

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що сенсibiliзація тварин кінською сироваткою змінює каріоцитометричні показники клітини.

Це, вірогідно, пов'язано з активацією метаболічних процесів. Так, при сенсibiliзації відбувається збільшення площі ядра з $24,46 \pm 1,97 \text{ мкм}^2$ у інтактних тварин до $27,49 \pm 2,69 \text{ мкм}^2$ (сенсibiliзованих) $P < 0,05$, що призводить до збільшення клітини в 1,3 рази. Застосування препаратів (тималіну й тимогену) збільшує площу ядра в 1,4 і 1,6 рази відповідно порівняно з показниками в сенсibiliзованих тварин, які не отримували препарати.

А це відповідно веде до адекватного збільшення площі клітини. Прийнято вважати, що об'єм ядра пропорційний вмісту в них ДНК [8]. Збільшення або ослаблення функціональної активності ядра відображається на кореляції між ДНК і об'ємом ядра.

Це положення підтверджується отриманими результатами. Як видно з табл. 1, збільшення вмісту

ДНК при сенсibiliзації впливає і на збільшення об'єму ядра клітини, така сама закономірність існує і при застосуванні препаратів тимуса на фоні розвитку сенсibiliзації. Таким чином, зміна об'єму ядра є важливим індуктором клітинної функції.

Наступним морфометричним показником активності Т-лімфоцитів є сумарна площа ядерця і кількість ядерця у клітині. Одна з основних якостей ядерця – мінливість морфометричних показників залежно від функціонального стану організму. Це зв'язано з виконанням ядерцями основних функцій синтезу клітинної РНК. Існує залежність між об'ємом ядерця й концентрацією в ній РНК, з одного боку, і кількістю РНК і білка в цитоплазмі, з іншого боку. Отже, розміри, кількість ядерця можуть бути показниками метаболічних процесів у клітинах, а також критерієм активності ділянок ДНК, кодуючих рибосомальні гени за кількісними показниками їхніх продуктів (9, 10).

Таблиця 1. Вплив тималіну й тимогену на морфометричні показники Т-лімфоцитів селезенки мурчаків при сенсibiliзації

N п/п	Площа клітин, мкм ²	Площа ядерця, мкм ²	Відношення площі ядра до площі клітини, відн. од.	Кількість ядерця	Сумарна площа ядерця, мкм ²	Відношення площі ядерця до площі ядра, відн. од.
Інтактні тварини	$37,03 \pm 3,25^*$	$24,46 \pm 1,97$	$0,66 \pm 0,02$	4	$3,27 \pm 0,24^*$	$0,14 \pm 0,02$
Сенсibiliзовані тварини	1	$46,92 \pm 3,71$	$27,49 \pm 2,63$	6	$4,09 \pm 0,28$	$0,15 \pm 0,03$
	2	$70,89 \pm 7,45$ $P_{1,2} < 0,05$	$38,78 \pm 4,33$ $P_{1,2} < 0,05$	7	$5,31 \pm 0,52$	$0,16 \pm 0,02$
	3	$76,71 \pm 8,33$ $P_{1,3} < 0,05$	$44,64 \pm 5,59$ $P_{1,3} < 0,05$	8	$5,31 \pm 0,52$	$0,16 \pm 0,02$

Примітки: 1 – тварини які не отримували препаратів; * – достовірність відмінностей між показниками в інтактній групі тварин. п. 1 – $P < 0,05$.

Як видно з табл. 1, при сенсibiliзації тварин збільшується кількість ядерця у Т-лімфоцитів, а також сумарна площа ядерця з $3,27 \pm 0,24 \text{ мкм}^2$ в інтактній групі тварин до $4,09 \pm 0,28 \text{ мкм}^2$ $P < 0,05$ у сенсibiliзованих тварин. Запровадження тимусних препаратів призводить до більшого збільшення сумарної площі ядерця. Так, застосування тималіну збільшує площу ядерця з $4,09 \pm 0,28 \text{ мкм}^2$ до $5,31 \pm 0,52 \text{ мкм}^2$, $P < 0,05$, тимогену – до $6,41 \pm 0,64 \text{ мкм}^2$, $P < 0,05$. Це взаємозалежно зі збільшенням кількості ядерця у клітині. Найбільш ефективним є тимоген.

Характер зміни морфологічних показників ядерця відповідає зміні РНК у клітині. Так, сенсibiliзація тварин кінською сироваткою призводить до збільшення сумарної площі ядерця Т-лімфоцитів в 1,3 рази й кількості РНК у 1,2 рази відповідно. Така сама закономірність і при застосуванні препаратів із тимуса (тималіну та тимогену).

Висновки. 1. Сенсibiliзація, викликана введенням конячої сироватки супроводжується зрушеннями в каріоцитометричних показників клітини.

2. Наслідком активації метаболізму клітин є зміна морфометричних показників ядра, ядерця і клітини. При цьому ядро й цитоплазма мають зміни алотропічного типу.
УДК 612.3.: 612.014.42:612.26

3. Препарати з тимуса при розвитку ГНТ змінюють: площу ядра, ядерця і клітини, ядерно-ядерцеві та клітинні відношення, кількість ядерця імунокомпетентних клітин, що призводить до проліферації та диференціації

4. Застосування тималіну та тимогену призводить до активації генетичного апарату клітини. А це у свою чергу активізує метаболізм Т-лімфоцитів. Найбільшим ефект має тимоген.

1. К.Ташке. Введение в количественную цитогистологическую морфологию. – Бухарест, 1980 г. 2. Hertwig R. Wechselverhältnisse von Kern und Protoplasma. – München, 1903. 3. Hartmann P. // Arch. Zellforsch. – 1921. – № 15. – Z. 1. 4. Korner F. // Z. mikr.-anat. Forsch. – 1937. – № 42. – Z. 81. 5. Hulten M. // Clin. Genet. – 1978. – № 14. – P. 294–296. 6. Zwite B. // Clin. exp. immunol. – 1973. – № 13. – P. 343–375. 7. Хесин Л.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. – М., 1967. 8. Таска К. Introducere in morfologia contitave citohistologia. – Bucurest, 1976. 9. Бурлакова Е.В., Заславский Ю.А., Шишкин Л.И. // Информ. биол. по радиобиол. – 1981. – № 24. – С. 18–20. 10. Булавка А.В., Васильев А.Н., Пастернак Н.Н. Количественная оценка реактивности кроветворных органов на облучение с использованием системы анализа изображений // Структурно-функциональные единицы и компоненты в органах висцеральных систем в норме и патологии: Тез. докл. научно-практ. конф. Харьков, 1–3 октября 1991 г. – Харьков, 1991. – С. 37.

Надійшла до редколегії 10.04.04

Н.М. Кургалюк, д-р. біол. наук, Г.М. Ткаченко, асп.,
В.К. Рибальченко, д-р біол. наук

НО-ЗАЛЕЖНІ ЕФЕКТИ ФУНКЦІОНУВАННЯ МІТОХОНДРІЙ МІОКАРДА ЩУРІВ ЗА УМОВ ІНТЕРВАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ ТА СТРЕСУ

Досліджено вплив попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну на функціонування мітохондрій міокарда, інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у крові й міокарді після курсу інтервальних гіпоксичних тренувань за умов стресу. З'ясовано, що стрес активує сукцинат-залежну компоненту АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда на фоні інтенсифікації процесів ліпопероксидації. Показано, що курс інтервальної гіпоксії з парентеральним введенням L-аргініну попереджує надмірну активацію процесів ліпопероксидації та виступає як важливий протекторний антистресовий чинник.

It was investigated the influence of nitric oxide precursor L-arginine on heart mitochondrial functional state, intensivity of processes of lipid peroxidation in blood and heart after intermittent hypoxia training at stress condition. It was shown that stress activate succinic-dependent component of ADP-stimulation respiration in mitochondria and intensify processes of lipid peroxidation. It made conclusion about intermittent hypoxia and L-arginine influence in processes of prevention excessively and lipid peroxidation processes activation and form protective effect at stress condition.

Вступ. Адаптація організму до змін умов існування пов'язана з NO-залежними ефектами функціонування мітохондрій (МХ) і продукцією активних форм кисню [5, 6, 8]. Фармакологічна корекція мітохондріальних дисфункцій, що виникають при надлишку катехоламінів за умов гострих стресових навантажень, засвідчена низкою експериментальних досліджень [2]. Одним з основних чинників значного протекторного ефекту методу інтервальної гіпоксії, як показали роботи останніх років, є виражене збільшення об'єму депо NO на фоні зростання потужності системи антиоксидантного захисту [1, 9]. Тому метою нашого дослідження було з'ясування впливу методу інтервальних гіпоксичних тренувань (ІГТ) і введення попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну на процеси мітохондріального дихання, окисного фосфорилування та інтенсивність ліпопероксидації в міокарді щурів за умов стресу.

Об'єкт і матеріали досліджень. Дослідження проведено на 30 щурах-самцях лінії Вістар масою 0,20–0,22 кг. Перед дослідженням тварин поділили на групи по 6 тварин у кожній. Групу I складала інтактні щури, яким перед дослідом вводили 1 мл фізіологічного розчину. Інших тварин поділили на дві підгрупи і використовували в досліді після курсу 14-денних ІГТ. Кожного дня за цей період тварин поміщали в камеру, яку по чергово впродовж 15-хвилинних інтервалів вентильовали газовою сумішшю з 10 % кисню в азоті та кімнатним повітрям. Кількість циклів була 5 на день. Щоденно за 30 хв до гіпоксичного тренування першій підгрупі тварин парентерально вводили 1 мл фізіологічного розчину (група II), а другій (група III) – 1 мл L-аргініну (600 мг/кг, "Sigma", США). З метою моделювання стресу щурів обох підгруп (групи IV і V) після 14-денного курсу ІГТ поміщали на 30 хв у камеру, заповнену водою (22 °C) із сіткою. Відстань від води до сітки в камері становила лише 5 см. Дослідження функціонального стану мітохондрій (МХ) міокарда та інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тварин після ІГТ проводили на наступну добу після останнього курсу адаптації.

Мітохондрії виділяли з міокарда методом диференціального центрифугування. Середовище виділення містило, ммоль/л: KCl – 180, 0,5 % БСА, HEPES – 10, рН 7,2. Дихання та окиснювальне фосфорилування (ОФ) у МХ вивчали полярографічним методом [3] з використанням закритого електрода Кларка і полярографа LP-7. Середовище інкубації містило ммоль/л: *trис*-HCl – 30, KCl – 125, NaCl – 10, KH_2PO_4 – 5, MgCl_2 – 1,5, EGTA – 3, рН 7,2. Як субстрати окиснення використовували 0,35 ммоль/л сукцинат натрію, 1 ммоль/л α -кетоглутарат натрію. Додатково проводили інгібіторний аналіз, який включав інгібітор сукцинатдегідрогена-

зи 2 ммоль/л малонат та інгібітор мітохондріального ферментного комплексу I (МФК I) 10 мкмоль/л ротенон. Додаток АДФ становила 200 мкмоль/л.

За отриманими полярограмами розраховували: стан відносного спокою (V_2), швидкість фосфорилуючого (в метаболічному стані 3 за Чансом, V_3) і контрольованого (у метаболічному стані 4, V_4) дихання МХ, дихальний контроль за Чансом (V_3/V_4), коефіцієнт ефективності фосфорилування АДФ/О, швидкість фосфорилування (V_ϕ) [7]. Інтенсивність процесів ПОЛ оцінювали за вмістом ТБК-реактивних продуктів у крові і тканині серця [4]. Концентрацію білка вимірювали за Лоурі [10]. Результати досліджень обробляли статистично, використовуючи критерій *t* Стюдента.

Результати та їх обговорення. Показано, що МХ міокарда тварин, які пройшли курс 14-денних гіпоксичних тренувань, характеризуються змінами основних параметрів функціонування при використанні основних субстратів окиснення циклу Кребса. Так, за умов окиснення СК вірогідно зростали величини ефективності окиснювального фосфорилування (АДФ/О) і спряженості процесів дихання й ОФ на 26,47 % і 20,95 % відповідно ($P < 0,05$) на фоні зниження швидкості фосфорилуючого дихання на 32 % ($P < 0,05$) (табл. 1). За умов окиснення КГЛ вірогідні зміни досліджено для величини АДФ/О: цей показник зростав на 19,92 % ($P < 0,05$).

Для МХ тварин, які пройшли курс адаптації до гіпоксії з парентеральним введенням попередника біосинтезу оксиду азоту L-аргініну, досліджено вірогідні зміни функціонування МХ міокарда для двох зазначених субстратів окиснення. Зокрема, при окисненні СК у тварин з введенням L-аргініну порівняно з групою тварин, яким препарат не вводили, показано достовірне підвищення швидкості фосфорилуючого дихання в активному стані (V_3) на 29,92 % ($P < 0,05$) із зниженням величини ефективності процесу ОФ на 12,79 %. Під час окиснення КГЛ за цих умов спостерігали вірогідне зростання як швидкості фосфорилуючого дихання на 135,5 % ($P < 0,001$), так і швидкості процесу фосфорилування на 104,71 % ($P < 0,001$). Зазначені зміни супроводжувалися зростанням величини дихального коефіцієнта за Чансом (V_3/V_4). Отже, модифікуюча роль методу адаптації до гіпоксії в інтервальному режимі полягає у змінах значень ефективності споживання кисню у разі використання основних субстратів циклу Кребса. Ці зміни пов'язані з цитохромоксидазою дихального ланцюга МХ [6] і поглиблюються при парентеральному введенні L-аргініну.

Таблиця 1. Зміни швидкості АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда щурів при адаптації до гіпоксії в інтервальному режимі під впливом парентерального введення L-аргініну і стресу у разі окиснення 0,35 ммоль/л сукцинату та 1 ммоль/л α -кетоглутарату. ($M \pm m$, $n=6$)

Умови досліджу	V_3 , нг ат О/хв·мг	Дихальний контроль, V_3/V_4	АДФ/О, мкмоль/л АДФ/нг ат О	V_ϕ , мкмоль/л АДФ/хв·мг
0,35 ммоль/л сукцинат				
Контроль	61,33 $\pm$ 5,12	2,53 $\pm$ 0,16	1,36 $\pm$ 0,01	83,41 $\pm$ 7,96

Група I				
ІГТ	41,71 ± 3,71*	3,06 ± 0,09*	1,72 ± 0,12*	71,75 ± 6,11
Група II				
ІГТ і L-аргінін	54,19 ± 4,19**	3,01 ± 0,12	1,50 ± 0,11	81,29 ± 7,36
Група III				
ІГТ і стрес	73,06 ± 5,53 [#]	3,17 ± 0,09	1,83 ± 0,07	133,70 ± 10,39 [#]
Група IV				
ІГТ, L-аргінін і стрес	122,16 ± 10,71 ^{###}	2,81 ± 0,11	1,14 ± 0,09 ^{###}	139,27 ± 11,22 ^{###}
Група V				
1 ммоль/л α-кетоглутарат				
Контроль				
Група I	36,24 ± 3,39	3,22 ± 0,21	2,36 ± 0,10	85,54 ± 7,06
Група II				
ІГТ	37,07 ± 4,22	3,60 ± 0,16	2,83 ± 0,11*	104,91 ± 10,31
Група III				
ІГТ і L-аргінін	87,30 ± 8,06**	3,90 ± 0,11	2,46 ± 0,14	214,76 ± 11,36**
Група IV				
ІГТ і стрес	69,69 ± 6,98 [#]	4,65 ± 0,21 [#]	2,07 ± 0,09 [#]	144,26 ± 12,61 [#]
Група V				
ІГТ, L-аргінін і стрес	140,48 ± 9,98 ^{###}	3,31 ± 0,16 ^{###}	2,09 ± 0,11	294,63 ± 16,69 ^{###}

Примітка: * – вірогідні зміни ($P < 0,05$) між ІГТ і контролем, ** – те саме між ІГТ з L-аргініном та ІГТ, [#] – між ІГТ і стресом та ІГТ, ^{###} – між ІГТ, L-аргініном і стресом та ІГТ і L-аргініном.

У тварин, які пройшли курс ІГТ, за умов стресу досліджено вірогідне зростання величини споживання кисню в активному фосфорилуючому стані органел при окисненні СК на 75,16 % і швидкості фосфорилування на 86,34 % ($P < 0,01$). Проте не досліджено вірогідного зростання величин ефективності ОФ і дихального коефіцієнту за цих умов. Окиснення КГЛ у щурів після курсу інтервальної гіпоксії за умов стресу супроводжувалося вірогідними змінами усіх досліджуваних показників, зокрема зростанням швидкості фосфорилуючого дихання на 88 % ($P < 0,01$), величини спряженості процесів дихання й ОФ на 29,17 % ($P < 0,01$) і швидкості фосфорилування на 37,51 % ($P < 0,01$), проте величина АДФ/О знизувалася на 26,86 % ($P < 0,01$).

Таким чином, стрес у щурів після курсу ІГТ характеризується зростанням значень фосфорилуючого дихання. При цьому зміна функціональних параметрів МХ міокарда супроводжувалася зростанням процесів економізації використання кисню. Показано, що останні через катехоламіни й активацію процесів ліпопероксидації модифікують енергосинтезуючі процеси в органелах [8]. Проте тільки за умов парентерального введення у курсі ІГТ щурам L-аргініну при окисненні СК досліджено зниження величини АДФ/О. При цьому зберігалися на високому рівні значення спряженості процесів дихання і фосфорилування та швидкості фосфорилування. Отже, структурна перебудова метаболічних шляхів функціонування МХ міокарда шляхом посилення економізації процесів використання кисню у процесах енергозабезпечення органел виступає протекторним чинником за умов стресу.

Для оцінки взаємокоригуючих впливів метаболічних шляхів у підтриманні функціонування МХ використовували інгібторний аналіз, який включав дослідження ротенончутливої компоненти (ротенон – інгібтор мітохондріального ферментного комплексу I) в окисненні СК і малонатчутливу компоненту в окисненні КГЛ. Малонат відомий як інгібтор потужного ферменту сукцинатдегідрогенази (СДГ), з функціонування якого дослідники пов'язують підвищення внеску у процеси споживання кисню дихальним ланцюгом МХ за екстремаль-

них впливів. Результати досліджень цієї серії експериментів наведено на рис. 1 (а, б).

Показано, що за умов стресу значно активується сукцинатчутлива компонента АДФ-стимульованого дихання на фоні зниження окиснення НАД-залежних субстратів. Парентеральне введення L-аргініну помітно підвищує роль НАД-залежних субстратів, КГЛ, зокрема у загальному метаболічному окисненні, оскільки саме малонат-, а не ротенончутлива компонента дихання зазнавала вірогідного зниження у процесі ІГТ і стресу. Отже, посилення ролі НАД-залежних субстратів в окисненні виступає ведучим чинником формування ефектів оксиду азоту як за умов курсу ІГТ, так і додаткової метаболічної корекції з використання попередника його біосинтезу.

Застосований нами метод стресу призводив до значної інтенсифікації процесів ліпопероксидації, що оцінювали за концентрацією ТБК-реактивних продуктів у міокарді та крові (рис. 1, в, г). Активація процесів ПОЛ зумовлена збільшенням під впливом наростаючої концентрації катехоламінів інтенсифікацією процесів споживання кисню мітохондріями, однак не підтримується належним рівнем системи антиоксидантного захисту. Тварини після курсу ІГТ з уведенням L-аргініну за умов стресу характеризуються нижчим показником інтенсивності процесів ліпопероксидації і зростаючою роллю НАД-залежного окиснення у функціонуванні МХ міокарда відносно величин у тварин без уведення L-аргініну. Відомо, що саме посилення NO-ергічної ланки, яка здатна функціонувати як унікальна стрес-лімітуюча система на етапах короткочасної та довготривалої адаптації, індукується сеансами ІГТ [1].

Літературні дослідження засвідчують участь NO-залежних механізмів у розвитку стрес-реакції. Інтенсивність останньої визначена співвідношенням активації стрес-системи, яка реалізує реакцію організму на стресовий чинник, і активацію стрес-лімітуючих систем, що можуть обмежувати надмірну активацію стрес-системи і, відповідно, ушкоджуючу дію стрес-гормонів на мітохондріальному рівні.

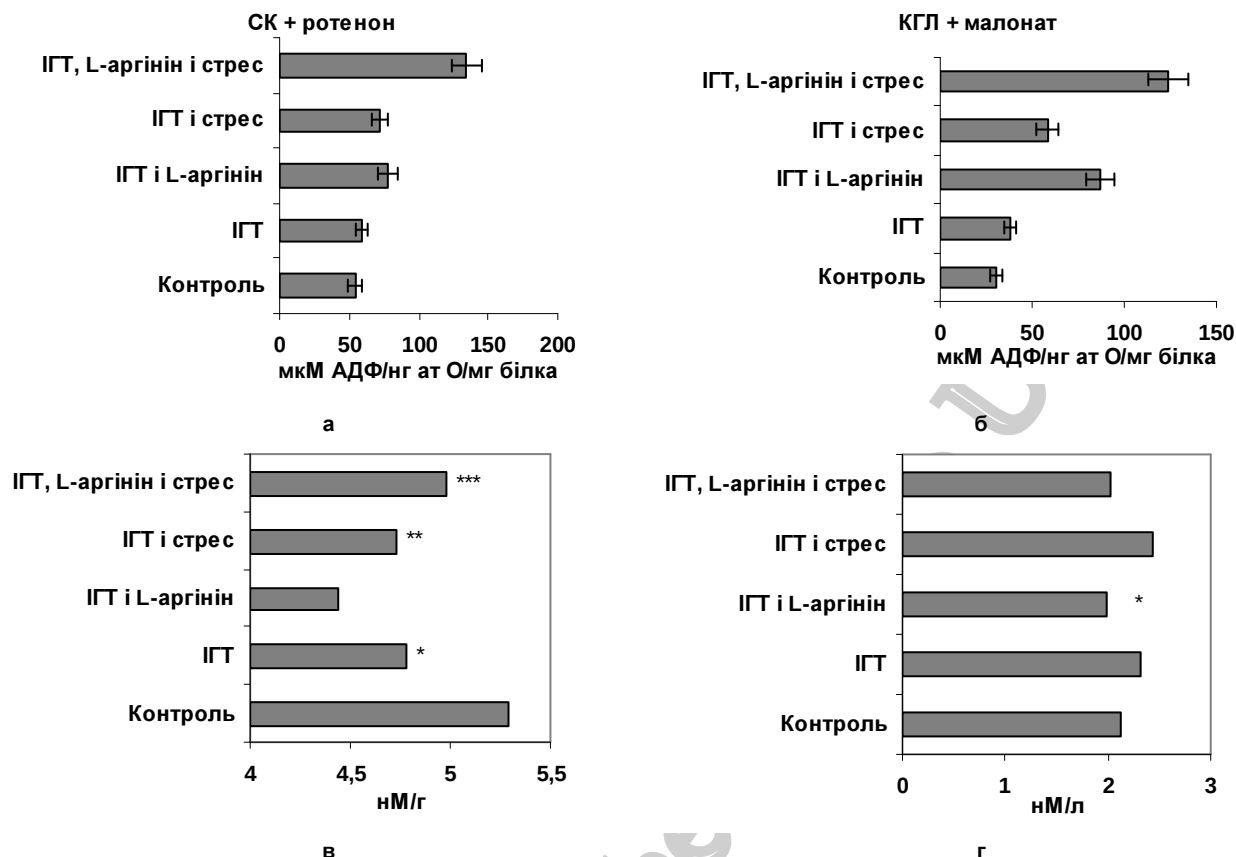


Рис. 1. Ротенончутлива компонента окиснення сукцинату (а) і малонатчутлива компонента окиснення α -кетоглутарату (б) показника АДФ-стимульованого дихання мітохондрій міокарда, вміст ТБК-активних продуктів у міокарді (в) і крові (г) щурів за умов інтервального гіпоксичного тренування (ІГТ), ІГТ з уведенням L-аргініну та стресу

Висновки. Таким чином, адаптація до гіпоксії в інтервальному режимі, знижуючи інтенсивність процесів ліпопероксидації та ушкодження функціонування мітохондріальних мембран шляхом економізації процесів використання кисню, виступає важливим протекторним чинником й опосередковується оксидом азоту.

1. Кураалюк Н.Н. // Успехи физиол. наук. – 2002. – Т. 33, № 4. – С. 65–79.
2. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. – М., 1998.
3. Чекман Т.С., Горчакова Н.О., Рибальченко В.К. та ін. // Га-

- лицький лікар вісн. – 2000. – № 2. – С. 8–11.
4. Тимирбулатов Т.А., Селезнев С.И. // Лаб. дело. – 1988. – № 4. – С. 209–211.
5. Bredt D.S., Snyder S.H. // Ann. Rev. biochem. – 1994. – Vol. 63. – P. 175–195.
6. Brown G. // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1411, № 2–3. – P. 351–369.
7. Chance B., Williams G. // Adv. Enzymol. – 1956. – Vol. 17. – P. 65–134.
8. Halliwell B., Gutteridge J. Free radical in biology and medicine. – Oxford, 1989. – P. 543–555.
9. Kurhalyuk N., Ikkert O., Halkiv M. et al. // Aminoacids and their derivatives in biology and medicine. – Grodno, 2001. – P. 65–66.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 575

А.С. Драницина, асп.,
Г.Д. Телегесв, канд. біол. наук, М.В. Дибков

МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ДНК: МАРКЕРИ RAPD І МІНІСАТЕЛІТИ

Узагальнено літературні дані, отримані при вивченні поліморфізму ДНК за допомогою таких молекулярно-генетичних маркерів: мінісателітів і маркерів RAPD. Відмічено сфери застосування даних ДНК-маркерів, розглянуто обмеження їхніх можливостей при аналізі генетичних процесів у популяціях.

In the present paper literature data obtained during studying of DNA polymorphism by the following molecular-genetic markers: minisatellites and RAPD-markers have been summarized. Fields of application of these DNA-markers were designated and limitations of their possibilities were considered in analysis of genetic processes in populations.

Новий клас генетичних маркерів з'явився в середині 1980-х років після відкриття поліморфізму ДНК завдяки розвитку методів виділення, клонування та розрізання (рестрикції) генів. Вирішальну роль у становленні й розвитку "нової генетики" зіграло відкриття полімеразної ланцюгової реакції. На сьогодні поліморфізм ДНК знайдено в мітохондріальній та ядерній ДНК, у кодуючих

і некодуючих ділянках останньої, в їхніх унікальних послідовностях і в тих, що повторюються [1].

За допомогою методу ампліфікації випадкових фрагментів ДНК, або ампліфікації ДНК з одиничним випадковим праймером (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (він ще має інші, менш популярні, назви: AP-PCR (від Arbitrary Primers – PCR) і DAF (від DNA Amplified