днів після відлучення. У плазмі крові визначали вміст ГПЛ і продуктів, що реагують з ТБК, в еритроцитах – активність СОД.

Встановлено, що вміст ГПЛ у плазмі крові поросят на всіх стадіях дослідження знаходиться в оберненій залежності від вмісту цинку в комбікормі: у поросят 1-ї групи він є найвищим, а у поросят 5- і 6-ї груп – найнижчим. При цьому аналогічна різниця у вмісті ТБК-продуктів у плазмі крові поросят виражена значно меншою мірою. Вміст ГПЛ у плазмі крові поросят після відлучення від свиноматки різко підвищується і залишається на такому самому рівні через 5 і 10 днів після відлучення. Ці дані свідчать про тривале посилення пероксидного окислення ліпідів в організмі поросят після відлучення від свиноматки і залежність цього посилення від рівня цинку в їхньому раціоні. При цьому виявлено пряму залежність між рівнем цинку в раціоні поросят і активністю СОД в еритроцитах. Ці дані свідчать про те, що антистресова дія цинку в разі підвищення його рівня в раціоні поросят зумовлена підвищенням активності ензиматичної ланки антиоксидантного захисту.

ВМІСТ ЦИТОХРОМУ b_5 У МІКРОСОМНІЙ ФРАКЦІЇ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ПОПЕРЕДНЬО ОПРОМІНЕНИХ ЩУРІВ-ПУХЛИНОНОСІЇВ*МАРЧЕНКО М. М., КЕЦА О. В.**Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: ketsa80@mail.ru*

Цитохром b_5 – гемопротейн бере участь у біохімічних окисно-відновних реакціях як переносник електронів. Мікросомна ізоформа цитохрому b_5 відіграє важливу роль як редокс-партнер в реакціях, що каталізуються різними ізоформами цитохрому $P-450$ та може виявляти неоднозначний вплив на активність ізоформ термінальної монооксигенази.

Мета роботи – визначити вміст цитохрому b_5 у мікросомній фракції карциноми Герена попередньо опромінених щурів-пухлиноносіїв.

Результати проведених досліджень показали, що в міру росту карциноми Герена в неопромінених щурів вміст мембранозв'язаного цитохрому b_5 у пухлинній тканині поступово знижується з мінімальними значеннями на термінальній стадії онкогенезу (21-а доба після трансплантації карциноми Герена). Встановлений факт може бути наслідком інтенсифікації процесів пероксидного окислення ліпідів із наступною деградацією цитохрому b_5 .

Попереднє перед трансплантацією карциноми Герена опромінення призводить до зниження вмісту цитохрому b_5 у мікросомній фракції пухлинної тканини на всіх етапах онкогенезу порівняно з неопроміненими пухлиноносіями. Найсуттєвіше зниження спостерігається в період інтенсивного росту пухлини (14-а доба після трансплантації пухлини), коли гідроксилазна активність цитохрому $P-450$ залишається на високому рівні. Імовірно, цитохром b_5 , окислюючись активними формами кисню, що генеруються за дії опромінення, виявляє захисну дію на молекули термінальної оксигенази. У даному випадку передача електронів в монооксигеназному циклі може здійснюватися від NADPH-цитохром $P-450$ -редуктази, що попереджає порушення функціонування цитохрому $P-450$, інтенсифікуючи процеси онкогенезу.

Отже, попереднє перед трансплантацією карциноми Герена опромінення призводить до зниження вмісту цитохрому b_5 , який може виступати в ролі акцептора активних форм кисню, проявляючи захисну дію на молекули термінальної монооксигенази.

РОЛЬ ГІПЕРКІЛЬКОСТІ ВІТАМІНУ А В ДЕГРАДАЦІЇ ЯДЕРНОЇ ДНК КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

МАРЧЕНКО М. М., ПАСАЙЛЮК М. В.

Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: masha_pas@mail.ru

Розвиток карциноми Герена супроводжується накопиченням вітаміну А в пухлинних клітинах і зниженням темпів її росту. Імовірно, що реалізація антитуморних потенцій вітаміну А здійснюється через індукцію клітинної загибелі, порушеної у трансформованих клітинах, критерієм ідентифікації якої служить специфічна фрагментація ядерної ДНК. Але невідомо чи впливає і яким чином вітамін А на деградацію ядерної ДНК пухлинної тканини в умовах прийому гіперкількості ретинолу ацетату. Тому метою роботи було вивчення впливу післятрансплантаційного застосування гіперкількості ретинолу ацетату (30 000 МО/кг/добу впродовж 7 діб) на деградацію ядерної ДНК карциноми Герена за попереднього нормального забезпечення організму вітаміном А (300 МО/кг/доба).

Вивчення характеру накопичення фрагментованої ДНК у клітинних ядрах карциноми Герена дозволили встановити, що семидобове введення вітаміну на фоні попереднього адекватного забезпечення організму ретинолом ацетатом обумовлює появу високомолекулярних фрагментів ДНК завдовжки від 10 до 50 т.п.н., а починаючи з 14-ої доби експерименту виявляються фрагменти величиною 180 п.н. і кратні їм, які на електрофореграмі розташовуються у вигляді «драбини». Враховуючи індукуючий вплив вітаміну А на ключову у протеолітичному каскаді клітинної загибелі ефекторну каспазу-3, а також присутність на ДНК респонзивних елементів вітаміну А, можна передбачити, що його ефекти опосередковані активацією програми клітинної загибелі, порушеної в пухлинних клітинах. Це припущення ґрунтується на тому, що характер фрагментації ДНК в клітинних ядрах карциноми Герена нагадує початкові етапи апоптозу, оскільки фрагменти величиною 10–50 т.п.н. дорівнюють довжині петель ДНК у хромосомі і характеризують крупноблокову фрагментацію ДНК. Поява на електрофореграмах фрагментів ДНК з величиною 180 п.н. і кратних їм характеризує термінальні етапи клітинної загибелі, оскільки величина в 180 п.н. характерна для нуклеосомного рівня організації ДНК і використовується для ідентифікації апоптозу.

Таким чином, застосування гіперкількості ретинолу ацетату на фоні його попередньої норми обумовлює деградацію ядерної ДНК карциноми Герена з утворенням фрагментів 10–50 т.п.н., 180 п.н. і кратних їм. Імовірно, виявлені особливості і є головним чинником низьких темпів росту карциноми Герена в умовах прийому гіперкількості ретинолу ацетату і становлять основу протипухлинного ефекту вітаміну А.

**РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ Fc- γ -РЕЦЕПТОРІВ
У ФЕТАЛЬНИЙ ПЕРІОД БИКА СВІЙСЬКОГО**

¹МАСЮК Д. М., ²НЕДЗВЕЦЬКИЙ В. С., ³ЦВІЛІХОВСЬКИЙ М. І.

¹Дніпропетровський державний аграрний університет, Україна;

²Дніпропетровський національний університет
імені Олеся Гончара, Україна;

³Національний університет біоресурсів і природокористування
України, Київ;

e-mail: masiuk.dn@biosafety-center.dp.ua

На сьогоднішній день достатньо детально вивчені механізми передачі Ig через плаценту до плоду та тонку кишку у ссавців, але відомості про формування у фетальний період трансепітеліальних імунологічних механізмів за участю Fc- γ -рецепторів (Fc γ R) у бика свійського відсутні. Тому метою нашої роботи було вивчення вікових аспектів регуляції експресії Fc- γ -рецепторів в ентероцитах порожньої кишки бика свійського у фетальний період онтогенезу.

Об'єктом досліджень були 48 плодів, віком від 3-ох до 9-ти місяців, отриманих від клінічно здорових корів, після забою в умовах м'ясопереробного підприємства. У дослідженнях використовували високоочищені фракції апікальних і базолатеральних мембран епітеліоцитів. Протеїнові фракції отримували із суспензії ізольованих ентероцитів порожньої кишки (використовували середню частину) методом диференціального центрифугування. Виявлення комплексів IgG – Fc- γ -рецептор проводили за допомогою імуноблотинга.

За результатами імуноблотингу ідентифіковані мембранні протеїни з Fc- γ -зв'язуючою активністю представлені поліпептидними зонами з молекулярними масами 120, 87, 72 і 43 кДа. Виявлені нами поліпептиди плазматичної мембрани ентероцитів відносяться до родини Fc γ R, оскільки вони афінно зв'язували як нативні імуноглобуліни класу G так і їх Fc-фрагменти.

Результати розрахунку відносного вмісту окремих поліпептидів Fc γ R на протилежних боках клітинної оболонки ентероцитів порожньої кишки плодів бика свійського показали, що протеїни з молекулярними масами (Mr) 120, 87 і 72 кДа переважають на базолатеральній мембрані до середини фетального періоду (плоди 5-ти місячного віку). Така специфіка розподілу, можливо, відображає функціональну спеціалізацію мембран внутрішньоутробного розвитку, що обумовлений гемотрофним типом живлення. Цей факт дозволяє припустити, що у ранній плодовий період бика свійського Fc γ R базолатеральної мембрани ентероцитів створюють комплекс із фетальним IgG і транспортують його на апікальну поверхню плазмолемі для участі в імунних механізмах захисту. У подальшому Fc γ R з Mr 87 і 72 кДа змінюють домінуючу локалізацію на апікальний полюс. Зміна полярності ентероцитів обумовлена розвитком травного каналу, збільшенням навколоплодової рідини та заковтуванням її плодом.

Експресія поліпептиду з Mr 43 кДа, який проявляє Fc- γ -зв'язуючу активність має зворотну залежність (у порівнянні з Fc γ R з Mr 87 і 72 кДа) та характеризується апікальною приналежністю у ранній фетальний період бика свійського. Можливо припустити, по аналогії з людиною, що у плодовий період бика свійського цей тип

Fc γ R грає важливу роль у транспортуванні IgG із амніотичної рідини у фетальну циркуляцію.

Отже, виявлена динаміка вмісту для кожного класу Fc γ R дає можливість припустити існування певної реципрокної взаємодії антигенного складу навколоплодової рідини зі стимуляцією імунної системи плоду. Регуляція експресії Fc- γ -рецепторів плазмолемі ентероцитів порожньої кишки бика свійського у фетальний період онтогенезу контролюються механізмами асоційованими з розвитком плоду.

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТЕЛИЦЬ ЗА ВВЕДЕННЯ У РАЦІОН СОЄВОГО МОЛОКА З НАСІННЯ НАТИВНОГО ТА ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНОГО СОРТІВ СОЇ

*МАТЮХА І. О., ФЕДОРУК Р. С., РІВІС Й. Ф.,
КОЛЕЩУК О. І., ЦАП О. Ф.*

*Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: irok_m@ukr.net*

Завданням роботи було дослідити вплив випоювання соєвого молока з насіння трансгенного та традиційного сортів сої ремонтним телицям на вміст жирних кислот у плазмі крові та антиоксидантний статус їхнього організму. Для цього було сформовано три групи новонароджених теличок української червоно-рябої молочної породи, по 8 голів у кожній. Телятам першої групи (I контрольна) в молочний і наступний періоди випоювали цільне і збиране молоко за прийнятою у господарстві схемою. Друга та третя дослідні групи (II і III) одержували взамін збираного молока соєве молоко. При цьому телиці II дослідної групи отримували соєве молоко виготовлене з бобів трансгенної сої, а тварини III групи з нативної сої. За періодами досліджень від тварин з кожної групи, а саме на 2-му місяці (підготовчий період), а також на 4-, 5- і 7-му місяцях життя відбиралися зразки венозної крові для біохімічних досліджень. У крові визначали жирнокислотний склад плазми крові, активність антиоксидантних ензимів та вміст продуктів ліпопероксидації.

Встановлено, що у плазмі крові тварин обох дослідних груп спостерігається тенденція до зниження рівня такої насиченої жирної кислоти, як стеаринова. Одночасно у крові вірогідно зростає вміст лінолевої поліненасиченої жирної кислоти, але зменшується — ліноленової. У плазмі крові телиць дослідних груп вірогідно збільшується кількість такої похідної лінолевої кислоти, як арахідонова. Характерно, що всі перелічені зміни були яскравіше виражені у групі тварин, яким випоювали соєве молоко з традиційного сорту сої.

Концентрація різних форм глутатіону у крові залишалася приблизно на одному рівні, з тенденцією до незначного підвищення її рівня у тварин дослідних груп на всіх етапах дослідження. Активність глутатіонпероксидази у крові тварин виявляє тенденцію до зростання.

Активність каталази вірогідних змін не зазнає, проте спостерігається тенденція до незначного підвищення її рівня у крові тварин обох дослідних груп на 4-му місяці життя, та зниження на наступних етапах дослідження. Активність супероксид-

дисмутази у крові тварин III групи вірогідно знижується на початку випоювання соєвого молока на 17%. На наступних етапах активність супероксиддисмутази знижується у крові тварин III групи і зазнає незначного підвищення у крові тварин II дослідної групи. Проте у всіх випадках активність досліджуваних ензимів антиоксидантного захисту не виходить за межі фізіологічної норми, що свідчить про адаптаційно врівноважену реакцію організму на введення до раціону соєвого молока на заміну нативного чи збираного молока.

Вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів — як гідропероксидів ліпідів, так і малонового діальдегіду знижується на всіх етапах досліду у крові тварин обох дослідних груп, що є додатковим свідченням ефективного функціонування антиоксидантної системи.

Отже, аналіз результатів свідчить, що підвищення вмісту лінолевої та її похідної — арахідонової — кислот у крові теличок імовірно пов'язане з високим вмістом їх у насінні сої. У той час наявність ліпооксигенази у соєвих бобах може зумовлювати зниження вмісту лінолевої кислоти. Стабільний фізіологічний рівень активності ензимів антиоксидантного захисту в комплексі з незначним зниженням інтенсивності накопичення продуктів ліпопероксидації може свідчити про певний антиоксидантний вплив ізофлавонів у складі соєвого молока.

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ГЛІКОЛІЗУ І ЦИКЛУ ТРИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ ЗА ДІЇ СТРОНЦІЮ ХЛОРИДУ

МЕЛЬНИЧУК Д. О., КЛІХ Л. В.

*Національний університет біоресурсів і природокористування
України, Київ;
e-mail: magystr_dep@twin.nauu.kiev.ua*

Солі важких металів, до яких відносять і стронцій, за своїми властивостями є хімічно активними речовинами, які у значній кількості спричиняють токсичний ефект в організмі. Токсичність їх визначається здатністю впливати на динамічну рівновагу в системі живих організмів, що зумовлено утворенням міцних зв'язків із хімічними компонентами клітини, головним чином з біологічними молекулами. Значне поширення стронцію у природі, постійна присутність його у тканинах та органах живого організму зумовлює необхідність глибокого вивчення механізмів впливу цього металу на біохімічні процеси. У зв'язку з цим метою роботи було вивчення впливу стронцію хлориду на активність окремих ензимів циклу трикарбонних кислот та гліколізу *in vitro*. Активність ензимів лактатдегідрогенази (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), ізоцитратдегідрогенази, (ІДГ, КФ 1.1.1.41) та малатдегідрогенази, (МДГ, КФ 1.1.1.37) визначали *in vitro* за рівнем поглинання NAD^+ , NADH , NADP та NADPH^+ (Mersk, Reanal), на спектрофотометрі СФ-46, за довжини хвилі 340 нм. Одержані дані оброблено статистично.

Результати досліджень показали залежність активності зазначених ензимів від концентрації стронцію. Причому, введення стронцію хлориду до інкубаційного середовища в концентрації 20 мг/мл, порівняно з контролем, знижує ак-

тивність ЛДГ, що бере участь у реакції відновлення піровиноградної кислоти з утворенням лактату на 17,3%. Активність ІДГ NADP-залежної, що каталізує реакцію декарбоксілювання ізоцитрату в альфа-кетоглутарат знижується на 69,4%, ІДГ NADPH⁺-залежної, яка каталізує реакцію перетворення оксалосукцинату в ізоцитрат знижується на 67,9%. Активність МДГ NAD-залежної та NADH⁺-залежної, що каталізують взаємоперетворення малату в оксалоацетат знижується на 63,4 та 43,1% відповідно. Введення стронцію хлориду до інкубаційного середовища в концентрації 2 мг/мл підвищує активність ЛДГ на 16,4%, при цьому активність інших досліджуваних ензимів вірогідно знижується порівняно з контролем. Виявлений характер змін може бути зумовлений властивістю металів брати участь у процесах комплексоутворення з природними лігандами, що містять тіолові групи, адже, відомо, що важкі метали здатні входити до складу металоензимних комплексів, що може спричинити активацію або інгібування таких сполук. Отже, згідно з результатами дослідження дійшли висновку, що сполуки стронцію здатні знижувати активність низки ензимів, що беруть участь в обміні речовин, а саме в реалізації циклу трикарбонних кислот та процесу гліколізу.

ВПЛИВ ВИСОКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ВУГЛЕВОДІВ НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ *Saccharomyces cerevisiae*

МОРГУЛЕЦЬ Л. М., СЕМЧИШИН Г. М.

Прикарпатський національний університет імені Василя
Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: lmorgulets@ukr.net

Глюкоза, фруктоза та продукти їхнього катаболізму здатні до неензиматичної взаємодії з макромолекулами клітини, що веде до утворення кінцевих продуктів глікації. Взаємодія системи неензиматичного глікозилювання та вільнорадикальних процесів вивчена недостатньо. До кінця не з'ясована також природа відмінностей між глюкозою та фруктозою у здатності до глікації та подальшого впливу утворених сполук на клітину. Метою роботи було дослідження впливу високих концентрацій глюкози та фруктози на біохімічні показники одноклітинних евкаріотів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

У дослідженнях використовували штам *S. cerevisiae* YPH250 (дикий тип). Показано, що інкубація клітин з 10%-им розчином глюкози або фруктози призводить до зростання рівня карбонільних груп протеїнів. Активність каталази на 5-у та 7-у добу на глюкозі в середньому у 1,3 раза вища, ніж у контролі. Подібним чином активність глутатіонредуктази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази за інкубації із глюкозою майже у 3,5 раза вище, ніж у контролі. У разі інкубації з фруктозою активність ензимів у цей час вірогідно нижча, порівняно з глюкозою. Цікаво, що на 5-у та 7-у добу спостерігається також у 1,2–1,4 раза вищий вміст α -дикарбонільних сполук у клітинах інкубованих з фруктозою. Загалом вміст цих сполук у клітинах різко зростає з часом інкубації вже на 1-у добу (у 50–60 разів він вищий від контрольних значень). Визначення вмісту карбонільних груп протеїнів та α -дикарбонільних сполук у супернатанті *in vitro* зі 100 мМ вуглеводів показало їхнє зрос-

тання з часом інкубації. Рівень α -дикарбонільних сполук за інкубації з фруктозою вище, ніж на глюкозі протягом всього часу інкубування.

Таким чином, інкубація клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* з вуглеводами призводить до зростання вмісту карбонільних груп протеїнів, що може свідчити про вплив глюкози та фруктози на розвиток окисних пошкоджень протеїнів. Тривале інкубування клітин з фруктозою зумовлює нижчу активність каталази, глутатіонредуктази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази порівняно з клітинами, інкубованими з глюкозою, що може бути наслідком вищого вмісту α -дикарбонільних сполук у клітинах дріжджів, інкубованих із розчином фруктози.

ЕНДОКАНАБІНОЇДИ РЕГУЛЮЮТЬ ПРОЦЕСИ СЛИНОВИДІЛЕННЯ ЧЕРЕЗ МОДУЛЯЦІЮ ПРОЦЕСІВ КАЛЬЦІЄВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ

¹НЕЦИК О. В., ²КОПАЧ О. В., ¹ФЕДІРКО Н. В.

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: olga.nets@gmail.com;

²Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

Ендоканабіноїдна система – складна ендогенна сигнальна система, яка ефективно модулює перебіг фізіологічних процесів шляхом активації специфічних канабіноїдних рецепторів типу СВ1 та СВ2. Згідно з даними літератури два типи канабіноїдних рецепторів (СВ1 та СВ2) експресуються у підщелепній слинній залозі (ПСЗ) щурів. Проте внутрішньоклітинні сигнальні механізми, які опосередковують біологічні ефекти ендоканабіноїдів вивчені недостатньо.

Дослідження проводили на щурах-самцях (130–160 г). Тварин анестезували внутрішньом'язовою ін'єкцією кетаміну (150 мг/кг маси тварини) в суміші з ліс-теноном (0,05 мл/кг). *In vivo* слину, яка виводилась протоками залоз, відбирали мікроканюлею, впритул підведеною до проток залоз у ротовій порожнині. Слиновиділення оцінювали за такими параметрами: швидкістю, концентрацією кальцію та протеїну. *In vitro* дослідження проводили на ізольованих ацинарних клітинах ПСЗ щурів. Клітини ізолювали із тканини залози після ензиматичної її обробки в зовнішньоклітинному розчині, що містив колагеназу. Вміст протеїну визначали за методом Лоурі, концентрацію Ca^{2+} – з використанням барвника арсеназо III.

Нами показано, що введення у залозу 50 мкл розчину агоніста СВ1 канабіноїдних рецепторів (R)-(+)-метанандаміду (5 мкМ) та агоніста СВ1 канабіноїдних рецепторів віродгаміну (30 мкМ) порівняно з контролем призводить до зниження швидкості нестимульованого слиновиділення в середньому на $22 \pm 8\%$ ($P < 0,05$, $n = 6$) та $31 \pm 6\%$ ($P < 0,01$, $n = 7$) відповідно. Також виявлено, що активація як СВ1-, так і СВ2-типів канабіноїдних рецепторів призводить до змін електролітного складу секретованої слини.

Оскільки секреція рідкої компоненти слини ПСЗ є кальційзалежним процесом, ми досліджували зміни сумарного вмісту кальцію в ацинарних клітинах за активації канабіноїдних рецепторів. *In vitro* прикладання до ізольованих ацинусів віродгаміну (30 мкМ) та (R)-(+)-метанандаміду (5 мкМ) у безкальцієвому зовніш-

ньюклітинному середовищі (1 мМ EGTA, 5 хв) спричинює порівняно з контролем зниження сумарного вмісту Ca^{2+} на $28 \pm 4\%$ ($P < 0,01$, $n = 8$) та $21 \pm 4\%$ ($P < 0,01$, $n = 5$) відповідно. Для дослідження впливу агоністів канабіноїдних рецепторів на депокерований вхід Ca^{2+} ізольовані ацинуси ПСЗ інкубували протягом 5 хв у безкальцієвому зовнішньоклітинному розчині (1 мМ EGTA) для активації каналів входу, а потім додавали Ca^{2+} до зовнішньоклітинного розчину для візуалізації вхідного потоку Ca^{2+} . Внаслідок додавання до інкубаційного середовища 2 мМ CaCl_2 (5 хв) в умовах активації канабіноїдних рецепторів ацинарних клітин віродгаміном (30 мкМ) спостерігається значне зростання сумарного вмісту кальцію в ацинарних клітинах ПСЗ у середньому на $130 \pm 22\%$ ($P < 0,001$, $n = 6$), тоді як за відсутності агоніста таке зростання становить у середньому $57 \pm 15\%$ ($P < 0,05$, $n = 6$). За цих же умов синтетичний агоніст канабіноїдних рецепторів обох типів – WIN 55,212-2 (5 мкМ) викликав зростання сумарного вмісту кальцію у клітинах на $118 \pm 16\%$ ($P < 0,05$, $n = 5$), тоді як за його відсутності – на $39 \pm 11\%$ ($P < 0,05$, $n = 5$); (R)-(+)-метанандамід (5 мкМ) – в середньому на $165 \pm 33\%$ ($P < 0,01$, $n = 5$), в той час як за відсутності цього агоніста – на $93 \pm 12\%$ ($P < 0,01$, $n = 5$).

Виявлені зміни слиновиділення, спричинені ендоканабіноїдами, ймовірно обумовлені модуляцією процесу вивільнення Ca^{2+} із ендоплазматичного ретикулуку і наступною активацією депокерованого входу Ca^{2+} .

СОСТОЯНИЕ GSH-ЗАВИСИМОЙ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ТИРЕОИДНЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

*НИКИТЧЕНКО Ю. В., ДЗЮБА В. Н., ПОПОВИЧ А. С.,
БОНДАРЬ В. В., ШЕРЕМЕТ А. А.*

*НИИ биологии Харьковского национального университета
им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: yunikitchenko@univer.kharkov.ua*

Работа посвящена выяснению основных закономерностей изменений активности GSH-зависимых антиоксидантных ферментов в тканях и содержания тиреоидных гормонов при моделировании замедленного и ускоренного старения крыс линии Вистар.

Установлено, что при моделировании замедленного старения тремя различными по степени ограничения калорийности диетами концентрация тироксина и, особенно, трийодтиронина в сыворотке крови животных снижалась пропорционально степени ограничения калорийности диеты. При этом активность Se-зависимой и Se-независимой глутатионпероксидазы в печени, сердце и крови подопытных крыс увеличивалась пропорционально степени ограничения калорийности диеты и хорошо коррелировала с концентрацией трийодтиронина. Изменение глутатион-S-трансферазной активности в исследованных тканях подопытных животных было сходным, но менее выраженным.

При моделюванні гіпотиреоїдного стану у крыс (модель уповільненого старіння) шляхом введення великих доз тироксину в перші 10 днів після народження встановлено, що в сировотці крові 3-місячних крыс концентрація загальної та вільної тироксину та трийодтироніну була суттєво понижена, а активність Se-залежної глутатіонпероксидази в мітохондріальній та постмітохондріальній фракціях печінки та в сировотці крові — значно підвищена.

При моделюванні прискореного старіння тривалим впливом тироксину, несбалансованої за вмістом тваринних білків та вітамінів антиоксидантного ряду дієти та надмірним харчуванням в ранній період постнатального онтогенезу крыс виявлено, що вміст тиреоїдних гормонів в сировотці крові тварин різного віку підвищений, а активність GSH-залежних антиоксидантних ферментів, особливо, активність Se-залежної глутатіонпероксидази в печінці, серці та крові значно понижено.

Таким чином, отримані результати свідчать про тісну взаємозв'язаність активності Se-залежної глутатіонпероксидази та концентрації тиреоїдних гормонів в сировотці крові та їхньої ролі в регуляції тривалості життя тварин.

ВМІСТ СПЕРМІДИНУ В НИРКАХ ЩУРІВ ІЗ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА

НИКОЛЮК І. Д., МУШІЙ Р. І.

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: igor_nykoluk@mail.ru*

Одним з перспективних напрямів сучасної біології та медицини є вивчення поліамінів — сперміну, спермідину, путресцину — ендогенних фізіологічних регуляторів клітинного метаболізму. Оскільки поліаміни беруть безпосередню участь у процесах росту, поділу та диференціювання клітин, вивченню ролі цих речовин при злоякісному рості приділяється особлива увага. Саме тому метою нашого дослідження стало вивчення вмісту спермідину в нирках щурів-пухлиноносіїв.

Дослідження проводили на білих щурах із трансплантованою карциномою Герена. Щурів було поділено на 2 групи: контрольну та щурів-пухлиноносіїв. Евтаназію тварин проводили на 10-, 18-, 25-у добу шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Вміст спермідину в нирках тварин вивчали методом високоефективної рідинної хроматографії. Розміри колонки 4×150 мм. Швидкість потоку — 1 мл/хв. Система елюенту: вода — метанол (60%). Детекція проводилась при 254 нм.

У нирках тварин-пухлиноносіїв на 10- та 18-у добу з дня імплантації карциноми зафіксовано зростання вмісту спермідину в 1,3 рази порівняно з контрольними тваринами. На 25-у добу експерименту відмічено збільшення вмісту спермідину у 1,5 рази.

Збільшення кількості спермідину в нирках щурів-пухлиноносіїв, перш за все, пояснюється тим, що він бере участь у контролі поділу та росту клітин, оскільки під час розвитку пухлини утворюється велика кількість метаболітів, які можуть порушувати ці процеси. Одержані дані підтверджують значну роль поліамінів, особ-

ливо спермідину, у процесах клітинної проліферації та захисну дію від продуктів ліпопероксидації. Раніше нами було показано зростання вмісту продуктів ліпопероксидації в нирках під час росту пухлини. Зростання продуктів ліпопероксидації спричинює руйнування паренхіматозної тканини нирок, оскільки спермидин є антиоксидантом, тому зростання його вмісту особливо на термінальній стадії росту новоутворення вказує на його захисну дію в нирках.

Отже, поліаміни, зокрема спермидин, відіграє важливу роль у захисті нирок під час росту злоякісного новоутворення.

ВМІСТ ВІЛЬНОГО ГЕМУ ТА АКТИВНІСТЬ КЛЮЧОВИХ ЕНЗИМІВ ЙОГО МЕТАБОЛІЗМУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА ІНГІБУВАННЯ NO-СИНТАЗ

НІКІТЧЕНКО І. В., ФИЛИМОНЕНКО В. П., КАЛІМАН П. А.

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: nikitchenkoiv@mail.ru*

У роботі досліджували вплив хлориду геміну (ХГ, 1,5 мг/100 г) на метаболізм гем у печінці і крові щурів в умовах попереднього введення інгібітора NO-синтази – N^o-нітро-L-аргініну (L-NNA, 3,5 мг/100 г). Тварин брали в дослід за 2 год або 24 год після ін'єкції ХГ.

Введення ХГ спричинює накопичення гемвмісних продуктів (ГВП) у сироватці крові та подальше надходження їх до тканин. До печінки гем може надходити шляхом ендцитозу в комплексі з гемопексином або неспецифічно захоплюватись клітинами. Останнє призводить до накопичення вільного (неспецифічно зв'язаного) гем у (ВГ) в цитоплазмі та активації вільнорадикальних процесів. Введення ХГ не впливає на вміст гемопексину у крові, а також не спричинює підвищення вмісту продуктів окислення ліпідів та протеїнів у печінці, що свідчить про домінування рецепторопосередкованого транспортування гем у. Як показник вмісту ВГ використовували насичення гемом (відношення активності холоензиму до загальної активності) триптофан-2,3-діоксигенази (ТДО), гемзв'язувального протеїну печінки. За 2 год після введення ХГ підвищується активність холоензиму, загальна активність та насичення гемом ТДО, а також знижується активність ключового ензиму синтезу гем у, 5-амінолевулінат-синтази (АЛКС), що свідчить про накопичення ВГ в печінці. За добу насичення ТДО гемом зменшується, а активність АЛКС підвищується. Індукція гемоксигенази (ГО), що відповідає за деградацію гем у, спостерігається за добу після ін'єкції ХГ. Введення L-NNA не впливає на динаміку рівня ГВП та гемопексину у крові, але повністю запобігає підвищенню насичення ТДО гемом. L-NNA запобігає також як зниженню активності АЛКС в перші години дії ХГ, так і підвищенню активності ензиму за добу. На індукцію ГО введення інгібітора не впливає. У низці робіт встановлено утворення нітрозильних комплексів гем у, що ефективніше захоплюються клітинами, ніж гем. Інгібування синтезу NO може призводити до зниження концентрації таких комплексів, отже до зменшення частки неспецифічного транспортування гем у до печінки. Відомо, що індукція ГО спричинюється також в умовах рецепторопосередкованого перенесення гем у.

Таким чином, введення ХГ спричинює накопичення ГВП продуктів у крові та подальше надходження їх до внутрішньоклітинного пулу вільного гему печінки. L-NNA запобігає зростанню вмісту вільного гему в печінці, що підтверджується динамікою активності ТДО та АЛКС.

COMPUTER MODEL FOR STUDIES OF IMPACT OF MITOCHONDRIA TRANSPORT SYSTEMS ON Ca^{2+} DYNAMICS IN PURKINJE NEURONS

NOVORODOVSKA T. S.

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Ukraine;
e-mail: ber_linn@yahoo.com*

There are several software simulators (GEPASI, VCell etc.) of biochemical processes in the cells and subcellular structures. However, most of these simulators do not allow modeling coupled biochemical and electrical processes, which are of special interest in case of such electrically excitable cells as neurons. On the other hand, existing neuron simulators (GENESIS, NEURON) are mostly used for modeling electrical processes taken separately from important biochemical processes. This work was aimed at bridging the gap between biochemical and electrical aspects of neuronal modeling by using the possibilities provided in the NEURON simulation environment, which is publicly available, regularly updated, properly maintained by the developers. NEURON favorably differs from other software tools as it allows studying coupled cellular electrical and concentration processes, developing and exploring models of different complexity, from simple, single-compartment to more multi-compartmental models, from individual dendritic or axonal segments up to reconstructed morphologically complex dendritic arborizations of neurons. We developed a mathematical model of a dendritic segment of Purkinje neuron containing mitochondria as the organellar Ca^{2+} stores for studies of the impact of the intracellular space occupancy by the organelles on cytosolic Ca^{2+} dynamics depending on the density of Ca^{2+} transporting molecules located in the mitochondrial membrane. The model equations took into account Ca^{2+} exchange between cytosol, extracellular medium, mitochondria, endogenous calcium buffers and fluorescent dye used in experiments. Mitochondria exchanged Ca^{2+} with the cytosol via uniporter and sodium-calcium exchanger. Such mitochondrial metabolic processes as the tricarboxylic acid cycle and aerobic cellular respiration were also simulated. The fraction of the intracellular volume occupied by mitochondria varied from 36 to 1%. Decreasing of the relative size of the mitochondria in the intracellular space led to the proportional decreasing of intracellular and mitochondrial Ca^{2+} concentrations. Increase of the maximal exchange flux between cytosol and mitochondria led to the proportional decrease in the peak values of the cytosolic and increase of mitochondrial Ca^{2+} concentrations. Thus, the occupancy of the intracellular volume by the stores is a structural factor that can significantly modulate Ca^{2+} concentration. This structural dependence can be adequately reflected in experiments using fluorophore. The kinetic characteristics of Ca^{2+} storing by the organelles are determined by the rates of binding to transport molecules present in the store membrane, and therefore are defined by concentrations (surface densities) of these molecules and their saturation at certain levels of cytosolic Ca^{2+} concentration.

УЧАСТЬ КАРБОАНГІДРАЗИ У РЕГУЛЯЦІЇ ФОТОФОСФОРИЛУВАННЯ В ІЗОЛЬОВАНИХ ХЛОРОПЛАСТАХ ШПИНАТУ

ОНОЙКО О. Б., ЗОЛОТАРЬОВА О. К.

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: membrana@ukr.net*

Швидкість фотохімічних реакцій у хлоропластах вищих рослин, зокрема фотофосфорилювання, залежить від наявності у середовищі вуглекислого газу та/або аніонів вугільної кислоти. Від концентрації форм вугільної кислоти залежить також світлозалежний протонний обмін у хлоропластах, який контролюється активністю карбоангідрози – ензиму, що каталізує гідратацію вуглекислого газу та дегідратацію бікарбонату. Існує думка, що фотофосфорилювання стимулюється внаслідок активації електронного та протонного транспортування аніонами HCO_3^- , однак дотепер взаємозв'язок цих процесів в умовах варіації концентрації $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ не проаналізовано. Метою даної роботи було вивчення рН-залежності впливу бікарбонату та інгібіторів карбоангідрози на швидкість синтезу АТР в ізольованих хлоропластах шпинату.

Об'єктом дослідження були хлоропласти 40-денних рослин шпинату (*Spinacia oleracea* L.). Концентрацію хлорофілу визначали за методом Арнона. Швидкість нециклічного та циклічного фотофосфорилювання оцінювали потенціометричним та гексокіназним методами в діапазоні рН 6,5–8,2.

Встановлено, що бікарбонат, доданий екзогенно до концентрації 3–6 мМ, ефективно прискорює швидкість фотофосфорилювання. Максимальна стимуляція спостерігається при рН середовища близько 7,0. У разі підвищення рН до 7,6–8,2 стимулюючий ефект HCO_3^- різко знижується. Стимуляція фотофосфорилювання бікарбонатом ефективно усувається після нетривалої інкубації хлоропластів у присутності інгібіторів карбоангідрози водорозчинного ацетазоламідру і ліпофільного етоксизоламідру в концентрації 0,5 мМ. Дія інгібіторів карбоангідрози найбільш виявлялася при рН середовища 7,6: швидкість синтезу АТР, яка у присутності 6 мМ бікарбонату перевищувала контрольну у 2,3 рази, після додавання ацетазоламідру і етоксизоламідру знижувалася і складала лише 120 та 125% контрольного значення відповідно.

Одержані дані дозволяють дійти висновку, що швидкість фотофосфорилювання залежить не тільки від концентрації бікарбонату, а й від активності карбоангідрози. Роль карбоангідрози, яка забезпечує швидко трансформацію форм вугільної кислоти, полягає у збереженні достатньо високої концентрації вільного бікарбонату, що акцептує протони в центрах їхнього звільнення та прискорює протонне перенесення.

**АКТИВАЦІЯ КАСПАЗИ-3 У ТРАНСФОРМОВАНИХ
Т-ЛІМФОЦИТАХ ЗА ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ
ФУЛЕРЕНАМИ C₆₀**

^{1,2}ПАЛИВОДА К. О., ²САМОЙЛЕНКО А. А., ¹ГРИНЮК І. І.,
¹ПРИЛУЦЬКА С. В., ²ДРОБОТ Л. Б., ¹МАТИШЕВСЬКА О. П.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: pkseniiia@yahoo.com

Пошук біологічно активних матеріалів для розробки фотодинамічної терапії, направленої на селективне знищення трансформованих клітин, є одним з актуальних завдань сучасної біохімії. У зв'язку з цим інтенсивно досліджується новий клас нанорозмірних вуглецевих сполук – фулеренів C₆₀. Молекула фулерену C₆₀ складається із шістдесяти вуглецевих атомів і має форму сфери діаметром 0,7 нм. Внаслідок фотозбудження проявляється здатність фулеренів C₆₀ генерувати в клітині активні форми кисню та спричиняти клітинну загибель. Механізми такої загибелі (апоптоз або некроз) вивчені недостатньо. Метою досліджень було оцінити життєздатність та функціональний стан каспази-3 в нормальних і трансформованих Т-клітинах за дії фотозбуджених фулеренів C₆₀.

Культивування клітин (тимоцитів щура і клітин людської лімфоми лінії Jurkat) проводили в CO₂-інкубаторі в середовищі RPMI 1640, що містило 10% ембріональної сироватки теляти. Суспензію клітин з фулередами опромінювали дейтерієво-ртутною лампою на відстані 5 см від джерела світла в діапазоні довжин хвиль 320–580 нм. Життєздатність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту. Активацію каспази-3 оцінювали Вестерн-блот аналізом.

Після короткотривалого опромінення видимим УФ-світлом клітин лінії Jurkat, що були передінкубовані протягом 1 год у присутності 10-5 М фулеренів C₆₀, життєздатність клітин знижувалася на 50 ± 4%. Виявлено залежність цитотоксичного впливу фотозбуджених фулеренів C₆₀ на трансформовані Т-клітини від часу опромінення та від концентрації діючих речовин. Показано, що через 24 год після фотозбудження фулеренів C₆₀ у клітинах лінії Jurkat виявлялися фрагменти з молекулярною масою 17 і 19 кДа, які є продуктами розщеплення прокаспази-3 (35 кДа). Рівень активації каспази-3 у клітинах Jurkat на цей час зростає у 20 разів порівняно з видимим УФ-опроміненням за відсутності фулеренів C₆₀. Водночас вплив фотозбуджених фулеренів C₆₀ на життєздатність тимоцитів щура не виявлено. Рівень активації каспази-3 у тимоцитах упродовж досліджуваного часу дії фотозбуджених фулеренів C₆₀ не перевищує рівень, який спостерігається під час спонтанного апоптозу тимоцитів. Виявлена вибірковість цитотоксичної дії фотозбуджених фулеренів C₆₀ на злоякісно трансформовані Т-лімфоцити свідчить про перспективність дослідження їхніх фотосенсибілізуючих ефектів.

ВПЛИВ ІНФІКУВАННЯ ЗБУДНИКОМ ЦЕРКОСПОРЕЛЬОЗУ НА ІНДУКЦІЮ мРНК ГЕНА ЛЕКТИНУ

ПАНЮТА О. О.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: panyuta@ukr.net

Досліджували динаміку вмісту мРНК захисного протеїну лектину у проростках контрастних за стійкістю сортів (сприйнятливого – Миронівська 808 та резистентного – Roazon) озимої пшениці (*Triticum aestivum* L.) за інфікування суспензією конідій *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton (титр $5-7 \times 10^4$ КУО/см³) впродовж шести годин з моменту інокуляції. Кількість мРНК визначали методом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР).

Внаслідок проведених досліджень виявили поступове накопичення мРНК лектину в здорових проростках сприйнятливого сорту: за перші 1,5 год вміст мРНК збільшився на 10% по відношенню до початкового рівня, а на 6-у годину – на 56%. Це підтверджує дані про існування в зародках пшениці пула запасних форм лектинових мРНК. На ранніх етапах інфікування (через 1,5 год з моменту інокуляції) зареєстровано істотний спад кількості мРНК (на 28% порівняно з контролем), ймовірно, під впливом супресорів гриба. Впродовж наступних годин експерименту зареєстровано поступове підвищення вмісту мРНК (з перевищенням контрольних значень на 10–15%) в інфікованих проростках, тобто відбувається подолання рослиною інгібуючої дії гриба і активація захисних реакцій.

У здорових проростках резистентного сорту виявили коливання (в межах 9%) вмісту мРНК із поступовим накопиченням. На підставі одержаних результатів припустили, що пул запасних форм лектинових мРНК є майже сформованим. В умовах інфікування кількість мРНК зростає із 3-ї години досліду і на 6-у годину – перевищує контрольні значення на 15%. На нашу думку, у відповідь на дію патогену відбувається експресія гена та накопичення мРНК лектину. Тобто індукується синтез мРНК захисних сполук, що сприяє формуванню набутої стійкості.

Порівняння результатів дослідження накопичення лектинової мРНК у проростках різних за стійкістю сортів пшениці показало, що і в контролі, і за інфікування вміст мРНК у проростках резистентного сорту є вищим, ніж у проростках сприйнятливого: у 2,6–3,8 та у 2,9–4,7 раза відповідно. Отже, запасний пул мРНК лектину у тканинах проростків відносно резистентного сорту набагато масивніший, що, ймовірно, забезпечує стійкість сорту до даного патогену.

**ВПЛИВ АРОМАТИЧНИХ СПОЛУК НА КІЛЬКІСТЬ
ТА ГЕТЕРОГЕННИЙ СКЛАД ПОВЕРХНЕВИХ ЛІПІДІВ
У ЛИСТКАХ РОСЛИНИ КАЛАНХОЕ**

ПАЩЕНКО Л. С., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет
імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: liliana.muzika@mail.ru*

Поверхневі ліпіди (ПЛ) у листках рослин – позаклітинний біохімічний бар'єр, який забезпечує пасивну стійкість рослинного організму. Існують дані про те, що ПЛ рослин не є повністю інертним шаром, якому притаманна тільки бар'єрна функція, а і про те, що ПЛ беруть участь у процесі адаптації. Метою цього дослідження було проаналізувати зміни складу ПЛ під впливом деяких ароматичних сполук. Об'єктами досліджень були рослини виду (*Kalanchoe digremonia* L.). Досліджували вплив хлорбензолу, нонілфенолу, 2,4,6-тринітрофенолу на склад ПЛ методами функціонального аналізу і хроматографії. Встановлено, що під впливом усіх ароматичних сполук відбувається збільшення кількості поверхневих ліпідів у 2,5–7,6 разів. Таку реакцію рослин слід вважати адаптивною, оскільки, на нашу думку, більш розвинений поверхневий шар в умовах екзогенної дії ефективніше захищає фотосинтетичний апарат рослини. Під впливом хлорбензолу практично не відбувається змін у полярності компонентів поверхневих ліпідів, оскільки величини R_f близькі до контрольних. Під впливом нонілфенолу значно зменшується полярність вуглеводної фракції (на 9,37%) та фракції оксосполук (на 10,25%). Під впливом 2,4,6 – тринітротолуолу знайдено тільки значні зміни у полярності оксосполук, а саме зменшення на 10,43%. Визначено різний характер змін у складі поверхневих ліпідів під впливом застосованих ароматичних сполук. Щодо впливу ароматичних сполук на полярність компонентів поверхневих ліпідів, то токсиканти можна розмістити у такий ряд: нонілфенол > тринітротолуол > хлорбензол. Знайдено, що під впливом ароматичних сполук відбувається зниження кількості оксосполук у середньому на 65–100% порівняно з контролем. Отже, показано, що під впливом ароматичних сполук відбуваються суттєві зміни складу ПЛ, які стосуються полярності компонентів та змісту оксосполук. Обговорюються можливі шляхи біосинтезу компонентів ПЛ, що можуть бути порушені дією ароматичних сполук.

**ВПЛИВ РІВНЯ NO₂⁻ НА ВИЖИВАНІСТЬ
ТА ПРОЛІФЕРАЦІЮ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН
В 2D- ТА 3D-КУЛЬТУРАХ**

ПЕРЕПЕЛИЦІНА О. М., ГАРМАНЧУК Л. В., НАУМЕНКО Н. М.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: natashaha2009@mail.ru*

Ендотелій продукує ряд важливих вазоактивних факторів, що беруть участь у формуванні та дозріванні судин. Одним із них є молекула NO₂⁻, яка утворюється із L-аргініну за участю ензиму NO-синтази (NOS). Припускають, що через NO₂⁻ опосередковується вплив на диференціацію та проліферацію ендотеліоцитів фактора росту ендотеліальних клітин (VEGF).

Мета роботи полягала у дослідженні залежності між концентрацією NO₂⁻ в культуральному середовищі та рівнем виживаності і проліферації ендотеліальних клітин.

Ендотеліальні клітини лінії МАЕС інкубувалися за умов моношарового (2D) та стероїдного (3D) росту з VEGF, донорами NO (натрій нітропрюсид – SNP), інгібіторами NOS (EDTA, LaCl₃), доданих у різних концентраціях, а також в умовах інкубації клітин за одночасного внесення VEGF та інгібіторів NOS. При цьому порівнювалася виживаність та проліферація клітин в 2D, 3D-культурах залежно від рівня NO₂⁻ в міжклітинному середовищі. Виживаність клітин і проліферація вимірювалася за допомогою МТТ-тесту та підрахунку живих/мертвих клітин після фарбування трипановим синім, кількість NO₂⁻ – з використанням реакції Гріса. Вірогідними вважалися дані з $P < 0,05$.

Встановили, що SNP значно підвищує рівень NO₂⁻ в 2D культурі (в середньому на $113 \pm 9\%$), та не впливає на продукцію NO₂⁻ клітинами сфероїдів. При цьому кількість живих клітин у моношарі під впливом SNP зменшується на $15,7 \pm 0,9\%$, тоді як в умовах 3D-росту показники виживаності не відрізняються від аналогічних у контролі. EDTA та LaCl₃ інгібують активність NOS відповідно на $35,8 \pm 1,78\%$ та $57,6 \pm 3,4\%$ в моношарі, збільшуючи кількість живих клітин на $46,1 \pm 3,1\%$ та $185 \pm 14\%$. На 3D-культурі зафіксовано, що EDTA зменшує кількість NO₂⁻ на $40,4 \pm 2,15\%$; виживаність також зменшується на $15,5\%$, а вплив LaCl₃ незначний. Продукція NO₂⁻ клітинами за умов 2D- та 3D-росту за додавання VEGF зростає на $93,2 \pm 5,8\%$ та $73,2 \pm 7,24\%$ відповідно. За одночасного інкубування клітин з VEGF і інгібіторами NOS показники продукції NO₂⁻ та виживаності такі самі, як за впливу інгібіторів NOS.

Отже, інгібітори NOS є ефективнішими активаторами проліферації, ніж VEGF у досліджуваних концентраціях. 3D-культури є менш чутливими до впливу донорів NO та інгібіторів NOS, ніж 2D-культури. Рівень проліферації обернено залежний від рівня NO₂⁻ як у разі додавання активаторів, так й інгібіторів NOS.

**ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ТРОГЛИТАЗОНА – СТРУКТУРНОГО
АНАЛОГА α -ТОКОФЕРОЛА – ОПОСРЕДУЕТСЯ
ИНГИБИРОВАНИЕМ NAD(P)H-ХИНОНОКСИДОРЕДУКТАЗЫ
(DT-ДИАФОРАЗЫ)**

ПЕТРОВА Г. В., ДОНЧЕНКО Г. В.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: petrova@biochem.kiev.ua*

Тиазолидиндионы, или глитазоны – класс фармацевтических препаратов для лечения диабета 2-го типа, первым из которых клиническое применение нашел троглитазон. Однако вскоре у пациентов обнаружилась высокая гепатотоксичность троглитазона, и после нескольких смертельных или требующих трансплантации печени случаев троглитазон был изъят из продажи. В то же время, химически модифицированные глитазоны, как например пиоглитазон, не проявляют токсичности и широко используются по сей день. Интерес для данного исследования представляет тот факт, что троглитазон в структуре молекулы содержит хромановое ядро, абсолютно идентичное α -токоферолу (α -ТФ), в то время как другие глитазоны его лишены. На сегодняшний день неизвестными являются не только сами механизмы, определяющие токсичность троглитазона, но и невыясненным остается вопрос о том, связаны ли они с наличием в структуре троглитазона хроманового ядра. Ранее нами показано, что укорочение длины боковой цепи в молекуле α -ТФ с 16 до 6 атомов углерода (α -ТФ-С₆) приводит к появлению цитотоксических свойств, что не характерно для нативного α -ТФ. Мы предположили, что троглитазон, с точки зрения его строения, можно рассматривать как α -ТФ с модифицированной боковой цепью, и что именно такая структура определяет его токсичность.

Установлено, что α -ТФ и пиоглитазон вплоть до концентрации 100 мкМ не изменяют жизнеспособность тимоцитов крысы, в то время как троглитазон и α -ТФ-С₆ оказывают выраженное цитотоксическое действие. Впервые показано, что троглитазон и α -ТФ-С₆, но не пиоглитазон, зависимым от концентрации образом ингибируют DT-диафорузу и этот эффект усугубляется ее специфическим ингибитором – дикумаролом. В то же время α -ТФ в эквимолярной концентрации увеличивает активность энзима на 45%. Полученные данные позволяют заключить, что цитотоксическое действие троглитазона и α -ТФ-С₆ сходно, связано с наличием в их структуре хроманового ядра с модифицированной, по отношению к нативному α -ТФ, боковой цепью и опосредуется ингибированием DT-диафразы – энзима детоксикации ксенобиотиков. Активация DT-диафразы самим α -ТФ может рассматриваться как один из механизмов его цитопротекторного действия по отношению к веществам, токсичность которых связана с модуляцией активности данного энзима.

ВПЛИВ ТІОАЦЕТАМІДУ НА ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ЕНЗИМІВ ПЕРОКСИДАЦІЇ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ

ПЕТРУНЬ Л. М., КРИСЮК І. П.

*Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: petrun@biochem.kiev.ua*

Відомо що, поліаміни впливають на активність багатьох ензимів внаслідок значної спорідненості до негативно заряджених ділянок протеїнових структур та здатності модифікувати конформацію макромолекул, знижуючи в кінцевому рахунку небезпечність ліпопероксидації та деструкції мембран, у тому числі і оксидативний стрес. Тіолові сполуки виконують захисну (за опромінення) та детоксикаційну роль, а тіоацетамід є специфічним індуктором орнітиндекарбоксілази – ензиму, що контролює синтез поліамінів. Відношення до тіоацетаміду двояке – з одного боку, він у певних концентраціях спричинює ріст пухлини в печінці щурів, а з іншого боку, введення тіоацетаміду в низьких дозах зумовлює регенерацію тканини печінки.

Оскільки останнім часом багато дослідників приділяють увагу явищу гіпобіозу, ми досліджували печінку нормальних щурів, тварин, що знаходились у стані штучного гіпобіозу, тварин, яким було введено тіоацетамід за 24 години до декапітації, та тварин, у яких на фоні введеного тіоацетаміду було спричинено стан штучного гіпобіозу.

Так, за входження щурів у стан гіпобіозу ксантиноксидазна (КОД) та ксантиндегідрогеназна (КДГ) активність значно підвищувались порівняно з контролем. Тіоацетамід зумовлює практично таке саме підвищення обох ензимів. Але дія тіоацетаміду на фоні гіпобіозу є зворотною. Активність ензимів зменшувалась, наближаючись до норми. У процесі ксантиноксидазної реакції відбувається окислення залізосірчаних центрів ензиму з утворенням супероксидного радикала. Далі утворений H_2O_2 дає початок гідроксильному радикалу через молібденовий кофактор, що супроводжується зміною валентності молібдену. Можливо на фоні введеного тіоацетаміду спостерігається конкурентне інгібування активності ензиму на етапі зміни валентності молібдену, коли гідрооксид переноситься на субстрат. У разі ксантиндегідрогенази можливо відбуваються деякі конформаційні зміни, і тоді вона стає доступнішою для тіоацетаміду.

Показано, що тіоацетамід, попередньо введений в організм щурів до стану гіпобіозу, конкурентно інгібує ксантиноксидазну та ксантиндегідрогеназну активність порівняно з гіпобіозом, наближаючи її до норми. Це підтверджується зміною співвідношення КОД/КДГ.

ЗМІНА АКТИВНОСТІ ФОСФАТИДИЛХОЛІН-ГІДРОЛІЗУЮЧИХ ФОСФОЛІПАЗ С РОСЛИН У ВІДПОВІДЬ НА ДІЮ БІОТИЧНОГО СТРЕСУ

¹ПОКОТИЛО І. В., ¹КРАВЕЦЬ В. С., ²МАРТІНЕЦ Я.

¹Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: pokotylo@ukr.net;

²Інститут експериментальної ботаніки
АН Чеської Республіки, Прага

Механізми внутрішньоклітинної трансдукції сигналів, що залучають вторинні месенджери як продукти каталізу мембранних фосфоліпідів за участю фосфоліпаз, на сьогодні постають одними з головних чинників регуляції метаболізму клітин рослин як за фізіологічних умов, так і за умов дії стресорних чинників середовища.

За допомогою використання флуоресцентно-міченого фосфоліпиду фосфатидилхоліну продемонстровано швидкі зміни рівня продукції діацилгліцеролу (ДАГ) у клітинах культур тютюну BY2 та арабідопсису AtH у відповідь на дію маркерних сполук асоційованих зі станом біотичного стресу. Концентрація ДАГ у мембранах клітин істотно змінювалась в умовах впливу ліпополісахаридних елісаторів та термоінактивованих бактерій *Pseudomonas syringae*, а також за дії специфічного елісатору – N-кінцевого 22-амінокислотного пептиду бактеріального протеїну флагеліну. Також продемонстровано зміну рівня продукції ДАГ в умовах дії рослинних гормонів – саліцилової кислоти та метилжасмонату, що залучені до процесів регуляції взаємодій рослина–патоген.

Припускається, що ДАГ є продуктом фосфатидилхолін-гідролізуючих фосфоліпаз С (ФХ-ФЛС) – ензимів, що залучені до регуляції активності протеїнкіназ С ссавців і які лише нещодавно були ідентифіковані у рослин.

Аналіз мутантних рослин арабідопсису з нокаутованими генами шести ідентифікованих ізогенів ФХ-ФЛС показав, що ці рослини характеризуються суттєво зниженим рівнем стійкості до атаки патогенних бактерій. Вивчення експресії генів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі дозволив виявити активацію експресії двох ізогенів фосфатидилхолін-гідролізуючих ФЛС в умовах атаки патогенних бактерій *Pseudomonas syringae* в перші вісім годин після інфікування.

У дослідженні розглядається можлива участь ФХ-ФЛС, нового компонента рослинного фосфоліпазного сигналізування, у регуляції клітинних захисних механізмів, спрямованих на захист проти дії патогенів.

Робота виконана за підтримки гранту Міжнародного фонду Вишеград, www.visegradfund.org

**ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ
МЕХАНІЗМІВ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОЇ ПЕРЕДАЧІ
СИГНАЛУ В УМОВАХ ЗЛОЯКІСНОГО РОСТУ
ТА ПРОМЕНЕВОЇ ТЕРАПІЇ**

*РАЄЦЬКА Я. Б., СТРОЦЬКА Є. А., МАНДРИК С. Я.,
ПРЕОБРАЖЕНСЬКА Т. Д., ОСТАПЧЕНКО Л. І.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: raetska@yandex.ru*

Онкологічні захворювання серед населення різних країн досягли загрозливого рівня. В Україні така тенденція прискорюється активними чинниками забрудненого довкілля, зокрема, внаслідок аварії на ЧАЕС. Вибір вірної стратегії лікування та розробка його нових способів потребує розуміння молекулярних механізмів виникнення злоякісних новоутворень, з'ясування яких є актуальною проблемою фундаментальної біології.

Метою роботи було з'ясування молекулярних механізмів трансдукції сигналів у клітинах різного походження у разі розвитку карциноми Герена і локального рентгенівського опромінення тварин у терапевтичних дозах.

У дослідах використовували білих лабораторних щурів-самців з масою тіла 130 ± 10 г, (розведення віварію УНДІОР), яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам трансплантували карциному Герена шляхом підшкірної ін'єкції у ділянку стегна задньої кінцівки 20%-ої суспензії пухлинних клітин на 0,9%-му розчині NaCl. При дослідженні ПОЛ та молекулярних механізмів трансдукції сигналу пухлину на 8-му добу після прищеплення піддавали локальному рентгенівському опроміненню в терапевтичних дозах на апараті РУМ-17 за таких умов: напруга – 180 кВ, сила струму – 10 мА, фільтри – 0,5 мм Cu +1,0 мм Al, потужність дози – 123 Р/хв, шкірно-фокусна відстань – 25 см. Тварин декапітували через 1, 3 та 7 діб після локального опромінення.

Останнім часом лікування злоякісних новоутворень ґрунтується на індивідуальному підході щодо вибору заходів. Радіотерапія залишається одним із головних методів лікування злоякісних новоутворень, поряд із хірургічним і хіміотерапевтичним лікуванням. Проте променева терапія призводить до стресового стану в організмі, який проявляється, зокрема, у пригніченні захисних протипухлинних реакцій.

На підставі проведених досліджень встановлено, що опромінення призводить до змін значень пероксидного окислення ліпідів та молекулярних механізмів трансдукції сигналу в умовах злоякісного росту. Порушення процесів пероксидації внаслідок опромінення супроводжувалося змінами активності аденілат- та гуанілатциклаз, вмісту цАМФ та цГМФ, а також ензимів, активність яких модулюється вищезазначеними чинниками (цАМФ-, цГМФ-, Ca^{2+} , фосфоліпідзалежні протеїнкінази). Отже, радіотерапія на певному етапі динаміки розвитку пухлин приводить до нормалізації біохімічних показників клітинного метаболізму. Кількісні зміни вмісту циклічних нуклеотидів, а також активності ензимів їхнього синтезу та гідролізу і тих, що каталізують завершені етапи проходження сигналів, засвідчують участь регуляторних систем у формуванні адаптаційних реакцій на пошкоджуючий вплив злоякісного росту та радіації.

**ЕФЕКТИ L-АРГІНІНУ НА ТКАНИННЕ ДИХАННЯ
ПЕЧІНКИ ЩУРІВ**

*РЕШЕТНИК Є. М., ГОВОРУХА Т. М., НОСАР В. І.,
ВЕСЕЛЬСЬКИЙ С. П., МАКАРЧУК М. Ю.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: reshetnik@mail.ru*

L-Аргінін і продукти його метаболізму можуть виступати регуляторами обміну речовин, справляти фармакологічну і навіть токсичну дію на різних рівнях організму. Провести межі між усіма функціональними властивостями L-аргініну часом буває доволі важко: спрямованість і величина ефектів залежить від дози, що застосовується для дослідження або корекції патологічних станів. Дослідження біологічного ефекту L-аргініну проведені, загалом, за досить високих концентрацій, коли організм перебуває у станах стресу, патології. Близькі до фізіологічних дози в цьому аспекті є маловивченими. Тому метою нашої роботи стало дослідження впливу L-аргініну в концентраціях 10 і 20 мг/л на процеси тканинного дихання *in vitro*. Швидкість споживання кисню в гомогенатах печінки щурів визначали полярографічним методом на LP-60 із використанням відкритого платинового електрода, каліброваного за O₂.

Полярографічні дослідження (*in vitro*) показали, що L-аргінін (10 мг/л) вірогідно підвищує швидкість ендogenous дихання гомогенату на 23% ($P < 0,02$). Майже так само діє амінокислота за вдвічі більшої концентрації (21%, $P < 0,01$). Субстратне й фосфорилуюче окислення (у разі використання таких субстратів, як сукцинат (FAD-залежний) і малат (NAD-залежний) за концентрацій 1 та 2 мМ/л відповідно) не підпадає під вплив L-Arg за обох концентрацій. Проте амінокислота за першої концентрації на 28% ($P < 0,05$) стимулює контрольоване дихання, якщо як субстрат використовується сукцинат. Останнє вказує, відповідно, на послаблення дихального контролю за Чансом. Ефективність окисного фосфорилування за використання малату в тій самій концентрації амінокислоти істотно зменшується (на 57%, $P < 0,05$), а у разі застосування сукцинату не змінюється.

Таким чином, ефективнішою щодо процесів мітохондріального дихання виявляється менша концентрація амінокислоти – 10 мг/л. При цьому L-аргінін виявляє помітний (на 28%, $P < 0,01$) ефект роз'єднання дихання й фосфорилування (субстрат – сукцинат), що узгоджується з результатами, які отримали Кургалюк (2002) та Смоляр (2000). За використання малату як субстрату ефективність утилізації O₂ значно знижується.

Отже, L-аргінін у застосованих нами концентраціях, особливо в меншій концентрації (10 мг/л), виявляється ефективним регулятором процесів мітохондріального окислення, зокрема у тканині печінки.

ШЛЯХ ТРАНССУЛЬФУВАННЯ ГОМОЦИСТЕЇНУ ТА БІОСИНТЕЗ ТАУРИНУ У ПЛАЦЕНТІ ЛЮДИНИ

^{1,2}РОМАНЕЦЬ К. Л., ²МАРЦЕНЮК О. П., ²ОБОЛЕНСЬКА М. Ю.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;

e-mail: kate_romanets@yahoo.com

Шлях транссульфування є важливим для елімінації підвищеного рівня гомоцистеїну. Тканини, в яких відсутній шлях транссульфування або знижена активність ензимів, особливо чутливі до гіпергомоцистеїнемії. Цистатіонін-β-синтаза (CBS) та цистатіонін-γ-ліаза (цистатіоназа, CSE) є ензимами шляху транссульфування гомоцистеїну. CSE каталізує розщеплення цистатіоніну на цистеїн і α-кетобутарат, що є фінальним етапом шляху транссульфування гомоцистеїну. Цистеїн використовується для синтезу таурину. За окислення цистеїну ензимом цистеїндіоксигеназою (CDO) утворюється цистеїнсульфінат, що декарбоксілюється за участю цистеїнсульфат-декарбоксілази (CSAD) до гіпотаурину. На разі невідомо, чи експресуються ензими CBS, CSE, CDO та CSAD у плаценті людини та чи активний шлях транссульфування гомоцистеїну і біосинтезу таурину. Тому метою дослідження було встановити експресію ензимів CBS, CSE, CDO та CSAD у плаценті людини.

Експресію CBS, CSE, CDO, CSAD на рівні мРНК визначали методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) на рівні протеїну – Вестерн-блот аналізом. Об'єктом дослідження була плацента людини першого (8–10 тижнів гестації) та третього (38–40 тижнів гестації) триместрів вагітності.

Вперше методом ЗТ-ПЛР виявлено специфічну мРНК CBS, CSE, CDO та CSAD у плаценті першого та третього триместрів вагітності людини. Експресію повнорозмірного протеїну CBS (63 кДа) підтверджено Вестерн-блот аналізом із використанням специфічних антитіл. Експресія CBS, CSE, CDO та CSAD вказує на функціонування у плаценті людини шляхів транссульфування, важливого для елімінації гомоцистеїну, і біосинтезу таурину.

Виявлено експресію CBS, CSE, CDO та CSAD на рівні мРНК і CBS на рівні протеїну у плаценті першого і третього триместрів вагітності людини.

**ВЛИЯНИЕ ДЕТЕРГЕНТОВ
НА БИОТРАНСФОРМАЦИЮ ПРОГЕСТЕРОНА
ТРАНСГЕННЫМИ ДРОЖЖАМИ *Yarrowia lipolytica*,
ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ ЦИТОХРОМ P-450c17**

РУДАЯ Е. В., ФАЛЕТРОВ Я. В., ФРОЛОВА Н. С., СТРЕХА И. С.

*Учреждение Белорусского государственного университета
«Научно-исследовательский институт
физико-химических проблем», Минск;
e-mail: biopharm@bsu.by, lusova@mail.ru*

Цитохром P-450c17 (CYP17) млекопитающих эффективно катализирует 17 α -гидроксилирование прогестерона – важную реакцию для получения глюкокортикоидных гормонов. Трансгенные дрожжи, экспрессирующие цитохром P-450c17 совместно с рядом других энзимов стероидогенеза млекопитающих, интересны как потенциальный промышленный биокатализатор нового типа для микробиологического получения таких стероидов. Использование больших концентраций липофильных стероидных субстратов, являющихся желательным для условий производства, лимитируются рядом факторов. Один из них – незначительная растворимость липофильных стероидов в водных средах (культуральной жидкости), который может быть преодолен с помощью детергентов. Целью работы было исследовать влияние ряда детергентов (Твин 80, Эмульген 913, Тритон-X100, цетилтриметиламмония бромид (СТАВ), холат Na, додецилсульфат Na (SDS)) и полиэтиленгликоля 600 (ПЭГ) на 17 α -гидроксилирование прогестерона (начальная концентрация 125 мкМ) клетками трансгенных дрожжей *Yarrowia lipolytica* DE5-54.1, экспрессирующие P-450c17 и P-450scs под контролем промотора изоцитрат-лиазы (индуктор – этанол). Концентрация детергенов – 0,2%. Клетки выращивались на среде YNB с глицерином и этанолом в качестве источников углерода до оптической плотности при 600 нм 8,5 (2×10^8 клеток/мл). Степень образования 17 α -гидроксипрогестерона в случае добавки твина 80, эмульгена 913, тритона-X100, СТАВ, холата Na, SDS и ПЭГ за 30 ч составляли 47, 44, 30, 0, 40, 0 и 34% соответственно (в контроле – 23%). В случае со СТАВ и SDS биотрансформация не наблюдалась, что свидетельствует об их токсичности. Остальные детергенты стимулируют 17 α -гидроксилирование прогестерона данными дрожжами.

**ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ПЛАЗМАТИЧНОЇ
МЕМБРАНИ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА
ЩУРІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
УТВОРЕННЯ ВИРАЗКИ**

*РУДЕНКО Я. О., КОВАЛЬОВА В. А., ВИШНЕВСЬКА А. Г.,
МОРГАЄНКО О. О., ОСТАПЧЕНКО Л. І.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: iaroslav.rudenko@gmail.com*

Плазматичні мембрани (ПМ) клітин слизової оболонки шлунка (СОШ) є однією із найважливіших ланок у розвитку виразки. Пошкодження даної органели неминуче порушує нормальне функціонування клітин, змінює проходження сигнальних каскадів, порушує роботу рецепторів та мембранозв'язаних ензимів. Різні ульцерогенні фактори чинять прямий та опосередкований вплив на клітинні мембрани. Співвідношення ліпідів у ПМ є дуже важливим для підтримання сталості властивостей мембран. Цей показник впливає на в'язкість мембрани, від якої залежить лабільність та функціонування протеїнової складової мембран і, відповідно, клітини в цілому.

У дослідах використовували білих нелінійних щурів з масою тіла близько 200 г. Стресову модель виразки шлунка створювали методом «соціального іммобілізаційного стресу» в модифікації Гройсмана та Каревіної. Ураження СОШ за методом Окабе спричинювали етанолом. Клітини СОШ одержували за допомогою пронази, а фракцію плазматичних мембран – центрифугуванням у градієнті сахарози. Метиллові ефіри жирних кислот одержували додаванням до них метилового розчину гідроксиду калію і аналізували методом газової хроматографії.

Внаслідок проведеної роботи виявлено зміни співвідношення вільних жирних кислот у плазматичних мембранах клітин за обох досліджуваних моделях виразки. Відмічено зростання вмісту пальмітинової (C_{16}) та стеаринової (C_{18}) кислот як в умовах стресової (219 і 118%), так і в умовах етанолової (158 і 45%) моделей виразки. Оскільки досліджені жирні кислоти є основними компонентами мембранних фосфоліпідів, одержані дані можуть бути ознакою посилення гідролізу фосфоліпідів мембрани. Цей процес може відбуватися внаслідок посилення пероксидного окислення ліпідів або зростання активності фосфоліпази класів A_1 , A_2 та B . Вміст міристинової кислоти (C_{14}) збільшується на 64% лише за етанолової моделі. Під впливом стресу відбувається більш ніж десятикратне збільшення вмісту олеїнової кислоти ($C_{18:1}$). Вміст бегенової кислоти (C_{22}) зменшується за обох досліджуваних моделей – на 67% в умовах стресу та на 72% в умовах етанолової моделі. Вміст ейкозанової кислоти (C_{20}) зменшується на 59% лише в умовах стресу.

Отже, було виявлено різнонаправлені зміни жирнокислотного складу ПМ СОШ щурів у разі застосування як етанолової, так і стресової моделей експериментальних виразок. Виявлені порушення можуть розвиватися внаслідок адаптації клітин до дії етанолу або бути результатом пошкодження ліпідного обміну клітин в умовах активації вільнорадикального окислення.

ТРАНСФОРМАЦІЯ ГЛІКО- І ФОСФОЛІПІДІВ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ МЕМБРАН РОСЛИН В УМОВАХ ДЕФІЦИТУ ФОСФОРУ

СВЕТЛОВА Н. Б., БІДА О. В., ТАРАН Н. Ю., ГАНЧУРІН В. В.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: svyetlova@rambler.ru*

Нестача фосфатів є одним із факторів навколишнього середовища, який спричинює зміну у функціонуванні багатьох метаболічних процесів, спрямованих на мобілізацію та зменшення використання фосфору в рослинному організмі. Однією із ключових складових регуляторної системи метаболізму фосфору є трансформації ліпідних компонентів, зокрема фосфо- і гліколіпідів, вміст яких є чутливим показником фосфатного голодування рослин. Оцінюванням фізіологічного стану рослин сортів озимої пшениці за біохімічними маркерами ліпідного комплексу в умовах дефіциту фосфору встановлено, що його нестача ініціює як біосинтез ліпідів, так і деградацію їх у фотосинтетичних мембранах. Результати аналізу трансформацій гліко- і фосфоліпідів виявили здатність рослин пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) реагувати на дефіцит фосфатів шляхом селективного накопичення сульфохіновозилдіацилгліцеролу (СХДГ) і дигалактозилдіацилгліцеролу (ДГДГ). З огляду на те, що в клітинах рослин, біосинтез СХДГ відбувається виключно в мембранах пластид, а фосфатидилгліцерол (ФГ) є єдиним фосфоліпідом у мембранах тилакоїдів, зменшення вмісту останнього компенсується стабільністю вмісту іншого аніонного ліпиду – СХДГ для збереження аніонного характеру мембранних ліпідів та підтримання оптимального рівня перебігу фотосинтетичних процесів у хлоропластах. Наявність компенсаторних механізмів заміщення аніонного ФГ нефосфоровмісним аніонним СХДГ у пластидних мембранах, дозволяють адаптуватися рослинам пшениці до умов обмеження фосфатів. Такі спрямовані адаптивні структурні перебудови в мембранах підтримують рівновагу в конформаційних перебудовах макромолекул, задіяні в реалізації адаптивного потенціалу рослин і тому є важливими біохімічними показниками для характеристики ендогенних індукторів стійкості в умовах дефіциту фосфатів.

Досліджені трансформаційні перебудови ліпідних компонентів дозволили нам охарактеризувати сорти пшениці озимої за рівнем стійкості до фосфорного дефіциту. З'ясовані відмінності у складі гліко- і фосфоліпідів на ранніх етапах онтогенезу рослин сорту Київська остиста свідчать про екологічно виправдану доцільність його вирощування на ґрунтах із низьким вмістом рухомих форм фосфору.

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ
МОНОХРОМАТИЧНОГО СИНЬОГО СВІТЛА
НА АКТИВНІСТЬ Na^+ , K^+ -АТФ-ази МЕМБРАН ЗАРОДКІВ
В'ЮНА В УМОВАХ *IN VITRO* ТА *IN VIVO***

*СЕМОЧКО О. М., БУРА М. В., МАНДЗИНЕЦЬ С. М.,
ФЕРЕНСОВИЧ Я. П., БІЛИЙ О. І., САНАГУРСЬКИЙ Д. І.*

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів;
e-mail: olena-yu@ukr.net*

З появою нових оптичних джерел світла, простих у користуванні, широкого діапазону спектра, збільшились і масштаби застосування терапевтичних ефектів світла. Зокрема, синє світло набуло широкого застосування у багатьох галузях медицини. На практиці світло синього спектра, отримане з допомогою світлодіодів, використовується у терапії новонароджених із захворюванням жовтухи. З його допомогою успішно запобігають появі радіодерматитів під час лікування раку молочної залози. Відомо, що синє світло впливає на використання кисню цитохром с-оксидазою, та зміну активності цього ензиму, індукує збільшення вільних радикалів у клітинах епітелію, може призводити до окисного стресу, здатне спричинювати пошкодження мітохондріальної ДНК. Важливо дослідити як впливає світло синього спектра на ембріональний розвиток та як при цьому змінюється активність життєво важливих ензимів та систем.

Метою нашої роботи було вивчення впливу синього світла (λ -460 нм), отриманого за допомогою світлодіода, на ферментативну активність Na , K -помпи зародків прісноводної риби в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період раннього ембріогенезу в умовах *in vitro* та *in vivo*. Об'єктом досліджень були зародки в'юна. Яйцеклітини одержували і запліднювали за А. А. Нейфахом. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції. Сім'яники отримували після декапітації та розтину черевної порожнини самців.

Відомо, що активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази, зародків в'юна за нормальних умов зростає протягом ранніх етапів ембріогенезу (з першого по восьмий поділ бластомерів), а на стадії 10 поділу можна спостерігати незначне зниження. Встановлено, що після опромінення зигот синім світлом *in vivo* (після запліднення) протягом 5 хвилин активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази різко і вірогідно ($P > 0,999$) знижується на стадіях 2-, 16-, 64-ї бластомерів (на 56,4, 47,7, 35,7% відповідно) та 8 поділу (на 31,1%) порівняно з контролем. На стадії 10-го поділу ензимна активність відновлюється, значно перевищуючи значення цього показника в контролі на 78,74%. Порівняно з одержаними результатами опромінення зародків *in vitro* (на кожній стадії) спричинює суттєве рівномірне зниження активності Na , K -помпи ($P > 0,999$) на стадіях 2- та 16-ї бластомерів (55,4 та 51,5% відповідно), тоді як на пізніших стадіях (64 бластомерів, 8 та 10 поділів) активність ензиму знижується на 27,3–2,9% на всіх етапах розвитку, зберігаючи характер кривої зміни активності ензиму відносно контролю. Отже, відмічено тимчасовий інгібуючий вплив світла синього діапазону видимого спектра на перших стадіях розвитку зародків та адаптацію їх до дії цього випромінювання у процесі ембріогенезу в умовах опромінення зигот після запліднення.

**ДІЯ ВІТАМІННОГО ПРЕПАРАТУ ТА БІОМАСИ
РІЗНИХ ШТАМІВ *Spirulina platensis*
НА СПІВВІДНОШЕННЯ ВІЛЬНИХ НІКОТИНАМІДНИХ
КОЕНЗИМІВ В ОРГАНАХ ЩУРІВ**

*СТАНЄВ О. І., ЗАПОРОЖЧЕНКО О. В., КАРПОВ Л. М.,
КОКОШКІНА О. А.*

*Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Україна;
e-mail: sana33@ukr.net*

Метою досліджень було вивчення можливості застосування вітамінного препарату та різних штамів *Spirulina platensis* як харчової добавки для корекції співвідношення вільних нефосфорильованих та фосфорильованих окислених нікотинамідних коензимів до відновлених у тканинах щурів.

Білим щурам — самцям лінії Вістар, масою 90–150 г, додавали у корм біомасу спіруліни в кількості 50 мг на щура (близько 1% від ваги корму). Використовували штами *S. platensis*: дикий тип, 198В, 27G. Вітамінний препарат додавали із розрахунку на одного щура: ацетил-карнітин — 3 мг, ліпоєва кислота — 1,2 мг, пікамілон — 0,6 мг, кальція пантотенат — 0,12 мг, піридоксин — 0,12 мг. Щурів у дослід брали через 4 тижні після харчування спіруліною та полівітамінами. Тварин було поділено на групи: інтактні — 1; щури, що одержували полівітаміни — 2; *S. platensis* дикий тип — 3; 198В — 4; 27G — 5; 198В + полівітаміни — 6. Контролем служили інтактні тварини. В органах щурів визначали вміст лактату, малату і пірувату. Співвідношення нікотинамідних коензимів обчислювали математично.

Встановлено, що співвідношення нікотинамідних коензимів за дії штамів спіруліни та полівітамінів змінюється в досліджуваних органах щурів різною мірою. Співвідношення вільних нікотинамідних коензимів NAD/NADH має тенденцію до підвищення у групах щурів, яким давали вітамінний препарат (у печінці), штам дикого типу *S. platensis* (у печінці, нирках, мозку), штам 198В *S. platensis* (у мозку, серці), штам 27G *S. platensis* (у печінці, мозку, серці) та сумісно — штам 198 В з вітамінним препаратом (у нирках) відносно групи контрольних тварин. Це підвищення свідчить про активацію аеробних процесів в обміні глюкози та інгібування глюконеогенезу, ліпогенезу.

Співвідношення вільних фосфорильованих нікотинамідних коензимів NADP/NADPH має тенденцію до зниження в усіх досліджуваних групах та тканинах відносно контролю, що пов'язано зі зменшенням інтенсивності ліпогенезу.

Одержані дані свідчать про можливість застосування вітамінного препарату та різних штамів *Spirulina platensis* як харчової добавки для корекції окислювально-відновлювальних процесів у тканинах щурів.

**ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ
ТА АПОПТОЗ МОНОНУКЛЕАРІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ
КРОВІ ЛЮДИНИ ЗА СУКУПНОЇ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ
РАДІАЦІЇ ТА L-АРГІНІНУ**

*СТАРАНКО У. В., ЛЮТА М. Я., ПЕРЕТЯТКО Ю. В.,
ДАЦЮК Л. О., СИБІРНА Н. О.*

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: starankoulyana@mail.ua*

За дії іонізуючої радіації NO може виступати проапоптичним або антиапоптичним чинником, впливаючи на окремі етапи регуляції проліферативних і апоптичних процесів.

Метою роботи було дослідити вплив системи L-аргінін:NO на проліферативну активність та розвиток апоптозу мононуклеарних лейкоцитів периферичної крові людини у нормі та за дії одноразового рентгенівського опромінення *in vitro* в дозі 0,3 або 2 Гр та преінкубації із субстратом (L-аргініном) або інгібітором (L-NAME, NG-nitro-L-arginine methyl ester) ензиму NO-синтази. Об'єктом досліджень були мононуклеарні лейкоцити периферичної крові 8 здорових донорів. Встановлено, що як і в контрольному досліді, так і за дії іонізуючої радіації в дозі 0,3 Гр преінкубація досліджуваних клітин з L-аргініном спричинює активацію проліферативних процесів. Внесок NO у стимуляцію бластоутворення за даних умов становив 8,6% порівняно з цим показником для клітин, які опромінювались без преінкубації. Виявлено збільшення кількості проліферуючих лімфоцитів в умовах преінкубації з L-аргініном на 8,3% за дози опромінення 2 Гр. Додаткове підтвердження цитопротекторної дії NO у запропонованих експериментальних умовах одержано під час аналізу життєздатності клітин у культурі. За сукупної дії радіації в дозі 2 Гр та преінкубації клітин з L-аргініном виявлено вірогідне зменшення кількості мертвих клітин на 18% порівняно з опроміненими клітинами та на 16% за дії цього чинника з попередньою преінкубацією з L-NAME. Показано, що рентгенівське опромінення у дозі 0,3 Гр зумовлює зростання апоптичного індексу досліджуваних клітин в 1,4 раза, тоді як за дози 2,0 Гр – у 2,1 раза порівняно з контролем, а відсоток нежиттєздатних клітин зростає лише за умов опромінення у дозі 2,0 Гр. Через 24 год після опромінення у дозі 2,0 Гр преінкубація з L-аргініном призводить до зниження апоптичного індексу в 1,7 раза відносно ефекту радіаційного впливу та зростання кількості нежиттєздатних клітин.

**БЛАСТТРАНСФОРМАЦІЯ ЛІМФОЦИТІВ ЛЮДЕЙ
ЗА ДІЇ МАЛИХ ДОЗ РАДІАЦІЇ У СИСТЕМІ *IN VITRO***

СТАРИКОВИЧ Л. С., ПРИЙМА С. Б., ДАЦЮК Л. О.,
СТАРАНКО У. В., ДУДОК К. П., СИБІРНА Н. О.

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: ludmila-star@yandex.ru*

Останніми роками вплив антропогенного фактора на довкілля значною мірою посилюється. Це відбувається внаслідок рентгенівського та γ -випромінювання, випромінювання радіоактивних елементів, а також дії інших факторів фізичної та хімічної природи. Ступінь радіоуразнення лімфоцитів найважливіших імунотетентних клітин організму в цілому є високою. Ранні зміни рецепторної функції мембран лімфоцитів є сталою ознакою радіаційного ураження. Одним з тестів, який свідчить про здатність лімфоцитів до перетворення у лімфобласти, що продукують імуноглобуліни, є реакція бластної трансформації. Здатність до бласттрансформації відображає функціональну активність Т- та В-лімфоцитів, і, відповідно, реакція бластної трансформації є надійним тестом визначення імунної реактивності цих клітин.

Суспензію лімфоцитів периферичної крові, одержану фракціонуванням у градієнті густини Gradisol G, опромінювали на апараті РУМ-17 за потужності дози $0,5 \text{ Гр} \cdot \text{хв}^{-1}$; сумарна доза становила 0,3 та 2 Гр. Бласттрансформацію контрольних та опромінених лімфоцитів проводили у культуральному середовищі RPMI 1640.

Дослідження впливу іонізуючого випромінювання у досліджених дозах (на процес бластної трансформації) показало, що зниження числа імунокомпетентних клітин: бластів, пробластів та лімфоцитів є загальною тенденцією. Відмічено найсуттєвіше зниження бластів та пробластів за сумарної дози 2 Гр. Отже, результати можуть свідчити про значні ураження, яких зазнають клітини імунної системи навіть за таких доз радіації, які вважаються малими. Оскільки найвірогіднішим за даних умов вважають ураження мембранних структур, то зазначені зміни можуть бути пов'язані або з перерозподілом в продукції інтерлейкінів або із змінами рецепторів, що їх сприймають.

**ВПЛИВ СУМІШІ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА МЕТАБОЛІЧНІ
ПРОЦЕСИ В РУБЦІ ТЕЛЯТ В УМОВАХ *IN VITRO***

СТЕФАНИШИН О. М., СЛИПАНЮК О. В., ЛУЧКА І. В.,
САВ'ЯК З. І.

*Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: oliastef@ukr.net.*

З'ясування механізмів дії суміші мінеральних елементів на життєдіяльність мікроорганізмів рубця та процеси травлення і різні ланки обміну речовин є важливою передумовою і теоретичною основою для підвищення використання кормів і уточнення норм їхнього споживання.

Внаслідок досліджень, які проводилися в умовах *in vitro* встановлено, що додавання наступної суміші мікроелементів у концентраціях Cr (1,0 мМ) + Mo (6,0 мМ) + Se (1,0 мМ) + Ni (0,5 мМ) до інкубаційного середовища із вмістом рубця телят позитивно впливає на ріст клітин мікроорганізмів рубця як 3-місячного, так і 6-місячного віку тварин. Про це свідчить зростання відповідно на 27,3 і 44,9% мікробної маси у досліджувані вікові періоди. Очевидно, суміш мікроелементів у цій концентрації стимулює ріст мікробних клітин. Крім того, спостерігається вірогідне збільшення концентрації коротколанцюгових жирних кислот під час інкубації *in vitro* суміші мікроелементів як у дослідженнях 3-місячних ($P < 0,02$), так і 6-місячних ($P < 0,01$) телят, що добре корелює із зростанням целюлозолітичної активності мікроорганізмів рубця (72,3 і 83,6% відповідно). Очевидно, це обумовлюється в меншій мірі наростанням кількості целюлозолітичних мікроорганізмів і в більшій мірі підвищенням синтезу їхніх целюлоз. Комплексний вплив суміші мікроелементів активніше впливає на ріст популяції мікроорганізмів, збільшення концентрації коротколанцюгових жирних кислот, підвищення целюлозолітичної активності, ніж інкубація з кожним елементом окремо. Це може бути зумовлено посиленням взаємодії між окремими мікроелементами і посиленням їхнього синергічного впливу на перебіг обмінних процесів у середовищі рубця жуйних тварин.

ЛІПІД-ПІГМЕНТНІ ТРАНСФОРМАЦІЇ У ФОТОСИНТЕТИЧНОМУ АПАРАТІ РОСЛИН *Deschampsia caespitosa* В УМОВАХ ЖОРСТКОГО УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

СТОРОЖЕНКО В. О., СВЕТЛОВА Н. Б., ТАРАН Н. Ю.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ;
e-mail: vstoro@mail.ru*

Одним із шляхів збереження видового біорізноманіття є пошук стратегій адаптації дикорослих видів до впливу стресорів, перспективність якого пов'язана з відсутністю селекційних та біотехнологічних втручань у їхнє розмноження, а тому й можливої набутої ними за рахунок цього резистентності до дії стресу.

Deschampsia caespitosa (L.) P. Beauv. (щучник дернистий) – типова дикоросла злакова рослина з великою екологічною пластичністю та широким ареалом вирощування за різних умов світлового режиму. Тому ми використовували її як модель для дослідження впливу жорсткого ультрафіолетового випромінювання (УФ-В) на вміст головних структурних компонентів фотосинтетичних мембран.

УФ-В індукувало істотне зниження вмісту хлорофілів *a* та *b*, хоча співвідношення їх залишалось незмінним. На фоні зниження вмісту пігментів спостерігали зміни співвідношень головних гліколіпідів фотосинтетичних мембран – моногалактозилдіацилгліцеролу (МГДГ), дигалактозилдіацилгліцеролу (ДГДГ) та сульфохіновозилдіацилгліцеролу (СХДГ).

УФ-В не спричинювало змін вмісту МГДГ у фотосинтетичних мембранах, хоча індукувало істотне зниження вмісту ДГДГ. Збільшення співвідношення МГДГ/ДГДГ пов'язано з підвищенням вмісту мембранних протеїнів і, у свою чергу, з підтриманням рівня нативності мембран у несприятливих умовах.

Водночас, вміст СХДГ був сталим. Як відомо, цей гліколіпід забезпечує високий функціональний стан реакційного центру ФСП, що на фоні зниження вмісту ДГДГ може виступати як захисний механізм, направлений на зменшення деградації цього реакційного центру та, в кінцевому рахунку, на підтримання умов для стабілізації фотосинтетичної функції рослин за дії стресів.

На нашу думку, ліпід-пігментні трансформації є одним із проявів адаптивної стратегії рослин *D. caespitosa* в умовах впливу УФ-В. Одержані результати є важливими для створення прогнозів стану рослинного покриву за дії абіотичних та біотичних факторів довкілля та вивченні ролі фітоценозів у регулюванні вуглекислотного балансу атмосфери.

ВПЛИВ СВИНЦЮ, КАДМІЮ ТА ХРОМУ (VI) НА МЕТАБОЛІЧНУ АКТИВНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ РУБЦЯ ТЕЛЯТ ЗА УМОВ *IN VITRO*

ТАЛОХА Н. І., КУРТЯК Б. М., ГЕРАСИМІВ М. Г., САЛИГА Ю. Т.

*Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: inenbiol@mail.lviv.ua*

Антропогенний вплив на довкілля призводить до зростання кількості важких металів у всіх компонентах екосистем. Висока токсичність важких металів, їхня здатність накопичуватися у тваринному організмі та негативно впливати на обмін речовин навіть у порівняно низьких концентраціях потребують вивчення біохімічних механізмів їхньої дії залежно від віку і виду тварин, типу та дози токсикантів та їхніх поєднань. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідження *in vitro* одночасної дії суміші свинцю, кадмію та хрому (VI) у максимально толерантних дозах на життєдіяльність змішаної популяції мікроорганізмів рубця великої рогатої худоби.

У роботі досліджували зразки вмісту рубця, одержані від трьох фістульних бичків-аналогів дворічного віку української чорно-рябої породи з накладеними на рубець фістулами. Тварин утримували за класичною схемою у дослідному господарстві «Чишки» Інституту біології тварин НААНУ. Фільтрат вмісту рубця вносили в інкубаційні посудини із сумішшю ацетату свинцю (5,0 мг/кг), сірчаноокислого кадмію (0,4 мг/кг) і біхромату калію (0,5 мг/кг). Контролем були зразки рідкої фракції вмісту рубця, в які не додавали досліджувані солі. Посудини закорковували, продували вуглекислим газом та інкубували протягом 24 год при температурі 38 °С. Після цього відбирали зразки інкубату для дослідження рН, кількості мікробної маси, концентрації летких жирних кислот, аміаку, протеолітичної, амілолітичної та целюлозолітичної активності.

Проведені дослідження показали, що після 24-годинної інкубації вмісту рубця з доданими солями свинцю, кадмію та хрому (VI), порівняно до контролю, у ньому вірогідно знижується рН, кількість аміаку (на 26,12%), целюлозолітична активність (на 9,79%), амілолітична активність (на 19,23%), протеолітична активність (на 24,16%) та кількість мікробної маси (на 13,26%). Отже, під впливом суміші важких металів – свинцю, кадмію та хрому (VI) – за додавання їх до вмісту рубця

у максимально толерантних дозах у мікроорганізмів рубця зменшується здатність до розщеплення поживних речовин корму, що призводить до зниження інтенсивності процесів ферментації та росту мікроорганізмів, який залежить насамперед від енергії, що звільняється у процесі ферментації вуглеводів.

**ПРОЛІФЕРАТИВНА АКТИВНІСТЬ
ЛІМФОЦИТІВ МИШЕЙ, ІМУНІЗОВАНИХ
ПРОТИПУХЛИННИМИ ВАКЦИНАМИ НА ОСНОВІ
ЦИТОТОКСИЧНИХ ЛЕКТИНІВ**

ТАНАСІЄНКО О. А.

*Інститут експериментальної патології, онкології та
радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: iris@onconet.kiev.ua*

Із культуральної рідини продуктивного бактеріального штаму *Bacillus subtilis* В-7025 нами були виділені цитотоксичні по відношенню до пухлинних клітин лектини, які зв'язуючись з останніми, не тільки позбавляли їх життєздатності, але й посилювали їхню імуногенність завдяки гетерогенізації мембран. На їхній основі були сконструйовані протипухлинні аутовакцини, ефективність яких підтверджено в експерименті та в клініці.

Одним із важливих показників для оцінки відповіді організму на введення імуногену є проліферативна активність клітин імунокомпетентних органів. Метою роботи було вивчення ступеню активності лімфоїдних органів тварин, імунізованих протипухлинною вакциною на основі цитотоксичного лектину *B. subtilis* В-7025, за включенням міченого тимідину в лімфоцити селезінки та тимусу мишей в різні терміни після імунізації.

Показано, що інтенсивність синтезу ДНК у лімфоцитах селезінки підвищується після кожної імунізації, а на 28-у добу після початку імунізації у 2 рази перевищує рівень питомого включення ізотопу у клітини селезінки інтактних мишей. В той самий час у лімфоцитах тимуса інтенсивність синтезу ДНК практично не відрізняється від контролю протягом всього терміну спостереження. Показано взаємозв'язок і пряма кореляція між проліферативною активністю лімфоцитів селезінки та протипухлинною резистентністю тварин.

РЕГУЛЯЦІЯ НЕЙРОСЕКРЕТОРНОГО ПРОЦЕСУ НИЗЬКИМИ ФІЗІОЛОГІЧНИМИ КОНЦЕНТРАЦІЯМИ ОКСИДУ АЗОТУ

ТАРАСЕНКО А. С., КРУПКО О. О., ГИММЕЛЬРЕЙХ Н. Г.

*Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: tas@biochem.kiev.ua*

Стимуляція нейросекреторного процесу оксидом азоту (NO) може відбуватися Ca²⁺-незалежним шляхом, що вказує на залучення іншого, відмінного від екзоцитозу, шляху вивільнення нейротрансмітерів. Раніше ми показали, що низькі, фізіологічні концентрації NO спричинюють обернену дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул і деполяризацію мітохондріальної мембрани нервових терміналей мозку щурів. Мета цього дослідження – з'ясувати, чи зумовлює розвиток цих процесів стимуляцію вивільнення гальмівного нейротрансмітера ГАМК під дією NO.

Дослідження проводили на синаптосомах головного мозку щурів із використанням ГАМК, міченої тритієм ([³H]ГАМК). Як донори NO було використано діетиламін NONO-ат (DEA NONO-ate), який дисоціює до вільного аміну та NO, і S-нітрузоамінопеніцилін (SNAP), який при взаємодії з тіолами, зокрема з дітіотреїтолом (ДТТ), утворює високоактивні сполуки. Експерименти показали, що за додавання донорів NO спостерігається нетипова кінетика вивільнення [³H]ГАМК у часі: спочатку відбувається повільне вивільнення нейротрансмітера із синапсом, після чого здійснюється його зворотне захоплення майже до початкового рівня. Максимальний вихід [³H]ГАМК реєструється на 5-й і 10-й хв за використанням DEA NONO-ate (0,1 мМ) і SNAP + ДТТ (0,5 : 1 мМ) відповідно. Аналізуючи шляхи вивільнення [³H]ГАМК, а саме, чи сталося воно внаслідок екзоцитозу або за рахунок реверсної роботи трансмембранних переносників ГАМК, ми використали 4-амінопіридин (індуктор екзоцитозу) і ніпекотинову кислоту, яку переносник обмінює на цитозольну ГАМК. Результати експерименту показали, що NO запускає каскад послідовних внутрішньоклітинних подій: повільне вивільнення ГАМК із синаптичних везикул у цитозоль, стимуляцію роботи ГАМК переносників у реверсному режимі, що призводить до вивільнення нейротрансмітера із синапсом, зворотне захоплення ГАМК синаптосомами і наступну реаккумуляцію нейротрансмітера в синаптичних везикулах.

Одержані дані дозволяють заключити, що стан везикулярного протонного градієнта визначає рівень ГАМК у синаптичних везикулах. NO-індукована дисипація градієнта спряжена з вивільненням нейротрансмітера з синаптичних везикул у цитозоль, а відновлення градієнта призводить до реаккумуляції ГАМК у везикулах.

**THE SER/THR PROTEIN KINASE ACTIVITIES
IN RAT PARIETAL CELLS UNDER CHRONIC
ATROPHIC GASTRITIS DEVELOPMENT**

TYMOSHENKO M. O., GAYDA L. M., OSTAPCHENKO L. I.

*Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: maria.bulavka@gmail.com*

Chronic atrophic gastritis (CAG) has been associated with an increased risk of gastric cancer. Thus, investigation of mechanisms of gastric atrophic changes development remains problems of high importance. Disorders of the balance between apoptosis and cell proliferation in mucosa are underlined in atrophy changes.

Since the serine/threonine protein kinases play a commanding role in many signal pathways, the phosphorylation of chloric channel proteins by cAMP-dependent protein kinase A (PKA) results in increasing of its conductivity. Besides PKA Ca²⁺-dependent protein kinase C (PKC) phosphorylates cytoskeleton and membrane proteins thereby implicating in the processes for the regulation of parietal cell HCl secretion.

The aim of the research was to investigate the levels of serine/threonine protein kinases activities in parietal cells of the stomach under CAG development.

Rat model of CAG was performed by intragastric administration of 2% sodium salicylate, 20 mM/L deoxycholate sodium daily for 6 weeks. The parietal cells were isolated on the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th and 6th weeks of model. Cell PKC and PKA activities have been evaluated by incorporation of ³²P from labeled ATP to specific protein substrate.

Histological findings showed a significant decrease of mucous gland thickness in CAG rats than that of the control. The increasing of investigated PK activities was shown during initial four weeks of pathology development. These results suggested important role of Ser/Thr phosphorylation in initiation of gastritis. Such disorders in intracellular signal transduction might result in functional changes, including HCl secretion and proliferation intensification. Besides, these effects served as additional pathogenesis factors of chronic atrophic gastritis development. Protein kinase A and C activities were decreased in a five week were pathology development.

Our findings suggest that serine/threonine protein kinases involved in the processes of gastric atrophy development.

**ВПЛИВ ЕНТЕРОСОРБЕНТІВ НА ВМІСТ
ЖОВЧНИХ КИСЛОТ В ОРГАНІЗМІ НОВОНАРОДЖЕНИХ
ТЕЛЯТ ЗА ГОСТРИХ РОЗЛАДІВ ТРАВЛЕННЯ**

ТОМЧУК В. А.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: olgatup@mail.ru*

Досліджували вплив ентеросорбентів – ентеросгель та полісорб МП – на вміст жовчних кислот жовчі новонароджених телят за гострих розладів травлення.

За допомогою хроматографічного аналізу екстрактів із жовчі та печінки телят ідентифіковано сім фракцій кон'югованих та вільних жовчних кислот.

Найбільший вміст жовчних кислот було виявлено в жовчі контрольних тварин, який в сумі досягає $2659,7 \pm 131,4$ мг%. Вміст окремих фракцій жовчних кислот складає: таурохолевої (ТХК) – $318,8 \pm 18,1$ мг%, таурохенодезоксихолонової + тауродезоксихолової (ТХДХК+ТДХК) – $294,5 \pm 12,3$ мг%, глікохолевої (ГХК) – $959,4 \pm 51,3$ мг%, глікохенодезоксихолової + глікодезоксихолової (ГХДХК + ГДХК) – $893,5 \pm 31,2$ мг%, холевої (ХК) – $103,2 \pm 12,4$ мг%, хенодезоксихолової + літохолевої (ЛХК) – $0,89 \pm 0,07$ мг%.

У жовчі хворих телят було виявлено вірогідні відмінності жовчно-кислотного спектра порівняно зі здоровими тваринами, що характеризується значним зниженням загального вмісту жовчних кислот і окремих їхніх фракцій. Вміст ТХК зменшується до $196,4 \pm 16,1$ мг% і відповідно ТХДХК + ТДХК – $186,5 \pm 22,4$ мг%, ТХК – $357,5 \pm 17,6$ мг%, ТХДХК + ТДХК – $289,4 \pm 9,9$ мг%.

Водночас рівень вільних жовчних кислот значно підвищується і для ХК складає – $175,5 \pm 11,8$ мг%, ХДХК + ДХК – $153,0 \pm 9,3$ мг% і ЛХК – $10,1 \pm 0,93$ мг%. Встановлене підвищення рівня вільних жовчних кислот поряд зі значним зниженням кон'югованих із тауріном та гліцином обумовило істотне вірогідне зменшення коефіцієнта кон'югації порівняно з контрольними величинами. Загальний вміст холатів у цій біологічній рідині зменшується до $1353,5 \pm 88,1$ мг%, що в цілому свідчить про значне зниження біосинтетичної та кон'югуючої функції печінки хворих телят на диспепсію. Порушення у проміжному обміні жовчних кислот в організмі хворих телят можуть впливати на функціональні розлади шлунково-кишкового тракту.

Застосування препаратів полісорбу МП та ентеросгелю для лікування хворих телят сприяє швидкому одужанню їх і може бути частково зумовлено нормалізацією певних ланок жовчно-кислотного обміну в організмі піддослідних тварин.

ВПЛИВ ІОНІВ ЦИНКУ, КАДМІЮ І МІДІ НА ТРАНСПОРТУВАННЯ ПРОТОНІВ В ІЗОЛЬОВАНИХ ХЛОРОПЛАСТАХ ГОРОХУ

*ТОПЧИЙ Н. М., ПОЛИЩУК О. В., ПОДОРВАНОВ В. В.,
СИТНИК С. К.*

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ;
e-mail: membrana@ukr.net*

Фотохімічні реакції фотосистеми II (ФСII) пригнічуються у присутності іонів важких металів (Me^{2+}) як на донорному (на рівні окислення вторинного донора $TyrZ$), так і на акцепторному боці. Фотовідновлення Q_B у фотосинтетичному електрон-транспортному ланцюзі супроводжується поглинанням протонів із зовнішнього середовища, яке у бактеріальних реакційних центрах блокується іонами Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} . Ті ж самі метали пригнічують світлозалежне поглинання протонів в ізольованих хлоропластах, що вказує на інгібування Me^{2+} відновлення і протонування вторинного хінону Q_B . Цей ефект має корелювати зі зростанням вмісту Q_B -невідновлюючих комплексів ФСII, в яких електронний перенос від Q_A до Q_B

блокований. Метою роботи було визначення впливу іонів Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} на кінетику реокислення Q_A і вмісту Q_B -невідновлюючих комплексів ФСП у хлоропластах задля уточнення механізму дії важких металів на транспортування електронів і протонів.

Об'єктом дослідження були ізольовані хлоропласти гороху (*Pisum sativum* L.). Кінетику реокислення Q_A^- після вимкнення світла вивчали за релаксацію флуоресценції, що індукували спалахом у 600 мс (11 000 мкмоль $\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$), що насичує, за частоти збуджуючих спалахів 64 Гц. Кінетичні криві розкладали на три компоненти, визначали їхні відносні амплітуди (A) і часи напівспаду ($t_{1/2}$) за допомогою спеціально написаної програми і вибірково контролювали програмою Origin v.6.1. Кількість Q_B -невідновлюючих центрів ФСП визначали за методикою Томека.

Додавання іонів міді (50 і 200 мкМ) до суспензії хлоропластів призводить до майже двократного прискорення швидкої і проміжної компонент кривої релаксації флуоресценції, тоді як збільшення амплітуди швидкої фази відбувається за рахунок проміжної і повільної. Іони цинку і кадмію (50 і 200 мкМ) спричинюють сповільнення швидкої і середньої компонент, при цьому амплітуда повільної фази збільшується, а проміжної і швидкої – зменшується. Іони Cu^{2+} і Cd^{2+} майже не впливають на вміст Q_B -невідновлюючих комплексів, тоді як у присутності Zn^{2+} ця величина різко зростає. Одержані дані засвідчують, що важкі метали залежно від їх редокс-потенціалу по-різному впливають на транспортування електронів між Q_A і Q_B . Електронегативніші Zn^{2+} ($E^0 = -0,763\text{В}$) і Cd^{2+} ($E^0 = -0,403\text{В}$) інгібують електронний транспорт, а більш електропозитивний Cu^{2+} ($E^0 = +0,153\text{В}$) прискорюють його. Одним із можливих пояснень цього є здатність іонів Cu^{2+} акцептувати електрони безпосередньо від Q_A^- .

ГЕМОКСИГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ СЕРДЦА КРЫС В НОРМЕ И ПРИ РАБДОМИОЛИЗЕ

ФИЛИМОНЕНКО В. П., НИКИТЧЕНКО И. В., КАЛИМАН П. А.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: Pavel.A.Kaliman@univer.kharkov.ua*

Гемоксигеназы (ГО) катализируют ключевую реакцию расщепления гема. Конститутивная ГО-2 регулирует содержание гема в норме. Индуцибельная ГО-1 играет важную роль в адаптации клеток в условиях стресса, в том числе вызванного накоплением гема, сильного прооксиданта. В норме в тканях сердца протеин ГО-1 обнаруживается в следовых количествах, но при оксидативном стрессе экспрессия гена этого изоэнзима значительно усиливается, что сопровождается увеличением активности ГО, которое наблюдается при ряде патологий. Нами также продемонстрирована активация ГО и накопление гема в постмитохондриальной фракции сердца крыс при рабдомиолизе, характеризующимся разрушением скелетных мышц и накоплением гема в крови. Традиционно гемоксигеназам приписывается микросомная локализация. Однако работы последних лет свидетельствуют о наличии ГО и в митохондриях клеток легких и печени.

Цель работы – изучение активности ГО в микросомной и митохондриальной фракциях сердца крыс в норме и при рабдомиолизе, вызванном внутримышечной инъекцией глицерола (1 мл/100 г массы тела). Субклеточные фракции получали методом дифференциального центрифугирования. Активность ГО определяли спектрофотометрически через 24 ч после введения глицерола.

Установлено, что ГО активность обнаруживается в обеих субклеточных фракциях. В митохондриях базальный уровень активности энзима в 2,4 раза меньше, чем в микросомах. Введение глицерола вызывает 2-кратное повышение ГО активности в микросомной фракции и не влияет на активность энзима в митохондриях. Отсутствие изменений активности ГО в митохондриях может свидетельствовать о том, что гем, поступивший из крови, переносится к местам деградации, локализованным в микросомной фракции, но не в митохондриях. Последнее подтверждается данными об отсутствии накопления продуктов свободнорадикального окисления и сохранении сопряжения дыхания и фосфорилирования в митохондриях.

Таким образом, базальная активность ГО обнаружена в микросомах и митохондриях сердца. Увеличение активности ГО в клетках сердца при глицеролиндуцированном рабдомиолизе происходит за счет активации ГО в микросомах, а в митохондриях активность не изменяется.

АЗААНАЛОГ ПОДОФИЛЛОТОКСИНА NMR/19217524 ИНДУЦИРУЕТ КАСПАЗОЗАВИСИМЫЙ АПОПТОЗ КЛЕТОК ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

¹ФИЛЬЧЕНКОВ А., ¹ЗАВЕЛЕВИЧ М., ²СЕМЕНОВ В.,
³СЕМЕНОВА М., ⁴БЛОХИН Д.

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;

²Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;

³Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва;

⁴Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва;
e-mail: apoclub@mail.ru

Недавно нами (Фильченков А.А. и соавт., 2010) было установлено, что новый азааналог подофиллотоксина NMR/19217524, который является ингибитором полимеризации тубулина, обладает выраженной антипролиферативной активностью в отношении клеток лейкоза человека *in vitro*. Известно, что активация каспазной системы во время индукции апоптоза играет важную роль в реализации цитотоксического действия большинства известных противоопухолевых препаратов. Участие этой системы в проявлении цитотоксического действия препарата NMR/19217524, в том числе в отношении клеток, обладающих фенотипом лекарственной устойчивости, практически не исследовано.

В данной работе изучены эффекты препарата NMR/19217524 (синтезирован в ИОХ РАН на основе миристицина из семян петрушки), связанные с активацией каспаз и индукцией апоптоза в перевиваемой линии злокачественных лимфоидных клеток Jurkat и клональной линии Jurkat/A4, обладающей множественной ле-

картвенной резистентностью. В качестве стандартного индуктора апоптотической гибели клеток использовали препарат подофиллотоксин (Aldrich, США). Уровень апоптоза определяли в цитопрепаратах, окрашенных по Романовскому–Гимза, и с помощью проточной цитометрии. Активную форму каспазы-3 и расщепленный фрагмент поли(ADP-рибозо)полимеразы (PARP) выявляли, используя соответствующие ФИТЦ-конъюгированные моноклональные антитела (Becton Dickinson Biosciences, США).

Показано, что NMR/19217524 дозозависимо вызывает гибель клеток Jurkat. Препарат обладает значительной токсичностью для клеток Jurkat в концентрациях от 50 нМ, а в дозе 500 нМ вызывает гибель около 60% клеток этой линии через 48 ч, индуцируя при этом апоптоз более чем в 50% клеточной популяции. Показатели токсичности и индукции апоптоза в клетках Jurkat сопоставимы с таковыми при действии подофиллотоксина. На клетках сублинии Jurkat/A4 в этой же дозе гораздо менее выраженный эффект отмечается только через 5 суток. Более того, с повышением концентрации препарата заметной дозозависимости гибели клеток Jurkat/A4 не наблюдается. В дозах, вызывающих гибель клеток Jurkat и индукцию апоптоза в части клеточной популяции, азааналог подофиллотоксина снижает содержание клеток в фазе S при увеличении содержания клеток в фазах G₀/G₁ и G₂/M. В то же время, в клетках Jurkat/A4 действие подофиллотоксина или его азааналога приводит практически к полному блоку цикла (свыше 80%) в фазе G₂/M. Развитие апоптоза как в клетках исходной линии Jurkat, так и в сублинии Jurkat/A4 сопровождается активацией каспазы-3. При действии препарата NMR/19217524 и подофиллотоксина в культуре Jurkat активная форма каспазы-3 выявляется примерно в 30% клеток, в то время как в резистентной линии Jurkat/A4 содержание таких клеток не превышает 8%. Активация каспазы-3 сопровождается и появлением расщепленной формы ее специфического субстрата PARP, которая с помощью моноклональных антител, не реагирующих с интактным энзимом, выявляется в 40% клеток Jurkat и 10% клеток Jurkat/A4. Таким образом, синтетический азааналог подофиллотоксина является индуктором каспазозависимого апоптоза как в клетках Jurkat, так и в клональной линии Jurkat/A4, обладающей множественной лекарственной резистентностью.

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ ТА рН НА КАТАЛАЗНУ АКТИВНІСТЬ ПРЕДСТАВНИКІВ НЕПАТОГЕННИХ КОРИНЕБАКТЕРІЙ

ФУРТАТ І. М., КУНИЦЯ Н. І., ХОМИЧ Л. С.

Національний університет «Кієво-Могилянська академія», Україна;
e-mail: furtat@ukma.kiev.ua

Відомо, що до роду *Corynebacterium* належить більше ніж 83 види, чим зумовлені відмінності фізіолого-біохімічних властивостей його окремих представників. Наприклад, коринебактерії переважно є факультативними анаеробами, однак культура *C. terpenotabidum* не здатна рости за анаеробних умов. Коринебактерії також є каталазопозитивними, але в межах роду властивості цього ензиму відрізняються у різних представників. Так, за даними літератури каталаза *C. glutamicum*

є термостабільною (65 °С) й стабільною за різних значень рН. Нами також показано, що *C. ammoniagenes* характеризується термостабільною каталазою із широким оптимумом рН.

Метою роботи було дослідити залежність каталазної активності *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610Т та *C. flavescens* УКМ Ас-611^Т від рН і температури. Каталазну активність визначали спектрофотометрично за розкладом пероксиду водню (λ 240 нм) у стандартизованій суспензії бактеріальних клітин ($1 \cdot 10^9$ кл./мл) добових культур, які вирощували на середовищі для культивування коринебактерій 53 при температурі 30 °С. Вплив температури на каталазну активність моделювали шляхом попереднього прогрівання культури при температурі 40, 50 і 60 °С упродовж 10, 20 та 30 хв. Залежність каталазної активності від рН визначали із застосуванням К-фосфатного та Na-цитратного буферних розчинів (рН 6,0, 7,4 та 8,0).

Було встановлено, що добові культури *C. terpenotabidum* і *C. flavescens* відрізняються між собою за рівнем каталазної активності в середньому в 4 рази. В умовах використання К-фосфатного буфера (рН 7,4) і температури 30 °С ензиматична активність *C. terpenotabidum* становить 649, а *C. flavescens* – 2084 мкмоль/хв \cdot 10⁹ кл. відповідно. У разі застосування Na-цитратного буфера (рН 7,4) спостерігається зниження каталазної активності у *C. terpenotabidum* (550 мкмоль/хв \cdot 10⁹ кл.). Натомість, у штаму *C. flavescens* дана активність зростає й становить 2560 мкмоль/хв \cdot 10⁹ кл. Зміни рН до 6,0 та 8,0 суттєво не впливають на ензиматичну активність досліджених штамів за використання обох буферних розчинів. Вивчення впливу температури на каталазну активність коринебактерій засвідчило, що каталаза штамів *C. terpenotabidum* і *C. flavescens* є термолабільною. З'ясовано, що температура вища за 40 °С призводить до суттєвого зниження (в 4–5 разів) активності ензиму. У *C. flavescens* при 40 і 50 °С каталазна активність становить 2634 і 505 мкмоль/хв \cdot 10⁹ кл., а у *C. terpenotabidum* – 653 і 117 мкмоль/хв \cdot 10⁹ кл. відповідно.

DUODENUM MUCOSA DEFENCE FACTORS AT ULCER MODEL AND INFLUENCE OF FENUGREEK EXTRACT IN RATS

¹*KHILKO T. D.*, ¹*YAKUBTSOVA I. V.*, ¹*PREOBRAZHENSKA T. D.*,
¹*OSTAPCHENKO L. I.*, ²*MAKAI S.*

¹*Taras Shevchenko Kyiv National University, Biological Department, Kyiv;*

²*Universit y of West Hungary;*

e-mail: tkhilko@gmail.com

Study of properties of biologically active substances provides perspective of their use at pathologies of different genesis.

The purpose of this work was to research the effect of the fenugreek extract on the state of duodenum mucosa cells in conditions of cysteamine model ulcer in rats.

Experiments were carried out on plasma membranes (PM) of duodenum mucosa cells; also, content of glycoproteins (GP) in parietal mucosa of duodenum was evaluated. Lipid composition and the level of activity of membrane bounded enzymes were studied to estimate the structural and functional state of plasmatic membranes (PM). Investigations

were carried out in acute experiments on male rats. Animals were divided into the groups: 1 – control; 2 – animals with cysteamine model ulcer, which development was controlled by histological examinations; 3 – the group of animals that were given fenugreek extract in a dose of 50 mg/kg during 7 days.

As compared with control, cysteamine model caused an increase of galactose (2.7 times), fucosa (1.8 times) and of N- acetylneuramine acid (2.4 times), but lowered levels of hexosamines (3.0 times).

In the same conditions, there was observed lowered activity of membrane bounded enzymes (PM) – 5'-nucleotidase, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases and H^+ , K^+ -ATPases (1.5 to 2 times); activity of Na^+ , K^+ -ATPase was increased two times compared to control.

Determination of phospholipids (PL) in PM cells of duodenum mucosa showed a decrease of total phospholipids (PL) 2.1 times, the most significant was a decrease of individual fractions of PL: phosphatidylcholine (PC) and sphingomyeline (SM) 2.7, phosphatidyl ethanolamine (PE) in 2.6, phosphatidyl inositol (PI) 1.5 times, but quantity of lyso phosphatidylcholine (LPS) increased 1.5 times. Therefore, the rate of PC/LPS in comparison to control in animals with cysteamine treatment decreased 3 times.

The results may indicate destabilization and structural, functional disturbances of PM cells of duodenum mucosa at cysteamine model ulcer.

Taking into account that cysteamine inhibits mucus-producing ability of duodenum mucosa cells, fenugreek extract stimulates this process influencing metabolic and regenerative processes in mucosa cells.

Fenugreek extract introduced into animals with cysteamine ulcer resulted in recovery of PL content, decrease of cholesterol, normalization of the activity of the studied membrane bounded enzymes nearly to the control level. Therefore, our results show that fenugreek extract may accelerate recovery processes and lead to normalization of structure-functional state of cells in damaged mucosa under the condition of duodenum with ulcer.

It is of future benefit to study compounds that would influence various levels of pathogenesis ulcerous disease of stomach and duodenum.

Polyvalency of action of extracts from medicinal herbs is their doubtless advantage at treatment. It includes not only specific influence, but also a wide spectrum of regulating effects, bioavailability and high speed of response of nonspecific resistance system.

ОКСАЛАТ ЯК РЕГУЛЯТОР МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У М'ЯЗОВІЙ ТКАНИНІ ТВАРИН ІЗ РІЗНИМ ТАКСОНОМІЧНИМ ПОЛОЖЕННЯМ

ХЛУС К. М.

*Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна;
e-mail: khlus_k@rambler.ru*

Сполуки щавлевокислотного ряду характеризуються значним поширенням у біологічних і абіотичних компонентах природних екосистем і надзвичайною різноманітністю механізмів впливу на організм живих істот. Негативні оксалатзалежні ефекти на організм можуть поглиблюватися за дії додаткових несприятливих

чинників довкілля; зокрема, нещодавно виявлено нові природні механізми виникнення оксалатів – потужні фотохімічні реакції синтезу дикарбонових (найбільше щавлевої) кислот в атмосфері Землі. Дослідження, що дадуть можливість охарактеризувати на сучасному науковому рівні механізми адаптації та дезадаптації метаболічних систем гомеостазу в умовах оксалатного пресингу залежно від еволюційного статусу організмів, встановлення особливостей реактивності молекулярно-мембранних систем тварин з різним таксономічним положенням на надмірне надходження оксалатів дозволять, зокрема, обґрунтувати концепцію щодо їхньої ролі як впливового екологічного чинника в реалізації еволюційної програми адаптації до негативних ефектів оксалатів.

Мета дослідження: встановлення особливостей біологічної дії оксалатів на молекулярному рівні структурної організації живої матерії і параметрів оксалатної резистентності живих систем, що склалася протягом еволюції.

Тваринні об'єкти експериментального дослідження: виноградні слимаки *Helix pomatia* Linneus (Тип Mollusca, Клас Gastropoda, Ряд Geophila, Родина Helicidae) і білі конвенційні аутбредні щури *Rattus norvegicus* Berkenhout (Тип Chordata, Клас Mammalia, Ряд Rodenta, Родина Muridae).

Об'єктом дослідження були без'ядерні гомогенати м'язової тканини.

Предмет дослідження: вплив *in vitro* оксалату (0,5 мМ) на інтенсивність лактат-дегідрогеназної реакції (ЛДГ-реакції).

Встановлено, що гальмівний ефект щавлевої кислоти на активність ЛДГ скелетних м'язів білих щурів коливається в діапазоні 8,5–52,5%. Співвідношення активності окремих ізоензимів виявило перевагу анаеробних фракцій – ЛДГ₄ і ЛДГ₅ (відповідно, 27,46 і 34,28%, сумарно 61,74 %). Найменш вираженим пригнічення ЛДГ-реакції спостерігається у пробах з найбільшим вмістом М-субодиниць ЛДГ. Отже, М-субодиниці ЛДГ, на відміну від «аеробних» Н-субодиниць, виявляють меншу чутливість до дії оксалатаніона, що підтверджено наступним кореляційним аналізом.

Схожі результати показало дослідження впливу оксалату на інтенсивність ЛДГ-реакції у м'язовій тканині молюсків *H. pomatia* L., проте сумарний вміст «аеробних» ізоензимів ЛДГ₁ + ЛДГ₂ (13,40 проти 24,87%) і ступінь пригнічення активності ЛДГ (12,35 проти 26,84%) виявилися нижчими за відповідні показники у скелетних м'язах білих щурів.

Таким чином дійшли висновків:

1. Ступінь оксалатзалежного (0,5 мМ) пригнічення *in vitro* ЛДГ-реакції у м'язовій тканині статевозрілих молюсків *H. pomatia* L. складає 12,35%.

2. Щавлева кислота в концентрації 0,5 мМ виражено (у середньому на 26,84%) гальмує *in vitro* ЛДГ-реакцію у тканині м'язів білих щурів, що значно перевищує відповідний показник для *H. pomatia* L.

3. Пригнічення інтенсивності ЛДГ-реакції обумовлено вибіркоvim інгібуванням активності «аеробних» ізоензимів ЛДГ₁ і ЛДГ₂ внаслідок високої чутливості до оксалатаніону Н-типу субодиниць, вміст яких значно відрізняється у тварин з різним таксономічним положенням.

РОЛЬ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ПРИ ТРАНСПОРТЕ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ЧЕРЕЗ МОДЕЛЬНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МЕМБРАНЫ

ХМАРСКАЯ Л. А., БЕРЗЕНИНА О. В.

*ГВУЗ «Украинский государственный химико-
технологический университет», Днепрпетровск;
e-mail: liya1@ua.fm*

Известно, что карбоновые кислоты являются составляющей частью любого организма, входя в состав липидов, эфиров и др. Кроме того, карбоновые кислоты активно продуцируются в процессе жизнедеятельности. При взаимодействии с мембраной клетки эти кислоты выступают в роли протонаторов. Организм любого человека на 3% состоит из металлов, которые находятся в разных количествах и выполняют разнообразные функции. Поэтому взаимодействие ионов металлов и карбоновых кислот является неотъемлемым процессом, происходящем в любом организме.

Целью данной работы было изучение роли комплексообразования ионов Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} с низшими одноосновными карбоновыми кислотами (муравьиная, уксусная, пропионовая) при переносе последних через модельные клеточные мембраны.

В качестве модели использовали бислоенные липидные мембраны (БЛМ), которые адекватно отображают все свойства нативных мембран. Мембранообразующий раствор готовили по методу Фолча, а БЛМ формировали согласно методу Мюллера на тefлоновой перегородке, разделяющей два водных пространства. Об изменениях свойств БЛМ и процессов, происходящих с липидным бислоем судили при помощи измерения удельной проводимости и мембранного потенциала. Одновременно с этим оценивали форму и долю комплексных частиц металлов (II) в растворах. Для этого были построены диаграммы распределения при помощи программ CHEASPro и HySS.

Как показано ранее ионы металлов(II) не проникают сквозь БЛМ, а лишь обратимо адсорбируются на поверхности. Механизмы транспорта низших карбоновых кислот подробно описаны ранее.

При совместном введении катионов металлов(II) и карбоновых кислот отмечено, что характер изменения проводимости и мембранного потенциала отличается от характеристик, полученных при введении индивидуальных веществ. Установлено, что проводимость возрастает с ростом pH раствора и, достигнув максимума, резко уменьшается. Также отмечено, что величина проводимости прямо пропорционально зависит от концентрации введенного агента. В ходе анализа полученных результатов и диаграмм распределения установлено, что с БЛМ взаимодействует комплексный ион состава $[ML]^+$ (где $M=Ni^{2+}$, Cu^{2+} , Zn^{2+} ; $L=COO^-$, CH_3COO^- , $CH_3CH_2COO^-$). Необходимо отметить, что при комплексообразовании полностью изменяется процесс транспорта через мембрану. Комплексная частица сначала адсорбируется на поверхности БЛМ (изменение величины мембранного потенциала), а затем за счет липофильного лиганда – карбоновой кислоты – проникает сквозь БЛМ (изменения проводимости).

Было установлено, что характер изменения проводимости БЛМ не зависит от природы центрального атома. Различие во влиянии комплексных частиц на БЛМ определяется строением углеводородного радикала лиганда. С увеличением длины углеводородного радикала лиганда увеличивается липофильность комплексной частицы и, следовательно, увеличивается способность взаимодействовать с липидным бислоем мембраны.

МІНЕРАЛЬНИЙ ОБМІН В ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ D-ГІПО-, D-ГІПЕРВІТАМІНОЗУ ТА ВПЛИВУ ВІТАМІНУ E

ХОМЕНКО А. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: annavic@ukr.net*

У підтриманні мінерального статусу в організмі провідна роль належить вітаміну D₃, активні метаболіти якого діють як на рівні геному через регуляцію синтезу транспортних протеїнів, ензимів, так і безпосередньо впливаючи на структуру та функції клітинних мембран. Інтенсивність цих процесів обумовлена ступенем забезпеченості організму вітаміном D₃, показником якого є рівень 25ОНD₃ у сироватці крові. Одним із регуляторів метаболізму холекальциферолу виступає вітамін E.

Метою досліджень було вивчити мінеральний обмін у різних тканинах щурів за умов D-гіпо-, D-гіпервітамінозу та впливу різних доз вітаміну E.

Встановлено, що зниження вмісту 25ОНD₃ у сироватці крові на 51,9% за умови D-гіповітамінозу призводило до розвитку гіпокальціємії (зниження на 26%) та гіпофосфатемії (зниження на 20%). У кістковій тканині, як і в сироватці крові, рівень кальцію та фосфору знижувався на 19 й 16% відповідно. Проте у серці їх вміст підвищується більш ніж на 20%. У нирках, на тлі зниження на 27% рівня кальцію, вміст неорганічного фосфору зростає на 26%. Показано, що сумісне введення фізіологічних доз вітаміну D₃ й α-токоферолу (0,726 МО) більш ефективно нормалізує мінеральний обмін у досліджуваних тканинах, порівняно з ефектом лише вітаміну D₃. Проте висока доза α-токоферолу (7,26 МО) пригнічує позитивний ефект холекальциферолу.

При D-гіпервітамінозі зростання вмісту 25ОНD₃ у сироватці крові у 3,5 рази на тлі гіперкальціємії (зростання на 40%) та гіперфосфатемії (зростання на 9,5%), у кістковій тканині спостерігалось зниження майже на 25% вмісту кальцію й на 42% фосфору. Але у серці, як і за умови D-гіповітамінозу, їх рівень зростає на 40 та 70% відповідно. У нирках збільшення вмісту мінеральних компонентів було менш вираженим. Фізіологічна доза α-токоферолу обумовлює нормалізацію вмісту мінеральних компонентів у досліджуваних тканинах. Тоді як застосування високої його дози знижує рівень кальцію у кістковій тканині та підвищує у серці й нирках.

Таким чином, отримані результати свідчать, що вітамін E відіграє важливу роль у нормалізації мінерального обміну в організмі, опосередковану вітаміном. Проте характер й інтенсивність впливу α-токоферолу на ці процеси залежить від доз та типу тканини.

ОСНОВНІ ФРАКЦІЇ ЛІПІДІВ ТКАНИН МОЗКУ БІЛОГО ЩУРА В УМОВАХ ШТУЧНОГО ГІПОБІОЗУ

ЦВІЛІХОВСЬКИЙ В. І., МЕЛЬНИЧУК С. Д.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: tsv.val@twin.nauu.kiev.ua*

У цій публікації приділяється увага складу та кількісному вмісту ліпідів у тканинах мозку білого щура в період штучного гіпобіозу, який було проведено за методом Бахметьєва–Джайя–Анжуса.

Мета роботи – встановити особливості складу та кількісного вмісту загальних ліпідів тканин мозку білого щура в умовах штучного гіпобіозу.

Нами було сформовано дві групи білих щурів віком 1–12 місяців, по 5 самців у кожній: 1 група – контроль; 2 група – щурі, яких переводили у стан штучного гіпобіозу, використовуючи герметичну камеру із температурою навколишнього середовища 3–5 °С, в яку поміщали піддослідних тварин. Тривалість експерименту складала 3 години, протягом яких за допомогою змішувача газів досягалася зміна газового складу суміші гіпобіотичної камери (вміст CO₂ підвищувався до 18 ± 2%, а O₂ – знижувався до 4 ± 1%). Забій тварин проводили за температури тіла 20 ± 2 °С. Екстракт ліпідів тканин мозку отримували за методом Блайя і Даєра в хлороформно-метанольній суміші 1 : 2. Для розділення загальних ліпідів на класи, були використані платівки «Sorbfil» (Росія) з рухомою фазою гексан – діетиловий ефір – оцтова кислота у співвідношенні 90 : 1 : 1. Кількісний вміст ліпідів визначали за методикою Петровського В. І. та ін., 1986.

Одержані дані експерименту свідчать, що кількісний вміст основних фракцій ліпідів тканин мозку в умовах штучного гіпобіозу білого щура різниться з контрольною групою тварин. Так, за штучного гіпобіозу щурів виявлено, що рівень фосфоліпідів, вільних жирних кислот, діацилгліцеролів та ефірів холестеролу відповідно в 15,9, 28,0, 29,0, та 50,1% вірогідно підвищується, триацилгліцеролів на 27,0% вірогідно знижується, а рівень холестеролу залишається незмінним у тканинах мозку порівняно з контрольною групою тварин.

ВЛИЯНИЕ НЕДОСТАТКА И ИЗБЫТКА МЕЛАТОНИНА НА СОСТОЯНИЕ ПРООКСИДАНТНО– АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС

*ЦЕБРЖИНСКИЙ О. И., ЛАРИЧЕВА Е. Н., СЕМЕНЧУК С. В.,
ЦВЯХ О. О., ЧЕБОТАРЬ Л. Д., ЯНИШЕВСКАЯ В. С.*

*Николаевский государственный университет
им. В. А. Сухомлинского, Украина;
e-mail: tsebrzhinsky@mail.ru*

Целью работы было исследование состояния прооксидантно–антиоксидантной системы (ПАС) у крыс в условиях гипо- и гипермелатонинемии. Исследования были проведены на крысах самцах линии Вистар, которые содержались в стандарт-

них условиях вивария, световой режим – 12 ч (темнота) : 12 ч. (свет) – 5, 10, 30, 55 суток. При моделировании гипомелатонинемии животные содержались в режиме постоянной освещенности (1000–1500 люкс) 5, 10, 30, 55 суток. Гипермелатонинемия моделировалась введением мелатонина *per os* 0,3 и 1 мг/кг массы тела/сутки 5, 10, 30, 55 суток. В сыворотке крови и гомогенатах органов определяли показатели: диеновые конъюгаты (ДК) и малоновый диальдегид (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КТ), глутатионпероксидазы (ГПО).

В результате проведенных исследований было установлено, что в условиях краткосрочного эксперимента наблюдается разнонаправленная реакция в исследуемых органах, что может быть связано с изменением продукции эндогенного мелатонина в этих органах и использованием низкомолекулярных антиоксидантов.

При длительных экспериментах эффекты недостатка или же избытка мелатонина проявляются более отчетливо. При недостатке мелатонина в течение длительного времени в различных органах активизируется пероксидное окисление, что приводит к увеличению концентраций его первичных (ДК) и вторичных (МДА) продуктов и снижению активности антиоксидантных энзимов. Однако и длительное введение мелатонина в дозе 1 мг/кг массы тела/сутки у крыс вызывало аналогичный эффект – во всех исследуемых органах, кроме сердца, и в крови увеличиваются концентрации ДК и МДА, а активность антиоксидантных энзимов снижается. Это может свидетельствовать не только об антиоксидантных, но и о прооксидантных свойствах мелатонина при длительном введении *per os* в дозе 1 мг/кг массы тела/сутки.

ПОКАЗНИКИ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ТА ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ У СПЕРМІ КНУРІВ-ПЛІДНИКІВ

ЦЕХМІСТРЕНКО С. І., ПОЛІЩУК С. А., РАДЗІВІЛОВА Ю. О.

*Національний аграрний університет, Біла Церква, Україна;
e-mail: sveta7880@ukr.net*

Вивчення особливостей функціонування статевих клітин кнурів-плідників, які відіграють вирішальну роль у здійсненні репродуктивної функції, набуває особливої актуальності в сучасних умовах.

Дослідження проводили в ННДЦ Білоцерківського національного аграрного університету. Матеріалом для дослідження була сперма кнурів-плідників 20-місячного віку. Мітохондрії сперміїв виділяли за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги (14 000 g). Стан процесів пероксидного окислення ліпідів оцінювали за активністю каталази, супероксиддисмутазу, глутатионпероксидази, глутатионредуктази та за вмістом гідропероксидів ліпідів, дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів і церулоплазміну. Інтенсивність енергетичного обміну оцінювали за активністю АТР-ази, лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази та за вмістом глюкози, фруктози, лимонної і піровиноградної кислот у плазмі кнурів-плідників та субклітинних фракціях (мітохондріях і цитоплазмі) сперміїв. Результати досліджень обробляли статистично.

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів у плазмі сперми кнурів має певні особливості. Рівень первинних продуктів пероксидного окислення ліпідів у спермі кнурів гібриду Оптимус достовірно вищий (у 2,7 раза) порівняно з показниками кнурів породи Ландрас. Кількість вторинних продуктів ліпопероксидації, зокрема ТБК-активних продуктів, була вищою у 3,2 раза ($P < 0,05$). Активність каталази у спермі кнурів-плідників гібриду Оптимус у чотири рази вища порівняно із кнурами породи Ландрас.

Встановлено, що основним енергетичним субстратом для сперміїв є фруктоза, вміст якої значно більше, ніж глюкози. Виявлено високу активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази в мітохондріях сперміїв. Сперма кнурів породи Ландрас характеризується вищим енергетичним потенціалом. Можливо, це і обумовлює різну рухливість та запліднюючу здатність сперми кнурів різних порід. В умовах нормального фізіологічного стану організму співвідношення між вільнорадикальним окисленням та енергетичним обміном збалансоване.

Таким чином, дослідження процесів пероксидного окислення ліпідів та енергетичного обміну свідчить про те, що сперма кнурів-плідників характеризується інтенсивними обмінними процесами, які виявляють породні особливості.

ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН ТА АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАТУС ТКАНИН ПТИЦІ

*ЦЕХМІСТРЕНКО С. І., ЯРЕМЧУК Т. С., ЦЕХМІСТРЕНКО О. С.,
ПОЛІЩУК В. М., ЧУБАР О. М., ПОНОМАРЕНКО Н. В.*

*Білоцерківський національний аграрний університет, Україна;
e-mail: t.yaremchuk@mail.ru*

Метою роботи було дослідження енергетичного обміну та механізмів формування і функціонування системи антиоксидантного захисту (АОЗ) в організмі птиці у видовому і віковому аспектах та за дії різних чинників (важкі метали, сполуки Se, тканинні препарати та кормові добавки).

Матеріалом дослідження була кров, тканини печінки, нирок та підшлункової залози птиці різних видів (кури, перепели, страуси).

Досліджували активність основних ензимів енергетичного обміну: сукцинатдегідрогенази (СДГ), цитохромоксидази (ЦХО), лактатдегідрогенази (ЛДГ), вміст креатинфосфату, неорганічного фосфору. Стан системи АОЗ оцінювали за активністю ензимів: супероксиддисмутази (СОД), каталази та глутатіонпероксидази (ГПО).

Під час переходу від ембріонального до постнатального періоду розвитку в організмі птиці відбувається істотне зростання активності ензимів анаеробної та аеробної фаз розщеплення вуглеводів, а також дихального ланцюга мітохондрій. Початок функціонування легеневого типу дихання у птиці характеризується високою активністю ензимів системи антиоксидантного захисту в органах травлення та виділення.

Встановлена інтенсифікація процесів гліколізу, активація ензимів циклу Кребса та дихального ланцюга мітохондрій у період початку та становлення яйцекладки. Активацію системи АОЗ відмічено у періоди зміни пера та статевого дозрівання залежно від виду птиці та напряму продуктивності.

В організмі птиці на початку та в період становлення яйцекладки зростає інтенсивність обмінних процесів. У цей період відбувається активація системи АОЗ, яка бере участь у знешкодженні активних форм кисню, що утворюються внаслідок інтенсивного функціонування дихального ланцюга мітохондрій. Висока активність СДГ та ЦХО за низького вмісту креатинфосфату та неорганічного фосфору в період вилуплення та інтенсивної яйцекладки свідчить про високу потребу організму птиці в енергії. Підвищений рівень СОД у цей період забезпечує утилізацію вільних радикалів. Неузгодженість у роботі СОД та каталази компенсується зростанням активності ГПО у тканинах органів травлення. У нирках та печінці перепелів виявлено зростання антирадикального захисту за дії сполук селену.

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ ПІСЛЯ ДОЗОВАНОГО ГІПОКСИЧНОГО ТА ГІПЕРОКСИЧНОГО ВПЛИВІВ

ЧАКА О. Г., ЯНКО Р. В.

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: lenchaka@ukr.net*

Кисень відіграє ключову роль в життєдіяльності більшості живих істот. Істотне зниження або підвищення вмісту кисню в повітрі може призвести до загибелі організму. В той же час дозована гіпоксія, як і дозована гіпероксія, широко використовується для лікування багатьох захворювань. Показано, що адаптація до гіпоксії здійснюється шляхом збільшення активності ензимів енергетичного метаболізму та синтезу додаткової кількості нових ензимів.

Метою проведених досліджень було вивчення впливу дозованих гіпо- та гіпероксичних газових сумішей на активність ензимів енергетичного метаболізму паренхіми печінки щурів.

Дослідження проведено на 30 щурах-самцях лінії Wistar, віком 6 місяців. Щурів було розділено на три групи: I група – контрольні щури, II група – тварини, що отримували гіпоксичну газову суміш (10% кисню в азоті), III група – щури, що зазнавали впливу гіпероксичної газової суміші (40% кисню в повітрі). Газові суміші щурам II та III груп подавали протягом однієї години щоденно. Тривалість експерименту становила 28 діб. Щурі як контрольних, так і дослідних груп мали вільний доступ до води і корму *ad libitum*.

З гомогенату печінки щурів диференційним центрифугуванням видаляли мітохондрії. У суспензії мітохондрій гепатоцитів визначали активність сукцинатдегідрогенази (методом Кривченкової), глюкозо-6-фосфатази (методом Швансона) та концентрацію протеїну (методом Лоурі).

Одержані експериментальні дані показали, що після 28-добового впливу дозованої гіпоксичної газової суміші активність сукцинатдегідрогенази в суспензії мітохондрій гепатоцитів зростає на 51% порівняно з контролем. Збільшення активності цього ензиму свідчить про підвищення енергетичного потенціалу мітохондрій та активацію окислення сукцинату. В умовах дозованої гіпероксії активність сукцинатдегідрогенази навпаки – зменшується на 19%, що може вказувати на зниження енергетичного потенціалу гепатоцитів.

Концентрація протеїну в суспензії мітохондрій гепатоцитів після 28-добового впливу дозованої гіпоксичної або гіпероксичної газових сумішей зростає на 27 і 46% відповідно порівняно з контролем. Збільшення концентрації протеїну в мітохондріях вказує на посилення протеїнсинтезуючої активності останніх.

Активність глюкозо-6-фосфатази в суспензії мітохондрій гепатоцитів після впливу дозованої гіпоксичної або гіпероксичної газових сумішей зменшується відповідно на 43 і 26%, порівняно з контролем. Тобто в умовах дозованої гіпоксії і гіпероксії не виникає потреби в інтенсифікації процесів глюконеогенезу.

Отже, як дозована гіпоксична, так і дозована гіпероксична газова суміш стимулюють протеїнсинтезуючу активність мітохондрій, але знижують інтенсивність глюконеогенезу. Крім того, дозована гіпоксична газова суміш підвищує енергетичний потенціал гепатоцитів (зростає активність сукцинатдегідрогенази), чого не спостерігається після впливу дозованої гіпероксичної газової суміші. В умовах дефіциту кисню зростання активності сукцинатдегідрогенази забезпечує підвищення синтезу АТФ, що сприяє адаптації клітин до гіпоксії.

INFLUENCE OF ACTINOMYCIN D ON ISOCITRATE LYASE IN SOYBEAN SEEDS DURING GERMINATION IN THE MEDIUM CONTAINING COBALT CHLORIDE

CHECHUI H.

Karazin Kharkov National University, Ukraine

Glyoxylate cycle is one of gluconeogenesis stages, i.e. transformation of the lipids stored in seeds into saccharum and functions in seeds of oily cultures in their germination. The key enzyme of glyoxylate cycle is enzyme isocitrate lyase ICL (CF 4.1.3.1). Because of rapid industrial development a considerable accumulation of heavy metals in the environment has been observed recently. The aim of the present paper is to research influence of actinomycin D on isocitrate lyase activity under the conditions of influence of cobalt chloride in soybean seeds during germination.

The object of study were germinating seeds (s. Clark) soybean grown on the vivarium territory at V. N. Karazin National University. The seeds have been sterilised and germinated cobalt chloride concentration is 10^{-4} M actinomycin D (Act D) was added in concentration of 100 mkg/ml into the medium of sprouting. Cotyledons of soybean seeds sprouting in one, three and five days have been used in the experiments. ICL activity has been determination according to the Dixon and Kornberg method and expressed in nanomoles of phenylhydrazonglyoxylate per 1 mg of protein per 1 min.

Cobalt chloride increased ICL activity on the third day as to control indicators and as to ICL activity on the first day. A significant progress in the research of heavy metals has been achieved due to development of molecular-biologic research which enables to identify some genes coding heavy metals transmitting agents. To find out one of possible mechanisms of ICL activity change, we have investigated AmD influence on the enzyme activity under the influence of cobalt chloride. AmD does not influence ICL activity during the first day of soybean seeds germination.

Thus, the obtained data as to inhibition of ICL activity by antibiotics at the time when there was not true activity increase either in control, or under the influence of co-

balt chloride as to the first day, agree with data of literature and form the integral picture of enzyme synthesis activity in glyoxysomes . But on the third day of germination Act D did not influence ICL activity which, most probably, is explained by short-time action of antibiotics. On the third day when Act D was added into seeds germination medium simultaneously with cobalt chloride, ICL activity increase has been noticed relative to control and relative to the first day.

The idea of this mechanism is in the fact that ICL activity increase is a result of *de novo* enzyme synthesis. Thus, according to the data obtained it is possible to conclude that cobalt chloride influences ICL on transcriptional level.

ЕКОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН РОДУ РЯСКА (*Lemna* L.)

ЯРЕМКО О. Є.

Львівський національний аграрний університет, Львів-Дубляни, Україна;
e-mail: yaremko_o@mail.ru

Вивчення еколого-біохімічних особливостей водних рослин, зокрема представників роду ряска (*Lemna* L.), є важливою науковою проблемою. Адже за умов сьогодення актуальним є пошук нових цінних джерел рослинного матеріалу, котрі зможуть ефективно забезпечити потреби тваринництва, птахівництва, рибництва.

Застосування рослин ряски в сільському господарстві України нині недостатнє, на відміну від інших країн Європи, Азії та Америки. Для активнішого впровадження рослин ряски у практику сільськогосподарського виробництва необхідне вивчення біохімічного складу клітин та метаболічних процесів у рослинах різних видів роду *Lemna* L.

Тому метою роботи було дослідити вміст окремих органічних речовин, макро- і мікроелементів у рослинах ряски, що зростають у водоймах Львівщини.

У дослідженні використовували два види рослин роду *Lemna* L., зібраних з поверхні природних водойм, а саме: *L. minor* L., *L. trisulka* L. У тканинних екстрактах досліджували вміст протеїну, нейтральних ліпідів, моносахаридів, каротину, вітамінів С і Е та хімічних елементів (N, Ca, P, Zn, Fe). Водночас аналізували активність окремих ензимів енергетичного обміну (піруваткіназа, лактатдегідрогеназа), антиоксидантної системи (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза) та вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) – сполук, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) в лізатах клітин.

У дослідженнях встановлено, що показники, які характеризують вміст біоорганічних компонентів у рослинах двох досліджуваних видів ряски, близькі за своїми значеннями, що свідчить про подібну інтенсивність метаболізму цих рослин та однакову цінність різних видів ряски з точки зору практичного застосування як кормових продуктів. Однак ряска мала (*L. minor* L.) найбільш розповсюджена в водоймах Львівщини. У зв'язку з цим рослини цього виду були вибрані для детальніших досліджень.

Алфавітний покажчик

- Авксентьева О. О. 130
Адамовская В. Г. 95
Адамчук-Чала Н. І. 209
Адзерихо И. Э. 114
Аксенко Е. В. 128
Андрійчук Т. Р. 152
Андрееенко Т. И. 144
Антонюк С. В. 195
Антоняк Г. Л. 153
Арнауга О. В. 154
Афанасьєва К. С. 40, 48, 67
Бабіч Л. Г. 119, 187
Бабенко Л. А. 49
Бабенюк Ю. Д. 58
Бабийчук Л. А. 180
Бабич Н. О. 153
Бадун Г. А. 137
Баран М. 183
Барило Б. С. 155
Барська М. Л. 156
Барышников Г. В. 50
Бевза А. А. 50, 86
Бевза О. В. 50, 86
Бевзо В. В. 157
Белава В. Н. 158
Беленичев И. Ф. 159
Березовський В. Я. 202
Берзенина О. В. 252
Біда О. В. 235
Білий О. І. 236
Білий Р. О. 145
Більчук В. С. 159
Блохин Д. 247
Блюм Я. Б. 6, 29
Бобак Я. П. 156
Бобровская М. Т. 115, 116
Бобровська О. М. 86
Богуцька К. І. 65
Божко І. В. 38, 52, 102
Бондарь В. В. 218
Борецька Н. І. 192
Борецький В. Ю. 146
Борецький Ю. Р. 146
Борисова Т. О. 199
Бояршин К. С. 13, 18
Брензан Л. С. 157
Броварська О. С. 20
Брянцева С. А. 29
Буланкина Н. І. 19
Булко О. В. 205
Бура М. В. 236
Бухтиярова Н. 159
Бучковська І. М. 196
Вагіна І. М. 104
Вадзюк О. Б. 54
Варбанець Л. Д. 20
Векліч Т. О. 21, 68
Великопольська О. Ю. 122
Верем'єва М. В. 39, 55
Весельська Л. П. 202
Весельський С. П. 202, 231
Винницька Б. О. 156
Вишневська А. Г. 234
Віщур О. І. 174
Вовк О. І. 156
Вовчук И. Л. 57, 96
Войтович О. М. 87
Войціцький В. М. 58
Волобуєва В. В. 114
Волошук О. М. 197
Ворошилова Н. М. 161
Вудмаска І. В. 123, 174
Галенова Т. І. 60
Галицький В. А. 22, 162
Ганусова Г. В. 165
Ганчурін В. В. 235
Гармаза Ю. М. 163
Гарманчук Л. В. 164, 226
Гармаш Я. А. 71
Герасимів М. Г. 241
Гергалова Г. Л. 61
Гетьман К. І. 101
Гіммельрейх Н. Г. 200, 243
Говорун Д. М. 27, 76
Говоруха Т. М. 231
Гончаренко А. В. 165

- Гончаренко А. М. 81
Горіла М. В. 62
Горда А. І. 167
Горницька О. В. 32
Горчев В. Ф. 168
Гребіник С. М. 169
Гресько Б. Л. 154
Гриненко Т. В. 23, 46, 78
Гринюк І. І. 169, 223
Гриценко П. Г. 70, 83
Грищенкова Е. А. 172
Грубінко В. В. 24, 167
Грязнова Т. А. 14
Губенко І. С. 111
Гудзера О. Й. 13, 73
Гудима В. Ю. 170
Гудкова О. А. 171
Гула Н. М. 4
Гулевський А. К. 172
Гулеюк Н. Л. 85
Гуменецький І. Є. 85
Гураль С. В. 192
Гуринович В. А. 137
Гут І. Т. 33, 74
Гут Р. Т. 74
Гуцол А. В. 173
Данилович Г. В. 125, 126
Данилович Ю. В. 125, 126
Дацюк Л. О. 238, 239
Дебски Я. 91
Демідов С. В. 33
Денисов Е. М. 63
Дергай М. В. 14
Дергай О. В. 14
Дерев'янчук М. В. 198
Дзюба В. Н. 218
Дідович А. П. 174
Діордієва С. І. 78
Дмитренко М. П. 175, 188
Долайчук О. П. 176
Донченко Г. В. 127, 227
Доценко В. А. 128
Доценко О. И. 128
Драган Л. П. 152
Драгущенко О. О. 64
Драч С. В. 198
Дробот Л. Б. 223
Дубей І. Я. 108
Дубей Л. В. 108
Дубицький Л. О. 84
Дудок К. П. 178, 239
Емец А. И. 29
Ефетов К. А. 25
Євтушенко Н. В. 65
Єгорова Д. Є. 63
Єльська Г. В. 39
Ємець А. І. 6
Жерносеков Д. Д. 66
Жиденко А. А. 179
Жирнов В. В. 58
Жмурко В. В. 130
Жук П. Ф. 168
Завелевич М. 247
Зажицька М. О. 40, 67
Залевская И. Н. 80
Заморська Т. М. 202
Запорожченко О. В. 191, 237
Зарудна М. І. 27, 76
Захаричев В. Д. 55
Зелений С. Б. 158
Землянских Н. Г. 180
Зінченко Т. Г. 52
Золотарьова Е. М. 66
Золотарьова О. К. 131, 222
Зубрич О. І. 130
Ігуменцева Н. І. 156
Іскра Р. Я. 180
Кабернюк А. А. 36
Казначеева М. С. 181, 182
Каліман П. А. 132, 220
Калінін І. В. 186
Калачнюк Г. І. 183, 184
Калачнюк Л. Г. 183, 184
Калашник О. М. 185
Калиман П. А. 246
Кальченко В. І. 68, 83, 112
Кальченко О. І. 68
Камінська М. В. 192
Каніболоцький Д. С. 28
Кандаурова Н. В. 187
Капля О. А. 69
Капустяненко Л. Г. 70, 188
Карахим С. А. 168
Карбовський Л. Л. 38, 71

-
- Карпец Ю. В. 134, 193
Карпова І. С. 101
Карпова Е. А. 123
Карпов Л. М. 237
Карпов П. А. 29
Катковская И. Н. 137
Кеца О. В. 211
Кибирев В. К. 30
Кирилів Я. І. 155, 173
Кириленко Т. К. 209
Кирсанова А. В. 25
Кишко Т. О. 175
Кітам В. О. 31
Кішко Т. О. 175
Кіямова Р. Г. 33
Кліх Л. В. 215
Кленіна І. В. 62
Кобзар М. А. 80
Кобзева Д. О. 87
Коваленко Е. О. 101
Коваленко О. П. 13, 18, 73
Коваль Л. М. 189
Коваль Н. К. 153
Ковальова В. А. 74, 234
Ковальчук І. І. 176
Козак Л. П. 194
Козар В. В. 190
Козлова Н. М. 163
Козлов Э. А. 115, 116
Кокошкіна О. О. 191, 237
Колісник Г. В. 192
Колеснікова І. М. 82
Колесник Є. О. 83
Колещук О. І. 214
Колибо Д. В. 36, 81
Колодзейська М. В. 75
Коломієць І. М. 27, 76
Колупаєв Ю. Е. 134, 193
Колчинська Л. І. 77
Комісаренко С. В. 36, 81, 92, 189
Кондратюк А. С. 78
Кондратюк Ю. Ю. 79
Коник У. В. 194
Кононова Г. С. 63, 195
Конопельнюк В. В. 60
Контурська О. О. 138
Копач О. В. 217
Копильчук Г. П. 196, 197
Коркач Ю. П. 135
Корнелюк О. І. 6, 49, 79
Королёва А. В. 80
Корольова Д. С. 32
Короткевич Н. В. 36, 81
Костіна Т. В. 19
Костерін С. О. 7, 54, 112, 187
Костюк К. В. 24
Костюченко О. П. 82
Костянець О. І. 33
Кот Ю. Г. 34
Кофанова О. А. 180
Коцаренко Е. В. 35
Коцюруба А. В. 135
Кошель Т. А. 82, 83
Кравенська Є. В. 84
Кравець В. С. 136, 198, 229
Кретинін С. В. 198
Крикливий І. А. 13, 18, 73
Крисанова Н. В. 199
Крисюк І. П. 228
Кропивко С. В. 14
Крупко О. О. 200, 243
Кузнецова А. Ю. 71
Кузьміна Н. В. 85
Кулик І. В. 58
Кулик Г. О. 123
Куниця Н. І. 248
Куртяк Б. М. 241
Кусак С. А. 13, 116
Кучеренко Л. И. 159
Лабинцев А. Ю. 36, 81
Лабинцева Р. Д. 86
Лазарева З. С. 25
Лапоша О. А. 58
Ларичева Е. Н. 254
Латышко Н. В. 171, 175
Левицкий А. П. 207
Левченко О. Є. 99
Левчук Г. М. 87
Лесникович Ю. А. 114
Леус І. В. 88
Лёшина Л. Г. 205
Линів Л. С. 156
Линник Т. П. 201
Липова Н. М. 38, 90, 102

-
- Литвіновска Р. П. 198
Литвинова Л. М. 82
Лихмус О. Ю. 61, 185, 189
Літовка І. Г. 202
Лозінський О. В. 203
Лосицький М. Ю. 108
Лугова С. Л. 152
Луговської Е. В. 70, 82, 83, 92
Лукаш Т. О. 91
Лукаш Л. Л. 35, 104
Лучка І. В. 239
Лушак В. І. 136, 203, 204
Лушак Ю. В. 204
Лыло В. В. 35
Люта М. Я. 238
Майданюк А. В. 206
Макаренко О. А. 207
Макарчук М. Ю. 231
Макогоненко Е. М. 92
Максимчук О. В. 31
Малишева М. К. 77
Малюта С. С. 111
Малючик С. С. 33
Мандзинець С. М. 236
Мандрик С. Я. 230
Манько Б. О. 122
Манько В. В. 122
Маринич І. М. 208
Мартінець Я. 229
Мартиненко О. І. 209
Мартинишин І. М. 210
Мартынюк И. Н. 201
Марунич Р. Ю. 93
Марценюк О. П. 232
Марченко М. М. 211, 212
Масюк Д. М. 213
Матишевська О. П. 169, 223
Матюха І. О. 214
Мацевич Л. Л. 35
Мединська К. О. 114
Мельник В. О. 99
Мельничук Д. О. 184, 215
Мельничук С. Д. 254
Микулич Д. В. 94
Минаева В. А. 50
Минаев Б. Ф. 50
Михаловська Л. І. 185
Михальченко В. Г. 93, 102
Мищенко Т. В. 179
Мік-Сабат М. Я. 183
Мінченко Д. О. 38, 52, 71, 90, 93, 102
Мінченко О. Г. 38, 52, 71, 90, 93, 102
Мойсеєнок А. Г. 137
Молодченкова О. О. 95
Моне М. 38, 71, 93
Моргаєнко О. О. 234
Моргулець Л. М. 216
Мордерер Д. Є. 14
Мотрук Н. В. 96
Мушій Р. І. 219
Надеждина Е. С. 29
Надточий А. А. 48
Науменко Н. М. 226
Негруцький Б. С. 39, 55, 97
Недзвецький В. С. 213
Непийвода К. Д. 164
Нецик О. В. 217
Нечай Г. І. 192
Никитченко И. В. 246
Никитченко Ю. В. 201, 218
Николюк І. Д. 219
Нікітченко І. В. 220
Ніколаєнко О. В. 14
Новицкая В. Н. 144
Новосильна О. В. 97
Новохацька О. В. 14
Носар В. І. 231
Нурищенко Н. Є. 98
Оболенська М. Ю. 64, 232
Овсянников С. Е. 201
Овчаренко В. И. 188
Омельянюк В. С. 65, 114
Онойко О. Б. 222
Осадчук Т. В. 30
Остапів Д. Д. 85
Остапченко Л. І. 230, 234
Охрименко С. М. 165
Павлов С. В. 159
Паливода К. О. 223
Палладіна Т. О. 138
Панас Н. Є. 153
Панюта О. О. 158, 224
Парфенова И. А. 144
Пархоменко Ю. М. 106

-
- Паршкова Е. В. 25
Пасайлюк М. В. 212
Паславська К. В. 122
Пащенко Л. С. 225
Пелєвін С. В. 99
Пелюх Л. І. 98
Перепелиціна О. М. 226
Перетятко Ю. В. 238
Перський Є. Е. 34
Першко Н. Ю. 99
Петрова Г. В. 227
Петрова Ю. І. 185
Петров С. А. 57, 140, 146
Петрунь Л. М. 175, 228
Пехименко Г. В. 100
Пиняга Ю. В. 146
Підгорський В. С. 101
Підпала О. В. 104
Платонова Т. М. 32
Погожих Е. Г. 172
Подорванов В. В. 131, 245
Пожидаєва А. Э. 128
Покотило І. В. 229
Поліщук В. М. 256
Поліщук С. А. 255
Полетай В. Н. 179
Полищук О. В. 131, 245
Полохіна К. В. 63
Полякова В. В. 152
Пономаренко Н. В. 256
Пономаренко О. М. 19
Попова Х. Є. 116
Попович А. С. 218
Потопальський А. І. 209
Потягайло А. Л. 27, 76
Преображенська Т. Д. 230
Прийма С. Б. 239
Прилуцька С. В. 169, 223
Прокопів Т. М. 146
Раєцька Я. Б. 230
Радзівілова Ю. О. 255
Ракша Н. Г. 152
Ратушна О. О. 90, 102
Резник Е. П. 103
Релина Л. И. 172
Речицький О. Н. 178
Решетнік Є. М. 231
Резніков О. Г. 49
Рибченко Ж. І. 138
Риндич А. В. 14
Рівіс Й. Ф. 214
Родік Р. В. 68, 112
Рока-Мойя Я. М. 66
Романець К. Л. 232
Романюк С. І. 81
Росохацька І. В. 31
Россаханова Л. Н. 207
Рудая Е. В. 233
Руденко Я. О. 234
Руснак Е. М. 94
Сав'як З. І. 239
Савка О. Г. 183
Сагайдак Т. В. 95
Сагач В. Ф. 135
Салига Ю. Т. 241
Самойленко І. О. 104
Самойленко А. А. 223
Санагурський Д. І. 236
Сас М. А. 186
Сашук О. В. 101
Светлова Н. Б. 235, 240
Семенихин А. В. 131
Семенова М. 247
Семенов В. 247
Семенчук С. В. 254
Семочко О. М. 236
Семчишин Г. М. 142, 216
Сердюк І. М. 97
Сибірна Н. О. 156, 178, 238, 239
Сибірний А. А. 146
Сиволап Ю. М. 9
Сиволоб А. В. 40, 48, 67
Сидір-Басараб І. М. 184
Сидоренко М. В. 99
Сидоренко С. П. 10
Сидорик Л. Л. 79
Силонова Н. В. 175
Ситник С. К. 245
Сівко Р. В. 199
Скачкова О. В. 164
Скоклюк Л. Б. 20
Скок М. В. 41, 61, 185, 189
Скрипкіна І. Я. 14
Слипанюк О. В. 239

- Слобожанина Е. И. 163
Слончак А. М. 64
Снітинський В. В. 210
Соколік В. В. 42, 105
Соколовський В. А. 75
Солдаткін О. П. 11
Солдатов А. А. 144
Станев О. І. 237
Старанко У. В. 238, 239
Старикович Л. С. 239
Стасик О. В. 156
Стеблянка Т. Й. 99
Степанюгін А. В. 209
Стефанишин О. М. 153, 239
Стойка Р. С. 145
Стороженко В. О. 240
Стреха І. С. 114, 233
Строкіна А. О. 106
Строцька Є. А. 230
Сушкова В. В. 175
Талоха Н. І. 241
Тамашевський А. В. 107
Танасієнко О. А. 242
Таран Н. Ю. 158, 235, 240
Тарасенко А. С. 200, 243
Терещенко А. В. 201
Тимченко О. О. 97
Ткачук В. В. 108
Ткачук З. Ю. 108
Ткачук Л. В. 108
Токовенко І. П. 109
Томін А. М. 145
Томчук В. А. 244
Топчий Н. М. 245
Тукало М. А. 13, 18, 73, 116
Тютюнникова А. П. 111
Урвант Л. П. 92
Устенко Н. В. 190
Устянська О. В. 146
Фалетров Я. В. 233
Фальченко К. В. 34
Фаюра Л. Р. 146
Федірко Н. В. 84, 217
Федорицька С. М. 62
Федорович Д. В. 146
Федорук Р. С. 176, 214
Федяков Р. О. 153
Ференсович Я. П. 236
Филимоненко В. П. 220, 246
Фильчак О. С. 92
Фильченков А. 247
Філоненко В. В. 33
Фролова Н. С. 233
Фуртат І. М. 248
Футерник П. В. 39
Хижняк С. В. 58
Хлус К. М. 250
Хмарская Л. А. 252
Ходаков И. В. 207
Хоменко А. В. 253
Хомич Л. С. 248
Хоруженко А. І. 55
Храновская Н. Н. 164
Хрипач В. А. 198
Цап М. М. 176
Цап О. Ф. 214
Цвіліховський В. І. 254
Цвіліховський М. І. 213
Цвях О. О. 254
Цебржинський О. І. 182, 254
Цехмістренко О. С. 256
Цехмістренко С. І. 255, 256
Циба Л. О. 14
Цимбалюк О. В. 112
Цисельская Л. Й. 95
Цудзевич Б. О. 60, 152
Чайковська Л. В. 49
Чака О. Г. 257
Чащин М. О. 31
Чеботарь Л. Д. 254
Чень О. І. 156
Черенок С. О. 83
Чернишенко В. О. 113
Чернишенко Т. М. 113
Чернявський Е. А. 114
Чубар О. М. 256
Чуніхін О. Ю. 54
Шалак В. Ф. 39
Шандренко С. Г. 175
Шапошник Л. А. 35
Шварцова О. В. 146
Шелюк О. В. 114
Шеремет А. А. 218
Ширина Т. В. 115, 116

-
- Шкаволяк А. В. 178
Шкрабак О. А. 21, 68
Шкуматов В. М. 114
Шликов С. Г. 148, 187
Штеменко Н. І. 62, 63, 88, 195, 225
Шубчинський В. В. 20
Шупранова Л. В. 159
Щербина Т. В. 62
Щоголев А. С. 130
Эль-Та'алу А. Б. 19
Юркевич Л. Н. 209
Юсова Е. И. 46
Юхно Ю. Ю. 130
Яворовський О. П. 52
Янишевская В. С. 254
Янко Р. В. 257
Янович В. Г. 170, 208
Янченко О. С. 62
Яремко О. Є. 259
Яремчук Г. Д. 13, 18, 116
Яремчук Т. С. 256
Ястреб Т. О. 193
Яцишина А. П. 104
Ящук В. М. 108
Afanasyef S. 133
Агорова О. V. 151
Auf Gregor 16
Barannik T. V. 17
Bdzhola V. G. 59
Bikfalvi Andreas 16
Bilyu R. 12, 120
Boiko N. 12
Borisov A. A. 160
Borisova T. A. 105, 121
Bugay A. 53
Chechui H. 258
Chekhovskaya L. I. 139
Chevet Eric 16
Chornii S. A. 139
Dallinger R. 44
Deligeorgiev T. 89
Dimova E. 141
Drobot L. 5, 141
Duszynski Jerzy 129
Eichhoff Uwe 43
Esumi H. 37
Falfushynska H. I. 44
Favereaux Alexandre 16
Filonenko V. V. 71, 147
Filyak Y. 133
Filyak Ye. 12
Gaiser Timo 16
Gayda L. M. 244
Gnatyshyna L. L. 44
Gorbenko G. P. 89
Gout I. T. 147
Guyrit Sylvaine 16
Himmelreich N. H. 124
Horbay R. O. 166
Hubenya O. V. 37
Jabouille Arnaud 16
Kaloianova S. 89
Kanyuka O. 133
Kapustian L. 71
Katsuya T. 37
Khilko T. D. 249
Kietzmann T. 141
Kit Yu. 12, 120
Korkach Yu. P. 151
Kotsiuruba A. V. 151
Kozlova N. 141
Krisanova N. V. 105
Kroupskaya I. 71
Lesev N. 89
Limanskaya L. A. 89
Liudkovska V. 45
Magorivska I. 120
Maitre Marlène 16
Makai S. 249
Manko B. O. 166
Manko V. V. 166
Marchenko S. 141
Minchenko D. O. 37
Minchenko O. H. 16, 37
Mitina N. 12
Moenner M. 16, 37
Moskvin M. 12
Nam Y. K. 44
Negrutskii B. 45
Novorodovska T. S. 221
Ostapchenko L. I. 244, 249
Panchuk R. 12
Parkhomenko N. T. 124
Parkhomenko Yu. M. 139

Pineau Raphael 16
Pozdnyakova N. G. 124
Preobrazhenska T. D. 249
Romanchuk L. D. 44
Rozhko O. 71
Sagach V. F. 151
Samoylenko A. 141
Senkiv Ju. 12
Shalak V. 45
Shkandina T. 120
Shtemenko N. I. 149
Shtemenko O. V. 149
Sidorik L. L. 71, 143
Sivko R. V. 105
Skorokhoda T. 12
Skorokhyd N. 12
Stepanenko S. P. 139
Stoika R. S. 12, 120, 133, 166
Stoliar O. B. 44
Strokina A. A. 139
Thiele Herbert 43
Timchenko A. 45
Tomin A. 120
Trusova V. M. 89, 110
Tsvilikhovskii M. 53
Tymoshenko M. O. 244
Vasilev A. 89
Vlasenko D. 56
Volynets G. P. 59
Von Deimling Andreas 16
Yakubtsova I. V. 249
Yarmoluk S. M. 59
Yatsenko L. N. 124
Yudintsev A. V. 89
Zaichenko A. 12
Zav'yalov V. P. 26