

кількість слизу, у культури *Arthrobacter flavescens* на першу добу кількість слизу була незначна. Починаючи з 7 доби у культурі *Arthrobacter flavescens* ми спостерігали накопичення слизу (рис. 1, г). У бінарній біоплівці

було виявлено велику кількість слизу починаючи з 1 доби інкубування, що можливо пов'язано з продукуванням слизу бактерій роду *Pseudomonas*.

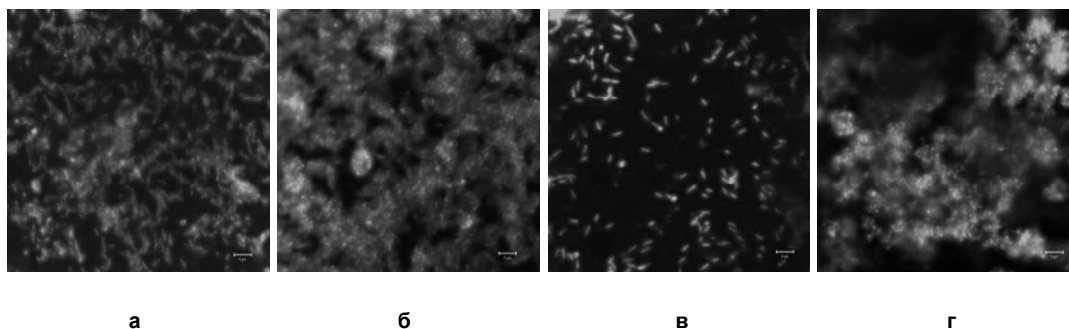


Рис. 1. Біоплівка чистої культури *Pseudomonas sp* (а – 1 доба, б – 7доба) та *Arthrobacter flavescens* (в – 1 доба, г – 7доба)

Дослідження розподілу бактерій у бінарній біоплівці дає нам змогу говорити про зміну домінантів. Так, на першу добу домінували бактерії роду *Pseudomonas*, клітини містилися у слизі утворюючи конгломерати, а бактерії роду *Rhodococcus* були виявлені у невеликій кількості, і розташовувались в базальній частині біоплі-

вки у вигляді шару (рис. 2, а). На 7 добу бактерії роду *Rhodococcus* починають утворювати скупчення. Співвідношення бактерій *Rhodococcus* і *Pseudomonas* приблизно 1:1. На 14 добу, у бінарній біоплівці домінує *Arthrobacter flavescens*.

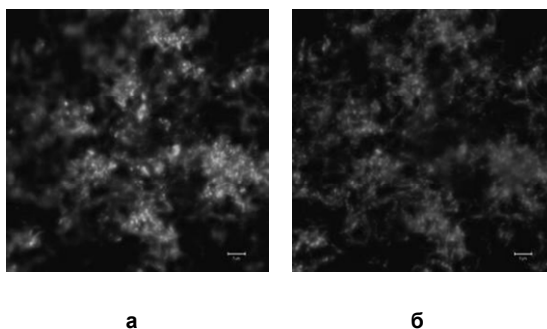


Рис. 2. Архітектура бінарної біоплівки (а – верхня частина біоплівки, б – базальна частина біоплівки)

Висновки. Вперше встановлено, що в базальній частині бінарної біоплівки розташовані вугледеньокисніючі бактерії роду *Rhodococcus*, що руйнують бутилкаучуковий шар захисного покриття. Під час дослідження біоплівки була встановлена надзвичайна гетерогенність. Біоплівка має велику кількість порожнеч та нерівний профіль.

1. Коптева Ж.П., Заніна В.В. Микроорганизмы- фактор биоповреждения изоляционных покрытий газопроводов // Биоповреждения и

методы оценки биостойкости материалов. – М.: Науч. Совет по биоповреждениям, Ин-т эволюц. Морфологии и экологии животных им. А.Н. Северцова, 1988. – С. 40–48. 2. Коптева Ж.П., Заніна В.В. Формування мікробних угруповань на поверхні захисних покриттів // Мікробіол. журн. – 2001. – 63, №2 – С. 3–9. 3. Hausner M., Wuertz S. // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – P. 3710–3713. 4. Lewandowski Z. Structure and function of bacterial biofilms // Biofilms: recent advances in their study and control / Ed. By L.V. Evans. – Haywood Acad. Publ. – 2000. – P. 2–17. 5. Sutherland J.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework // Microbiol. – 2001. – 147. – P. 3–9.

Надійшла до редколегії 07.05.08

УДК 577.15.612.438.014

С. Гребіник, студ.,
І. Гринюк, канд. біол. наук.,
О. Матишевська, д-р біол. наук.

ЕКТО-АТФАЗНА АКТИВНІСТЬ ІЗОЛЬОВАНИХ ТИМОЦИТІВ ЩУРА

Оцінено екто-АТФазну активність тимоцитів щура, досліджено субстратну специфічність ензиму та залежність його активності від іонів Ca та Mg.

The rat thymocyte ecto-ATPase activity was estimated, and the enzyme substrate specificity as well as the dependence of its activity on Ca and Mg ions presence, were examined.

Вступ. Ектоаденозинтрифосфатаза [Е.С. 3.6.1.4 АТФ – фосфогідролаза] належить до ензимів, які розщеплюють позаклітинний АТФ у реакції гідролізу, що протікає з високою швидкістю без утворення проміжного фосфорильованого продукту. Хоча представники цього сімейства АТФаз описані досить давно, лише останнім часом стало зрозумілим, що вони відіграють важливу

роль у клітинах, плазматична мембрана яких містить P₂-пуринорецептори (P2X та P2Y).

Фізіологічна роль екто-АТФаз залишається остаточно не з'ясованою. Існують дані, що вказують на участь ензиму не лише у метаболізмі позаклітинного АТФ та рециркуванні аденозину, але і у передачі пуринергічних сигналів. Оскільки більшість відомих антагоністів

© Гребіник С., Гринюк І., Матишевська О., 2008

P_2 -пуринорецепторів пригнічують екто-АТФазну активність [9], припускають, що ензим може зв'язуватись з P_2 -пуринорецепторами певних типів, або ж безпосередньо виконувати роль рецептора [8].

Екто-АТФазну активність виявлено у клітинах багатьох типів: гепатоцитах, міокардіоцитах, тромбоцитах, В-лімфоцитах, цитотоксичних Т-клітинах [4; 6; 7]. Дані щодо наявності екто-АТФази у тимоцитах є суперечливими. Згідно [7] у тимоцитах у стані спокою екто-АТФазна активність відсутня. З іншого боку, показано, що активність ензиму залежить від ступеню зрілості тимоцитів та виду тварин і виявляється у зрілих, стійких до дії глюкокортикоїдів тимоцитах миші та щура [2].

Метою роботи було оцінити рівень екто-АТФазної активності у ізольованих тимоцитах щура, дослідити субстратну специфічність ензиму та його чутливість до іонів Ca та Mg.

Матеріали і методи. У експериментах використано щурів лінії Вістар обох статей вагою 120–150 г. Тимус вилучали, відділяли від сполучної тканини та кровоносних судин і перетирали через чотири шари нейлонової сітки у буфері такого складу (ммоль/л): Na_2HPO_4 – 3, KCl – 5, NaCl – 120, $CaCl_2$ – 1, глюкоза – 10, Mg Cl_2 – 1, $NaHCO_3$ – 4, HEPES – 10, pH 7,4. Отриману суспензію центрифугували (600 g, 10 хв), а осад клітин ресуспендували до концентрації $2-5 \times 10^8$ кл/мл.

Кількість тимоцитів підраховували за допомогою світлового мікроскопу Biolam "ЛОМО" P12 у камері Горяєва з використанням 0,4 % розчину трипанового синього. Вміст життєздатних клітин у суспензії складав $97 \pm 2\%$.

Для визначення АТФазної активності тимоцити ($4 \cdot 10^6$ кл.) вносили у стандартне середовище інкубації, яке містило (ммоль/л): HEPES-трис (pH 7,4), -20, NaCl -120, KCl -5, ЕГТА -0,1, $MgCl_2$ або $CaCl_2$ -2. Реакцію ініціювали внесенням АТФ (1 ммоль/л), проби інкубували на водяній

бані при $37^\circ C$, реакцію зупиняли додаванням розчину, що містив 1,5 моль/л Na-ацетату, 3,7% формальдегід, 14% етанол, 5% ТХО кислоти. Проби центрифугували (1200g, 15хв), надосадову використовували для визначення кількості неорганічного фосфату на спектрофотометрі Scinco (Німеччина) при $\lambda=660nm$ [5].

При дослідженні субстратної специфічності ензиму у проби вносили відповідний нуклеозидфосфат у концентрації 1ммоль/л, а при дослідженні чутливості до катіонів – Ca^{2+} чи Mg^{2+} у відповідній концентрації на фоні 0,1 ммоль/л ЕГТА.

Як контроль на неферментативний гідроліз АТФ використовували пробу складу описаного вище, яка не містила клітин, а як контроль на вміст ендogenous неорганічного фосфату – пробу, що не містила АТФ.

Статистичну обробку даних проводили загальнопринятими методами варіаційної статистики. Розрахунки та побудова графіків проводилися на IBM PC з використанням спеціалізованих прикладних програм Excel та Origin.

Результати та їх обговорення. За інкубації тимоцитів упродовж 20 хв у стандартному середовищі без додавання двовалентних катіонів та у присутності 0,1ммоль/л ЕГТА спостерігається незначний рівень АТФазної активності (рис.1, крива 3). Внесення у середовище іонів Ca або Mg у концентрації 2ммоль/л призводить до швидкої стимуляції АТФазної активності – вже на 3-й хвилині інкубації кількість вивільненого неорганічного фосфату значно зростає. Крива залежності активності ензиму від часу є лінійною упродовж 10 хв, у подальшому реакція гідролізу уповільнюється. За присутності іонів Mg рівень ензиматичної активності був вищим, ніж за присутності іонів Ca (Рис.1, криві 1 та 2 відповідно).

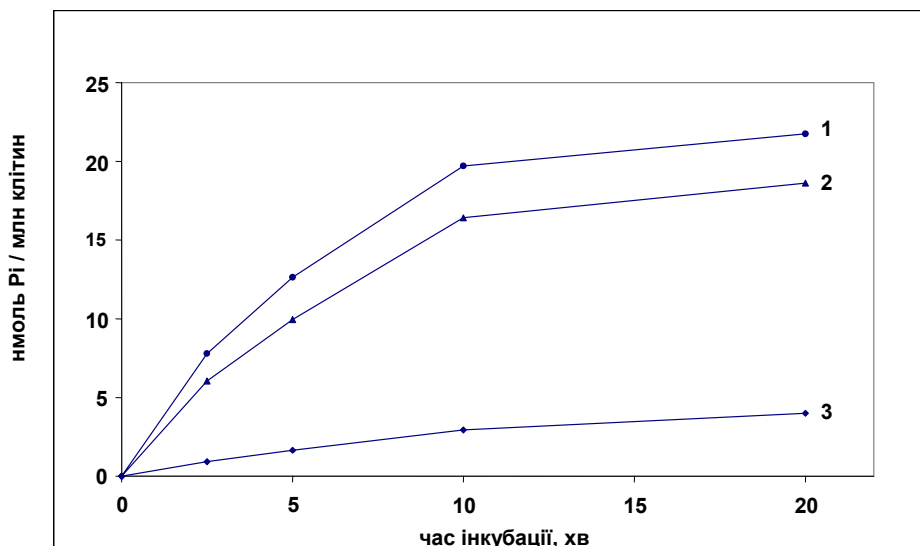


Рис. 1. Кінетика реакції гідролізу АТФ за присутності 2 мМ Mg^{2+} (1), 2 мМ Ca^{2+} (2) чи 1 мМ ЕГТА (3)

Оскільки, згідно результатів тесту з трипановим синім, інтактність клітин повністю зберігалась по закінченні 20-хвилинної інкубації, можна припустити, що стимульована іонами Mg та Ca реакція гідролізу здійснюється АТФазою, каталітичний центр якої розташований на зовнішньому боці плазматичної мембрани тимоцитів. Для підтвердження належності ензиму до екто-АТФаз досліджували деякі його властивості, проводячи реакцію упродовж 5 хв, тобто у режимі початкової швидкості ферментативної реакції.

Дані щодо субстратної специфічності досліджуваної АТФази представлено на рис. 2. Ферментативна активність, що стимулюється іонами Ca, так само, як і стимульована іонами Mg, є найвищою щодо АТФ. У той же час АДФ гідролізується зі швидкістю, що становить 37,3 та 35,5 % від швидкості гідролізу АТФ за присутності Mg^{2+} та Ca^{2+} відповідно, а такий продукт розщеплення АТФ, як АМФ, взагалі не використовується як субстрат фосфогідролазної реакції.

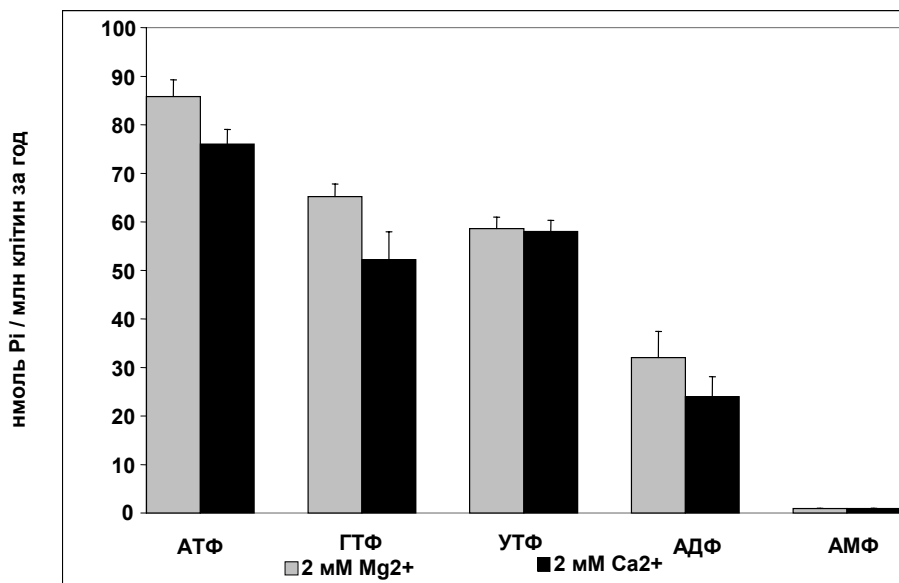


Рис. 2. Субстратна специфічність екто-АТФазної активності тимоцитів (концентрація нуклеозидфосфатів – 1 ммоль/л)

Специфічність АТФази щодо нуклеозидтрифосфатів є широкою – хоча рівень активності є найвищим у присутності АТФ, ензим здатен гідролізувати також ГТФ та УТФ, причому активаторами ферментативної реакції можуть виступати іони як Mg^{2+} , так і Ca^{2+} . Mg^{2+} -залежна активність дещо знижується у послідовності АТФ > ГТФ > УТФ. Ca^{2+} -залежна активність щодо ГТФ та УТФ є приблизно однаковою (68.5 та 76.3 % від активності у присутності АТФ). Отже, тимоцити здатні здійснювати гідроліз не лише позаклітинного АТФ, але й ГТФ та

УТФ, що свідчить про можливу участь екто-АТФази у регуляції відповіді клітин на їх дію як медіаторів.

Хоча екто-АТФази функціонують за доволі високих концентрацій Mg^{2+} та Ca^{2+} (приблизно 1 ммоль/л у позаклітинному середовищі), експресовані у плазматичній мембрані різних клітин ензими можуть виявляти різну чутливість до катіонів. Як видно з кривих залежності ензиматичної активності від концентрації катіонів у середовищі інкубації тимоцитів, за відсутності іонів Са екто-АТФазна активність стимулюється іонами Mg^{2+} , а за відсутності іонів Ca^{2+} – іонами Mg^{2+} (рис.3).

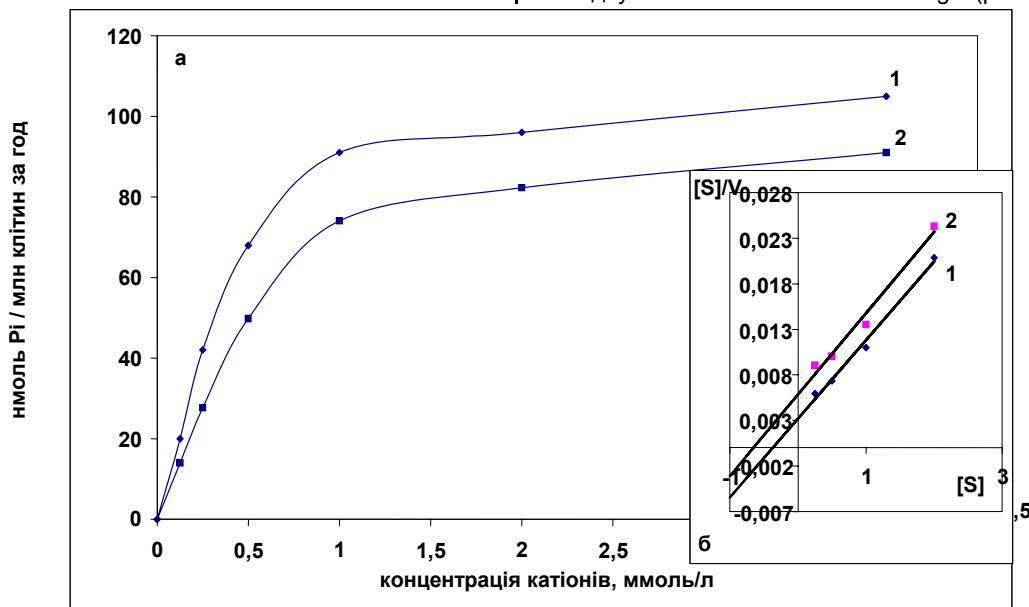


Рис. 3. Залежність екто-АТФазної активності тимоцитів від концентрації іонів Mg (1) і Ca (2) (а) Лінеаризація отриманих концентраційних кривих в координатах Хейнса (б)

Швидке, залежне від концентрації відповідного катіону зростання АТФазної активності, спостерігається у діапазоні концентрацій 0,125–1 ммоль/л, після чого крива виходить на плато. Отже, оптимальним для проявлення ензиматичної активності є діапазон 1–4 ммоль/л концентрацій катіонів. Для оцінки кінетичних

параметрів процесу гідролізу криві залежності ензиматичної активності від концентрації катіону було перебудовано у координатах V/S від S (де S – концентрація іонів Са чи Mg відповідно), що дало можливість розрахувати величини максимальної швидкості реакції V_{max}

та констант активації K_{Mg} та K_{Ca} , тобто оцінити спорідненість ензиму до цих катіонів.

За проведеними розрахунками було знайдено, що V_{max} реакції гідролізу за присутності обох катіонів є майже однаковою і складає 112 та 110 нмоль P_i / млн клітин за год для Mg^{2+} і Ca^{2+} відповідно, значення K_{Mg} становило 0,37 ммоль/л, а K_{Ca} – 0,65 ммоль/л. Ці параметри узгоджуються з літературними даними, за якими екто-АТФаза різних клітин проявляє низьку афінність до Ca^{2+} і Mg^{2+} (величина K_d складає приблизно 10^{-3} моль/л) на відміну Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -активованої АТФази ЕПР або плазматичної мембрани, афінність яких до кальцію є значно вищою (величина K_{Ca} лежить в діапазоні 10^{-6} моль/л) [8]. Отримані нами дані свідчать, що ензим може активуватись обома катіонами, проявляючи дещо вищу спорідненість до іонів Mg .

Отже, в результаті проведених досліджень було визначено, що даний фермент характеризується високою швидкістю гідролізу АТФ, широкою специфічністю до нуклеозидтрифосфатів, здатністю гідролізувати АДФ, але не АМФ, низькою афінністю до Ca^{2+} і Mg^{2+} . Отже за цими параметрами ензим може бути віднесений до екто-нуклеозидтрифосфатогідролаз.

Наявність екто-АТФази у тимоцитах щура ставить питання щодо фізіологічної ролі цього фермента. Оскільки було показано, що у тимоцитах щурів експресуються 7 субтипів рецепторів $P2X$ і 2 субтипи рецепторів $P2Y$ [1], однією з функцій екто-АТФази тимоцитів може бути участь у модифікації і термінації пуринергічних

сигналів шляхом гідролізу нуклеотидів (які можуть виступати лігандами до P_2 – пуринергічних рецепторів). Фермент може також бути задіяний у регуляції клітинного циклу і клітинної загибелі, оскільки АТФ, як агоніст до P_2 рецепторів тимоцитів, може брати участь у процесах клітинної проліферації або індукувати апоптоз [1; 3]. Ще одна можлива функція – захист клітин там, де локальна концентрація АТФ може підвищуватись внаслідок специфічного вивільнення АТФ ефекторними клітинами, наприклад, цитолітичними Т-лімфоцитами, які секретиують АТФ після активації [4].

1. Glass R., Townsen-Nicolson A., Burnstock G. // Cell Tissue Res, May 1, 2000; 300(2): 295-306.
2. Hennighausen G., Hehl EM., Rychly J. Ecto-ATPase activity in rat and mouse thymocytes and cytotoxic effects of various chemical substances in vitro // Arch Toxicol Suppl, January 1, 1985; 8: 500-3.
3. Orrenius S., Jiang S., Kull B., Fredholm B. // Immunol Lett, March 1, 1996; 49(3): 197-201.
4. Plesner L. Ecto-ATPases: identities and functions // Int Rev Cytol, 1995; 158: 141-214.
5. Rathbun W., Betluch V. // anal Biochem, V.28. – p. 436-445, 1996.
6. Strobel R., Rosenberg M. Complementary DNA Cloning and Sequencing of the Chicken muscle Ecto-ATPase // 1 Ann. N. Y. Acad. Sci. 1993; 671:487-489.
7. Wang F., Guidotti G. CD39 Is an Ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 271, No. 17, Issue of April 26, 1996. – pp. 9898-9901.
8. Ziegelhoffer A., Breier A., Dalla N.S. // Chem. Listy 94, 2000.
10. Ziganshin, AU., Zhiganshina, LE., Burnstock, DZh. Ecto-ATPases and receptors for ATP // Eksp Klin Farmakol, May 1, 1997; 60(3): 78-82.

Надійшла до редколегії 28.02.08

УДК 577.21

А. Драницина, канд. біол. наук,
Г. Телегесєв, канд. біол. наук,
І. Чумаченко, студ.,
С. Малюта, д-р біол. наук

МІКРОСАТЕЛІТНИЙ АНАЛІЗ У ПОПУЛЯЦІЯХ ПІНГВІНІВ ДЖЕНТУ (*PYGOSCELIS PAPUA*) ТА ПІНГВІНІВ АДЕЛІ (*P. ADELIAE*)

У статті представлено результати мікросателітного аналізу популяцій пінгвінів дженту та пінгвінів Аделі. Встановлено, що мікросателітні локуси AM12 та RM6 при аналізі популяцій пінгвінів дженту виявились абсолютно мономорфними, із лише одним детектованим локусом за кожним із маркерів. При вивченні мікросателітного локусу RM3 було виявлено 2 алелі: 221 п.н. і новий алель 217 п.н., та підтверджено належність пінгвінів дженту різних островів до одного підвиду (*Pygoscelis papua ellsworthii*). Отримано специфічні для міжвидових досліджень генетичні відстані для локусу RM3 та значні генетичні відстані для локусу RM6 між пінгвінами дженту та пінгвінами Аделі з 12 колоній Антарктики.

In the present paper the results of microsatellite analysis of Gentoo and Adelie penguin's populations are presented. AM12 and RM6 microsatellite loci in populations of Gentoo penguins were absolutely monomorphic with only one allele in both populations. RM3 demonstrated two alleles presented in this locus – 221 b.p. and the new allele – 217 b.p., which has not been described for RM3 to date. We also could confirm that these two populations belong to the same subspecies (*Pygoscelis papua ellsworthii*). The obtained genetic distances were specific for interspecies analyses (RM3 locus) and significant (RM6 locus) between Gentoo penguins and Adelie penguins from 12 colonies of Antarctica.

Вступ. Навколишнє середовище Антарктики характеризується екстремальними умовами, що змінюються в широких межах. З огляду на глобальне потепління, яке впливає на генетичну структуру популяцій рослин та тварин [1], загальну чисельність особин популяцій, межі ареалу тощо, дослідження структури антарктичних популяцій є важливим завданням [2]. Пінгвіни – важлива складова антарктичної екосистеми, і на сьогоднішній день дослідження їхньої біології – одна з актуальних проблем антарктичних досліджень міжнародних спільнот, у першу чергу це стосується проблем розповсюдження видів та їхньої генетичної мінливості [3]. І якщо деякі види пінгвінів (пінгвіни Аделі (*Pygoscelis adeliae*) тощо) уже досить непогано вивчені стосовно цього питання, то ослині пінгвіни – дженту (*Gentoo*) – або Папуа (*Pygoscelis papua*), які домінують в умовах Антарктичного півострова, практично не досліджені. Таксономічний статус пінгвінів дженту не є чітко визначеним. Деякі

автори визнають існування трьох підвидів (на основі морфометричних показників): південний (*Pygoscelis papua papua*), північний (*Pygoscelis papua ellsworthii*), до даного підвиду, вважається, належать особини пінгвінів проаналізованих популяцій о. Пітерманн та о. Лівінгстон [4], та східний (*Pygoscelis papua taeniata*) [5]. ДНК мікросателіти внаслідок високої варіабельності та селективної нейтральності є широковживаним знаряддям у популяційних та еволюційних дослідженнях [6]. Тому метою роботи було оцінити рівень поліморфізму пінгвінів за допомогою мікросателітних маркерів та визначити таксономічний статус пінгвінів дженту.

Об'єкт та методи досліджень. Зразки крові дженту були зібрані на острові Пітерманн – 65° 10' S та 64° 10' W, поблизу Української антарктичної станції "Академік Вернадський" (колишня британська "Фарадей", перейменована 6 лютого 1996 року), яка знаходиться на острові Галіндез – 65° 15' S та 64° 16' W, в районі півос-
© Драницина А., Телегесєв Г., Чумаченко І., Малюта С., 2008