

ведення гормонів у кров, про що свідчить колоїд, який вміщує резорбційні вакуолі. Виявлені вище морфологічні зміни у структурі щитовидної залози узгоджуються з реакцією нейросекреторних клітин ПВЯ гіпоталамусу. Вірогідні зміни відмічені у структурі нейроцитів ПВЯ гіпоталамусу, а саме – статистично достовірне збільшення розміру ядер нейроцитів ПВЯ порівняно з контролем (табл.1). Це свідчить про те, що нейросекреторні

клітини ПВЯ гіпоталамусу знаходяться у стані підвищеної функціональної активності, активно синтезують і виводять нейrogормони. На підставі даних про реакцію тироцитів щитовидної залози та нейроцитів гіпоталамусу можна зробити висновок, що при імунізації птахів на 7 добу гіпоталамо-тиреоїдна система характеризується гіперфункцією. Це співпадає з даними літератури про розвиток імунної реакції [8, 9].

Таблиця 1. Зміни діаметру ядер тироцитів, висоти секреторного епітелію та внутрішнього діаметру фолікулів щитовидної залози, та діаметру нейроцитів ПВЯ гіпоталамусу у птахів 5-тижневого віку (мкм)

Вимірюваний параметр	Група/час після імунізації	1-ша доба	3-тя доба	7-ма доба	9-та доба
Висота секреторного епітелію щитовидної залози, мкм	контроль	5,70 ± 0,15	6,01 ± 0,12	5,39 ± 0,11	5,07 ± 0,10
	контроль+імунізація	5,47 ± 0,11	5,86 ± 0,15	8,18 ± 0,19*	7,29 ± 0,17*
Внутрішній діаметр фолікулів, мкм	контроль	21,24 ± 0,94	19,69 ± 0,74	23,99 ± 0,83	23,37 ± 1,05
	контроль+імунізація	21,78 ± 0,84	26,15 ± 0,95*	27,03 ± 0,87*	25,70 ± 0,77*
Діаметр ядер тироцитів, мкм	контроль	3,85 ± 0,45	3,84 ± 0,53	4,04 ± 0,38	3,84 ± 0,37
	контроль+імунізація	4,07 ± 0,49	4,10 ± 0,45*	4,17 ± 0,45*	4,07 ± 0,42
Діаметр нейроцитів ПВЯ	контроль	4,33 ± 0,07	4,10 ± 0,09	3,90 ± 0,09	4,55 ± 0,09
	контроль+імунізація	5,06 ± 0,07*	4,27 ± 0,09	7,17 ± 0,19*	6,14 ± 0,14*

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем.

Результат імунізації птахів на 9 добу. На підставі аналізу одержаних даних встановлено, що у птахів, які піддавались імунізації, на 9 добу висота секреторного епітелію та діаметр фолікулів щитовидної залози достовірно збільшені порівняно з контролем (таб.1), але менші за аналогічні показники на 7-му добу після імунізації. Слід зазначити, що тироцити, якими вислані фолікули, мають у більшості випадків пласку форму. У колоїді мало резорбційних вакуолей. Отже, щитовидна залоза птахів цієї серії досліду характеризується поступовим зниженням функціональної активності порівняно з попередньою групою, хоча ця активність залишається більшою, ніж у контрольній групі. Вимірювання діаметру ядер нейроцитів ПВЯ гіпоталамусу показало достовірне збільшення цього показника порівняно з контролем, але зменшення порівняно з попередньою групою (групою 7-ої доби). Це свідчить про поступове пригнічення синтетичної активності в нейроцитах ПВЯ гіпоталамусу. Одержані нами дані узгоджуються з реакцією щитовидної залози, де виявлені ознаки депонування гормонів та зниження їх синтезу порівняно з групою 7-ої доби. У цілому можна заключити, що імунізація птахів через 9 днів призводить до зниження функціональної активності гіпоталамо-тиреоїдної системи. Можливо, це пояснюється виснаженням функціональних резервів гіпоталамо-тиреоїдної системи.

Висновки. 1. Імунізація призводить до активації щитовидної залози статевозрілих птахів, пік функціональної активності якої припадає на 7-му добу після імунізації. 2. На 7-му добу у імунізованих тварин спостеріга-

ється достовірне збільшення діаметру ядер тироцитів, висоти секреторного епітелію, внутрішнього діаметру фолікулів щитовидної залози та діаметру нейроцитів ПВЯ гіпоталамусу, що вказує на підвищення синтетичної та секреторної активності щитовидної залози і гіпоталамусу. 3. Встановлено синхронне підвищення активності щитовидної залози та гіпоталамусу. Максимальна активність нейроцитів ПВЯ гіпоталамусу співпадає у часі з максимальним збільшенням активності ядер тироцитів, збільшенням висоти секреторного епітелію і внутрішнього діаметру фолікулів.

1. Држевецкая И.А. Основы физиологии обмена веществ в эндокринной системе. – М., 1994. 2. Балаболкин М.И. Эндокринология. – М.: Универсум публшинг, 1998. – с.24-30, 57-63. 3. Воронін К.Ю. Участь моноаминів у нейроендокринній регуляції гіпоталамо-адrenalової, -тиреоїдної та гонадної систем птахів (гістофізіологічний аналіз). Автореф. дис... канд. біол. наук: 14.03.09/ Київський національний університет імені Тараса Шевченка. – К., 2001. – 19 с. 4. Дзержинський М.Е. Нейроендокринна регуляція сезонного циклу розмноження птахів. – К.: Сільгоспосвіта, 1996. – 282 с. 5. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. – СПб.: ИКФ Фолиант, 2001. – 160 с. 6. Чипенс Г.И. Исследование афферентных механизмов взаимодействия нервной и иммунной систем // Иммунофизиология / Е.А. Корнева (ред.). – СПб.: Наука, 1993. – С. 635-656. 7. Pierpaoli W., Regelson W. Cud melatonin. – Lodz: Amber, 1996. – 199s. 8. Markowska M., Bialecka B., Ciechanowska M., Koter Z., Laskowska H., Karkucinska-Wieckowska A., Skwarlo-Sonta K. Effect of immunisation on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland // Neuroendocrinology letters. – 2000. – V. 21. – P. 367-373. 9. Markowska M., Waloch M., Skwarlo-Sonta K. Melatonin inhibits PHA-stimulated chicken lymphocyte proliferation in vitro // J. Pineal. Res. – 2001. – V.30., №4. – P. 220-226.

Надійшла до редакції 16.09.09

УДК 577. 543. 426

А. Майданюк, канд. біол. наук

ФЛУОРИМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ КОНЦЕНТРАЦІЇ АТР ЗА ДОПОМОГОЮ 3-ГІДРОКСИ-4-ДИМЕТИЛАМІНОФЛАВОНУ

Наведено мініметод спектрофлуориметричного визначення концентрації АТР у розчині.

The minimethod for fluorimetric assays of ATP has been developed.

Вступ. Розробка нових методів дослідження часто приводить до появи нових напрямків в біохімічній практиці. Так і відбулося у випадку флуоресцентних зондів. Це в першу чергу пов'язано з можливістю проведення за допомогою набору флуорохромів комплексного та кількісного аналізу структури і різних сторін метаболізм-

му живих клітин [2]. Цілий ряд речовин, здатних до флуоресценції, як внутрішньоклітинної природи так і ті, які вводяться в клітини зовні, мають здатність відповідати змінам параметрів власної флуоресценції на зміну фізико-хімічних властивостей середовища [2]. Завдяки цьому появилася можливість слідувати за такими па-

раметрами клітини, як електричний потенціал на мембрані, концентрація протонів і кальцію, в'язкість ліпідного біслою, рухомість компонентів плазматичних мембран і її проникність, клітинна життєздатність, вміст деяких внутрішньоклітинних сполук, наприклад АТФ [3, 5]. Число синтезованих флуорохромів постійно зростає, що дає змогу вивчати нові ланки клітинного метаболізму. В останні роки все більш активно флуорохромии використовуються для дослідження клітинних суспензій і навіть клітин. Такий підхід стає успішним завдяки розвитку мініфлуориметричної техніки. Важливою перевагою мініфлуориметричного методу являється те, що для проведення досліджень необхідна мінімальна кількість біологічного матеріалу. Це особливо важливо в умовах коли, по тим чи іншим причинам, кількість його обмежена, наприклад у випадку роботи з суспензіями клітин (тимоцитів).

Метою даної роботи було розробити мініметод флуориметричного визначення концентрації АТФ у розчинах за допомогою флуоресцентного зонду-3-гідрокси-4'-диметиламінофлавоу.

Об'єкт та методи досліджень. Аденозин-5'-трифосфатної кислоти динатрієва сіль (АТФ) виробництва фірми Reanal (Угорщина), 3-гідрокси-4'-диметиламінофлавоу (Україна). Визначення концентрації АТФ у стандартних розчинах спектрофотометричним методом проводили з мінікюветою об'ємом 500 мкл на спектрофотометрі Sinco SUV-2120 (Германія), спектрофлуориметричним мініметодом із використанням мінікювети об'ємом 100 мкл на спектрофлуориметрі RF-510 фірми Shimadzu (Японія).

Результати та їх обговорення. Серед методів кількісного аналізу в біохімії домінує місце займає спектрофотометрія у видимій та ультрафіолетовій області спектра. Проте все більш суттєвого значення набувають спектрофлуориметричні методи аналізу. В той же час, використання спектрометрії для визначення малих концентрацій пов'язано з створенням спеціальної техніки, так як в спектрофотометрії безпосередньо вимірюваною величиною являється оптична густина, а її величина визначається кількістю речовини на одиницю площі. Таким чином, основний вигаш в підвищенні чутливості може бути досягнутим за рахунок зменшення геометричних розмірів системи детекції, а в зниженні об'єму проб для аналізу – зменшення геометричних розмірів кювети. На рис. 1 приведено конструкцію мінікювети для мініфлуориметричного аналізу проб об'ємом 100 мкл. Якщо в макроваріанті флуориметричного методу об'єм проб, необхідний для аналізу – 2000 мкл, то для мініваріанту достатньо 200 мкл. Тобто, використання мінікювети приводить до зменшення в 10 разів необхідних для аналізу речовин.

Показано [5] здатність флуоресцентного зонду – 3-гідрокси-4'-диметиламінофлавоу утворювати комплекс з АТФ при цьому зміщується смуга поглинання (ex) з 405 – 410 нм на 470 – 480 нм, а максимум випромінювання (em) залишається сталим (540 – 555 нм), проте зростає інтенсивність флуоресценції (em) за збудження (ex) на 480 нм при збільшенні концентрації АТФ [3, 4]. Ефект зсуву смуги збудження є високоспецифічним для АТФ і не проявляється з іншими нуклеозидтрифосфатами [5].

Ми використали цю особливість флуоресцентного зонду для визначення залежності відносних параметрів флуоресценції від концентрації АТФ з метою побудови калібрувальних графіків. Відношення інтенсивностей емісії при збудженні на 480 нм та 410 нм ($I_{f,480}/I_{f,410}$) і з врахуванням флуоресценції контрольних проб (без АТФ) ($I_{f,i}/I_{f,0,480}/I_{f,i}/I_{f,0,410}$) та відношення випромінювання флуоресценції проб до контролю за збудження на 480 нм ($I_{f,i}/I_{f,0,480}$) визначали за ординату (Y), а концентрацію АТФ за ось абсцис (X).

Для одержання числових значень флуоресценції брали мінікювету об'ємом 100 мкл, а визначенні значення використовували для розрахунку коефіцієнтів рівняння лінійної регресії та коефіцієнта кореляції (r) за [1]. Математично коректними уважали значення $r > 0,8$. Одержані результати наведено в табл. 1.



Рис. 1. Мінікювета для флуориметричного аналізу

Як показали наші дослідження (Табл. 1) за мініваріанту спектрофлуориметричного методу залежність відносних параметрів флуоресценції зонду 3-гідрокси-4'-диметиламінофлавоу від концентрації АТФ (в логарифмічних координатах) є лінійною про що явно свідчать високі значення розрахованих коефіцієнтів кореляції (0,99). Похибка методу при цьому не перевищує 5–10%.

Таблиця 1. Концентрації АТФ визначені спектрофлуориметричним мініметодом (n = 7)

Задана концентрація АТФ, мкмоль/л				
10	100	250	500	750
Визначена концентрація АТФ, мкмоль/л				
СФ – методом		$y = E_{260-290}$		$X = [C] \text{ мкмоль/л}$
9,50	100,05	250,04	499,93	749,81
Фл – мініметодом		$y = I_{f,i}/I_{f,0,480}$		$X = \lg[ATP], \text{М}$
10,72	108,46	252,57	524,32	659,77
Фл – мініметодом		$y = I_{f,480}/I_{f,410}$		$X = \lg[ATP], \text{М}$
10,56	107,32	250,31	485,17	709,78
Фл – мініметодом		$y = I_{f,i}/I_{f,0,480}/I_{f,i}/I_{f,0,410}$		$X = \lg[ATP], \text{М}$
9,95	100,31	250,06	494,94	749,65

Висновки. Установлено, що при застосуванні мініваріанту спектрофлуориметричного методу залежність досліджених параметрів флуоресценції зонду

3-гідрокси-4'-диметиламінофлавоу від $\lg[ATP]$ в діапазоні концентрацій 10^{-5} – $7,5 \times 10^{-4}$ М є лінійною. Похибка мініметоду – 5–10%.

1. Войццикий В.М., Бабенюк Ю.Д., Рудич В.В., Марченков Ф.С. Общие принципы организации биохимических исследований. – К., 1989. – 40 с. 2. Владимиров Ю.Д., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М. Наука. 1980 – 320 с. 3. Майданюк А., Матишевська О., Пивоваренко В. Чутливий спектрофлуориметричний метод кількісного визначення АТФ // Вісн. Київ. ун-ту. ім. Т. Шевченка. Біологія – 2006. – Вип. 47-48. – С. 16-18. 4. Патент на

винахід №75448 UA. Спосіб флуориметричного визначення концентрації аденозин -5'-трифосфату (АТФ) у розчині / Пивоваренко В.Г., Вадзюк О.Б., Костерін С.О. Заявл. 15. 03. 2004., Опубл. 17.04.2006., Бюл. №4. 5. Pivovarenko V.G., Vadzyk O.B., Kosterin S.O. Fluorometric detection of adenosine triphosphate with 3-hydroxy-4-(dimethylamino) flavones in aqueous solutions // Journal of Fluorescence.- 2006 – V. 16. №1 – P. 9-15.

Надійшла до редакції 08.06.09

УДК 599.742

Г. Романюк, асп.

ВПЛИВ ТРОФІЧНОЇ СТРАТЕГІЇ НА СТРУКТУРУ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ У ПРЕДСТАВНИКІВ РЯДУ CARNIVORA

Проведено морфо-функціональний аналіз щелепного апарату деяких представників ряду Carnivora у зв'язку з трофічною спеціалізацією. Наше дослідження вивчає вплив механічних навантажень і трофічної поведінки на певні параметри нижньої щелепи.

Morpho-functional analysis of jaw apparatus of certain specimens of the Carnivora in view of trophic specialization are discussed. This investigation research affect of different feeding behaviours on morpho-functional features of jaw apparatus.

Вступ. Хижі представники ряду Carnivora живляться переважно хреботною здобиччю. При цьому вони стикаються з рядом проблем, пов'язаних з захватом, вбивством та подрібненням здобичі, що спричиняють навантаження на жувальний апарат хижаків. Різні трофічні стратегії впливають на черепно-лицьовий скелет ссавців і форму окремих кісток в ньому. Дослідивши зв'язок морфо-функціональних параметрів жувального апарату з трофічною спеціалізацією тварин можна передбачити його принципові функціональні можливості, що може бути використане в палеозоології та для цілої систематики. В цьому і полягає актуальність даної роботи. Метою цього дослідження є встановити як механічні навантаження та трофічна стратегія впливають на певні параметри нижньої щелепи різних представників ряду Carnivora. Для цього нижня щелепа моделювалася як консольна балка, що дозволяє аналізувати зуби чи конструкцію щелепи, використовуючи стандартні технічні принципи опору балки. Згин – головне слідство навантажень на тіло нижньої щелепи під час обробки їжі. Під впливом зовнішніх навантажень змінюється структура, форма і хімічний склад кістки. Для того, щоб протистояти навантаженням (збільшити опір при згині) кількість кісткової тканини повинна збільшуватися в площині дії навантаження [1].

Об'єкти та методи дослідження. Досліджувалися нижні щелепи 24 видів ряду Carnivora: 9 видів родини Canidae, 6 видів родини Felidae, 8 видів родини Mustelidae, 1 вид родини Hyaenidae (Crocuta crocuta).

Так як опір при згині характеризується формою поперечного перетину кістки і розподілом кісткової тканини відносно нейтральної осі, були визначені моменти опору поперечного перетину (Z) для вибраних міжзубних проміжків вздовж тіла нижньої щелепи. Z_x і Z_y – моменти опору поперечного перетину відносно медіолатеральних (x) та дорзовентральних (y) осей відповідно. Різниця в Z_x і Z_y відображають різниці в прикладених згинаючих моментах сил в сагітальних та поперечних площинах відповідно. На тілі нижньої щелепи (далі

ТНЩ) були ідентифіковані такі міжзубні проміжки: між P_3 та P_4 та між P_4 та M_1 (далі PP та PM, відповідно); у собачих та куницевих був виміряний також проміжок між M_1 та M_2 (далі MM). В кожному міжзубному проміжку були виміряні зовнішні діаметри ТНЩ. Висота ТНЩ (D_y) була взята як максимальна сагітальна відстань між вентральною та дорзальною стороною тіла; ширина тіла (D_x) – як максимальна буколінгвальна ширина тіла. Оскільки гілка нижньої щелепи та масетерна ямка у деяких родин (котячі, гієнові) знаходяться близько до M_1 , то відповідна область не розглядалася в цих родин. Довжини робочої і балансууючої сторони плеча важеля вимірювалися у родин, які пристосовані до розгризання кісток (собачі і гієнові). Довжина робочої сторони плеча важеля (РСПВ) вимірювалася як відстань від центра обертання виросткового відростка нижньої щелепи (ВВ) до міжзубного проміжку PM (у собачих) або MM (у гієнових). Довжина балансууючої сторони плеча важеля (БСПВ) вимірювалася як відстань від відповідного міжзубного проміжку (PM для собачих, MM для гієнових) до міжзубного проміжку між I_3 та нижнім іклом. Були виміряні також такі показники як ширина нижньої щелепи (ШНЩ) та довжина нижньої щелепи (ДНЩ). Всі виміряні параметри нижньої щелепи розглядалися по відношенню до довжини нижньої щелепи.

Результати та їх обговорення. Середні значення відношень висоти і ширини ТНЩ до довжини нижньої щелепи у різних міжзубних проміжках наведені у таблицях 1 та 2 відповідно.

Значення висоти нижньощелепного тіла відображає відносне значення навантаження в сагітальній площині, яке може бути пов'язане з тривалими навантаженнями при вбивстві здобичі або розгризанні твердої їжі. Збільшена ширина відображає поперечні навантаження, які виникають, наприклад, при утриманні здобичі, що чинить опір.

Таблиця 1. Середні значення відношень висоти тіла нижньої щелепи (D_y) до довжини нижньої щелепи (ДНЩ) в міжзубних проміжках: між P_3 і P_4 (PP), P_4 і M_1 (PM) та M_1 і M_2 (MM) в різних родин ряду Carnivora

	$D_{yPP}/ДНЩ$	$D_{yPM}/ДНЩ$	$D_{yMM}/ДНЩ$
собачі	0,141± 0,01	0,153 ± 0,01	0,162 ± 0,02
котячі	0,193± 0,01	0,196 ± 0,01	-
куницеві	0,170± 0,02	0,162± 0,02	0,193± 0,02
гієна	0,203	0,234	-