

Whaley K.J. et al. Acid Production by Vaginal Flora In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification // *Infection and Immunity*. - 1999. - V. 67. - № 10. - P. 5170-5175. 4. Galask R.P. Vaginal colonization by bacteria and yeast // *Am.J.Obstet.Gynecol.* - 1988. - V. 158. - P. 993-995. 5. Ozkinay E., Terek M.C., Yayci M. et al. The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections // *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. - 2005. - V. 112. - P. 234-240. 6. Sullivan A., Fianu-Jonasson A., Landgren B. et al. Ecological Effects of Preorally Administered Pivmecillinan on the Normal Vaginal Microflora // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2005. - Vol. 49. - № 1. - P. 170-175. 7. Kirkman R., Chantler E. Contraception and the prevention of sexually transmitted diseases // *Br Med Bull.* - 1993. - 49. - P. 171-181.

8. Інформація для пацієнта з використання препарату Еротекус (листоукладки). - Наказ Міністерства охорони здоров'я України 27.10.00 № 270. - Реєстраційне посвідчення № Р. 10.00/02443. 9. Министерство здравоохранения СССР. Приказ № 535 от 22 апреля 1985 г. "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений". - Москва, 1985. 10. Потапенко Н.Г., Савлук О.С., Иллешенко В.А. Сочетанное действие УФ-излучения ($\lambda=254$ нм) и ионов меди и серебра на выживаемость *E. coli* // *Химия и технология воды* - 1992. - Т. 14. - № 12. - С. 935-40. 11. Youd I.P. Quantity and quality in the diagnosis of urinary tract infection // *Brit. J. Urol.* - 1965. - V. 37. - № 1. - P. 7-12.

Надійшла до редколегії 20.11.06

УДК 576.08

К. Афанасьєва, канд. біол. наук, Т. Шувалова, студ.
М. Зажицька, студ., А. Сиволоб, д-р біол. наук

ШВИДКІСТЬ ВИХОДУ ДНК ПРИ НЕЙТРАЛЬНОМУ ТА ЛУЖНОМУ ЕЛЕКТРОФОРЕЗІ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН

Продemonстровано вплив топологічного стану петельних доменів на швидкість виходу ДНК при нейтральному та лужному кометному електрофорезі ізольованих клітин. Зроблені висновки, що хвіст комети в інтактних клітинах формується розгорнутими петлями ДНК, і що реєстрація кінетики появи комет є необхідним елементом експериментів по кометному електрофорезу.

Effects of the topological state of loop domains on the rate of DNA exit during neutral and alkaline comet assay have been demonstrated. The conclusions have been made that the comet tail of intact cells consists of the extended DNA loops, and that the kinetic measurements have to be a necessary step in the experiments using the comet assay.

Вступ. Кометний електрофорез є зручним і, відповідно, надзвичайно популярним методом оцінки рівня пошкоджень ДНК в окремих клітинах. Сутність методу полягає в тому, що ізольовані клітини заплываються в агарозу на поверхні предметного скла, піддаються лізису з метою видалення мембран та зв'язаних з ДНК білків (при збереженні зв'язку ДНК з ядерним матриксом), після чого здійснюється електрофорез [1-3]. Під дією електричного струму ДНК виходить із клітини та формує зону, що нагадує хвіст комети. Численні експерименти свідчать про те, що вихід ДНК полегшується – а за думкою багатьох авторів, взагалі стає можливим – після дії пошкоджуючих чинників (таких, як, наприклад, іонізуюче випромінювання). Існує два варіанти кометного електрофорезу: у буфері з нейтральним рН (нейтральний електрофорез) та при рН 13 (в умовах денатурації ДНК – лужний електрофорез). Останній варіант вважається більш чутливим і використовується частіше [4].

Незважаючи на популярність методу, на сьогодні немає єдиної думки про те, якою є природа ДНК, що міститься у хвості комети. Найбільш привабливою видається та інтерпретація, що причиною полегшення виходу ДНК є релаксація надспіральных петельних доменів ДНК, закріплених на ядерному матриксі, у результаті одноланцюгових розривів (достатньо одного розриву на петлю). Тобто, хвіст комети – це релаксовані петлі ДНК [1, 5, 6]. Але накопичення одноланцюгових розривів має призводити до появи розривів дволанцюгових – відповідно, у хвості комети можуть міститися також (або тільки) лінійні фрагменти ДНК, що зберігають або втратили зв'язок з матриксом [1, 5, 6].

Іншою проблемою є значна варіабельність результатів, отриманих різними лабораторіями. Більшість дослідників застосовує лужний варіант кометного електрофорезу: оскільки лужне середовище сприяє розривам ДНК в сайтах апуринізації, вважається, що це дозволяє збільшити число типів пошкоджень, які можна детектувати. При цьому використовуються різноманітні комбінації часу інкубації клітин після лізису у лузі (зазвичай від 20 до 40 хв) та часу електрофорезу (від 20 до 60 хв) [3]. Можливо, що саме методична варіабельність призводить до значних розбіжностей у результа-

тах при дослідженнях дії мутагенів та спробах прогнозування деяких захворювань [3].

Наші експерименти були спрямовані на вивчення впливу топологічного стану петельних доменів (при нейтральному електрофорезі) та часу інкубації у лузі (при лужному електрофорезі) на ефективність виходу ДНК. Отримані результати дозволяють, по-перше, вдосконалити методику кометного електрофорезу шляхом реєстрації кінетики виходу ДНК замість використання фіксованого часу електрофорезу. На нашу думку, саме такий підхід є одним зі шляхів стандартизації методу, оскільки знімає питання про вибір того чи іншого часу електрофорезу та дозволяє уникнути хибних висновків. По-друге, ми отримали прямий доказ релаксації петельних доменів як головної причини полегшення виходу ДНК – принаймні, при нейтральному електрофорезі. По-третє, у випадку лужного електрофорезу продемонстровано вплив часу інкубації у лузі на ефективність появи комет. Обговорюються перспективи використання кометного електрофорезу як у його традиційному застосуванні, так і для вивчення деяких фундаментальних питань молекулярної генетики.

Об'єкт та методи досліджень. Для кометного електрофорезу використовували лімфоцити периферичної крові людини. 50 мкл суспензії лімфоцитів змішували зі 100 мкл 1%-го розчину легкоплавкої агарози, 25 мкл суміші наносили на предметні скельця, заправлені в 1%-му розчині тугоплавкої агарози. Отримані слайди витримували 3-5 хв при температурі 4°C і занурювали в лізуючий буфер: 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (рН 8,0), 1% Triton X-100, який додавали безпосередньо перед використанням буфера. Лізис проводили при 4°C не менше двох годин.

Нейтральний електрофорез проводили у TBE буфері (0,089M Tris, 0,089M H₃BO₃, 0,002M EDTA, рН=7,5) у присутності чи відсутності певної невеликої концентрації бромистого етидія (БЕ). Після лізису слайди відмивали електрофоретичним буфером та інкубували в ньому 10 хв.

Лужний електрофорез проводили у 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, рН >13. Після лізису слайди інкубували в цьому буфері протягом 10-60 хвилин при 4°C. Після

електрофореzu слайди тричі відмивали у нейтралізуючому буфері (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5).

Тривалість електрофореzu становила від 10 до 80 хв. з інтервалом 10 хв. Електрофорез проводили при 4°C, напрузі 1 V/cm та силі струму 300 mA. Препарати фарбували бромистим етидієм та аналізували під флуоресцентним мікроскопом, визначаючи частку комет серед принаймні 100 клітин.

Результати та їх обговорення. Нейтральний електрофорез. У випадку виходу ДНК у хвіст комети після електрофореzu клітини виглядають під флуоресцентним мікроскопом, як показано на рис. 1.

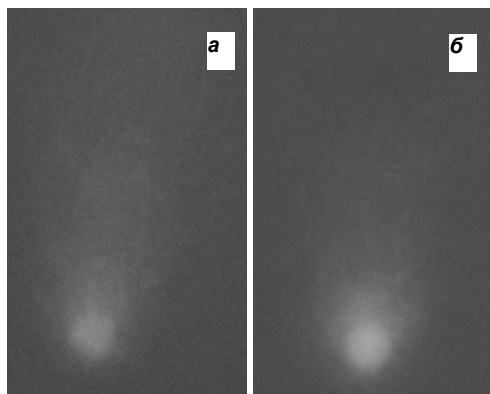


Рис. 1. Приклади клітин із кометами після нейтрального (а) та лужного (б) електрофореzu протягом 30 хв.

Частка клітин із такими хвостами, яку далі будемо називати часткою комет, залежить від тривалості електрофореzu. На рис. 2 представлено цю залежність для двох варіантів електрофореzu – нейтрального (рис. 2а) та лужного (рис. 2б).

У відсутності БЕ частка комет зберігається на низькому рівні до 30 хв електрофореzu, після чого починає зростати і становить практично 100% через 60 хв і більше. У пробному експерименті після рентгенівського опромінення клітин (доза 0,25 Гр) частка комет виходить майже на 100% рівень вже через 30 хв електрофореzu (рис. 2а). Це дозволяє припустити, що ДНК досліджуваних (неопромінених) лімфоцитів, в основному, є інтактною, що й гальмує її вихід при електрофорезі. Проте, при достатньому часі сила струму примушує ДНК формувати комету.

Якщо висловлене припущення щодо інтактності ДНК є справедливим, то хвіст такої комети не може містити нічого, крім петель ДНК, приєднаних кінцями до ядерного матриксу. Крім опору агарози, при виході з клітини такі петлі мають долати власний еластичний опір. Після видалення білків хроматину при лізисі в ДНК залишається негативна надспіралізація, і витягування петлі автоматично створює торсійну напругу негативного знаку – розкручування подвійної спіралі. Отже, можна очікувати, що зняття такого напруження має полегшити вихід комет.

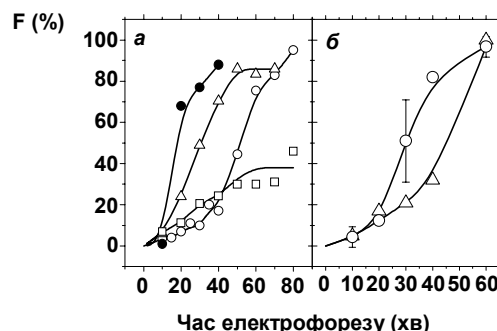


Рис. 2. Кінетика появи комет (F – частка комет) при нейтральному (а) та лужному (б) електрофорезі. (а): При дії рентгенівського опромінення у дозі 0,25 Гр (●) та в інтактних клітинах у відсутності (○) та у присутності $5 \cdot 10^{-5}$ (Δ) та $15 \cdot 10^{-5}$ (□) мг/мл бромистого етидію. (б): Після попередньої інкубації у лужному буфері протягом 10 хв. (Δ) та 20 і 40 хв. (○, середні значення). Точки є середніми значеннями за результатами 2-5 незалежних експериментів

Одним з найпростіших засобів зняти негативне напруження в ДНК є локальна розкрутка подвійної спіралі за рахунок інтеркаляції БЕ. Дійсно, у присутності $5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл БЕ спостерігається значне прискорення виходу комет за рахунок часткової релаксації петельних доменів (рис. 2а). Подальше зростання концентрації БЕ (і, відповідно, щільності його зв'язування з ДНК) призводить до накопичення позитивних торсійних напружень, які знов гальмують появу комет. Напевно, при концентрації $15 \cdot 10^{-5}$ мг/мл БЕ рівень позитивних напружень стає більшим за абсолютною величиною, ніж вихідний рівень негативних напружень (рис. 2а). Слід зазначити, що наявність описаних ефектів БЕ однозначно свідчить, що ДНК досліджуваних клітин є інтактною: тільки у відсутності розривів ДНК петельного домена характеризується топологічними обмеженнями.

Таким чином, отримані результати однозначно вказують на те, що хвіст комети формується за рахунок випетлювання ДНК, яке значно полегшується за умови релаксації торсійних напружень. З одного боку, це дає можливість оцінки топологічного стану ДНК в ядрах клітин при різних функціональних станах шляхом кометного електрофореzu у присутності БЕ. З іншого – дослідження кінетики появи комет може бути надзвичайно чутливим методом оцінки незначної кількості одноланцюгових розривів.

Лужний електрофорез. Приклади комет після лужного електрофореzu наведені на рис. 1, кінетика виходу комет – на рис. 2б. В цілому швидкість виходу комет, а також їх морфологія, є подібними до таких, що спостерігаються при нейтральному електрофорезі. Отже можна припустити, що і в цьому випадку відбувається випетлювання ДНК. Оскільки денатурація інтактної топологічно замкненої петлі у лужному буфері має призводити до позитивної надспіралізації, значний вихід ДНК свідчить про релаксацію петель. Механізмом релаксації може бути відома індукція лугом одноланцюгових розривів у апуринових сайтах. У відповідності з таким припущенням, збільшення часу інкубації у лужному буфері, яке має підвищити число розривів, призводить до прискорення виходу комет (рис. 2б).

Незалежно від інтерпретації, кінетика появи комет при лужному електрофорезі свідчить про залежність ефективності виходу ДНК від часу попередньої інкубації у лузі. У більшості лабораторій інкубацію здійснюють протягом 20-40 хв. із наступним електрофорезом упродовж ~30 хв. Як видно з рис. 2б, така комбінація

параметрів потрапляє на ділянку різкого зростання швидкості виходу комет, де точність експерименту є найнижчою: чим вищою є швидкість, тим більше проявляються варіації локальної структури агарозного геля від клітини до клітини, від слайда до слайда та від одного експерименту до іншого. Лише шляхом реєстрації кінетики появи комет, принаймні, у кількох контрольних експериментах, можна обрати певні, найкращі для вирішення конкретної задачі параметри проведення кометного електрофорезу.

Висновки. Представлені результати свідчать про те, що головною причиною полегшення виходу ДНК при кометному електрофорезі є релаксація петельних доменів. При цьому кінетика виходу ДНК має досить складний характер, на який впливають параметри проведення експерименту. Зокрема, одним з важливих факторів є час попередньої інкубації клітин у лужному буфері при лужному електрофорезі. Відповідно, реєстрація

кінетики й визначення швидкості появи комет є необхідним елементом експериментів з кометного електрофорезу, що дозволить підвищити чутливість методу та більш адекватно оцінювати рівень пошкоджень ДНК.

1. McNamee J.P., McLean J.R.N., Ferrarotto C.L., Bellier P.V. Comet assay: rapid processing of multiple samples // *Mutation Research*. – 2000 – Vol. 466. – P. 63–69.
2. Moller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures // *Basic and Clinical Pharmacology and toxicology*. – 2006 – Vol. 98 – P. 336–345.
3. Kassie F., Parzefall W., Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies // *Mutation Research*. – 2000. – Vol. 463. – P. 13–31.
4. Angelis K.J., Dušinska M., Collins A. Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity // *Electrophoresis*. – 1999. – Vol. 20. – P. 2133–2138.
5. Olive P.L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999 – Vol. 75 – №4. – P. 395–405.
6. Horvathova E., Dušinska M., Shaposhnikov S., Collins A. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization // *Mutagenesis*. – 2004. – Vol. 19. – P. 269–276.

Надійшла до редколегії 15.06.07

УДК 612.82/83; 612.821

Н. Філімонова, канд. фіз.-мат. наук, Т. Куценко, канд.біол. наук,
М. Макачук, д-р біол. наук, О. Попова, студ.

ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ШВИДКОСТІ ЦЕНТРАЛЬНОЇ ОБРОБКИ ІНФОРМАЦІЇ У ДІТЕЙ МОЛОДШОГО ДОШКІЛЬНОГО ВІКУ

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що з метою оцінки психофізіологічних особливостей дітей молодшого дошкільного віку необхідно поводити обстеження як мінімум 3 рази, причому одночасно з найкращими для цієї дитини показниками вказувати і їх розкид. Також показано, що використання показника швидкості центральної обробки інформації дає можливість виявити і оцінити ефективність формування функціональної підсистеми оперативної пам'яті дитини і спрогнозувати можливу варіабельність її стану.

As a result of carried out research it has been established, that with the purpose of an estimation of psychophysiological features of children of younger preschool age it is necessary to spend inspections at least 3 times, and simultaneously with the best for this child parameters to specify and their spread. Also it is shown, that use of a parameter of speed of the central processing of the information enables to reveal and estimate efficacy of formation of a functional subsystem of operative memory of the child and to forecast possible variability of its state.

Вступ. Дослідження психофізіологічного дозрівання дитини на сьогоднішній день є однією з найбільш актуальних проблем вікової психофізіології. При цьому особлива увага приділяється дошкільному віку, бо це є один із важливих критичних періодів розвитку людини, який характеризується високими темпами дозрівання. Однак психофізіологічне дослідження дітей молодшого дошкільного віку є досить складним процесом. Напевне, саме тому на сьогодні їхні психофізіологічні особливості є недостатньо вивченими.

При дослідженні основних психофізіологічних характеристик людини загальноприйнятним є проведення тестування обстежених один раз і формування на основі отриманих даних множини реакцій даної референтної групи [7]. В подальшому аналізі, як правило, з'ясовуються найбільш типові значення цих реакцій і їх розкид. Крім того, часто визначають границі, які розбивають дану множину реакцій на групи низького рівня, середнього та високого. В медицині найбільш вживаним є підхід, за яким визначається діапазон "норми", або референтних границь. При обстеженні окремої людини на підставі значень отриманих показників її відносять до певної групи – до групи з низькими показниками, середніми або високими, або до "норми", чи "нижче" норми, чи "вище" норми. Тобто, на підставі такого аналізу часто роблять висновки про стан окремої людини. Але виникає питання, чи є цей стан типовим для цієї людини? Скільки треба зробити обстежень, щоб з'ясувати, які значення є типовими для окремої людини та який їх розкид? В ідеалі таке дослідження повинно бути довготривалим, що практично є неможливим при вирішенні конкретних задач про профпридатність, готовність до школи і т.п.

Особливо актуальною ця проблема є при аналізі психофізіологічних станів дітей дошкільного віку, оскільки їх психофізіологічні функції ще не є достатньо сформованими і мають певну нестабільність. Тому метою даної роботи було дослідити наскільки великим може бути розкид певних психофізіологічних показників у окремих дітей, особливо швидкості центральної обробки інформації, і тим самим визначити можливий діапазон коливання психофізіологічного стану окремої дитини.

Об'єкт та методи досліджень. Було проведено тестування 27 дітей обох статей віком 4-5 років, які відвідували дитячий садок в м. Полтава. Всі обстеження проводились в один і той же час, з 9.30 ранку до 12 години, після сніданку, коли починались заняття, тобто в період початку бадьорості дітей і до початку втоми (за розкладом після 12 години запланована прогулянка, обід і сон). Цей період виявився найбільш стабільним за показниками навантаження учбовим процесом. Обстеження кожної дитини тривало 20 хв. тестування за трьома показниками. Кожна дитина тестувалась на протязі трьох днів. На початку тестування в перший день кожна дитина отримала невеличкий подарунок в якості заохочення, таким чином надалі діти вже змагалися за право бути першим щоб отримати винагороду, що дозволило максимально підвищити рівень уваги і старанності дітей, а також в якійсь мірі відповідальності. Крім того, велику роль в утриманні уваги дитини відіграло зацікавленість чимось новим (комп'ютерна гра, комп'ютер).

В першому субтесті визначали розвиток короткочасної пам'яті на невербальні стимули (геометричні фігури). Обстежуваному на екрані комп'ютера послідовно пред'являлись 60 груп простих геометричних фігур: