

Порушення функціональної активності ЕРФ-рецепторних тирозинових протеїніназ, які виникають у результаті виразкоутворення, надають підстави очікувати дисбаланс тригерних внутрішньоклітинних сигнальних послідовностей, які мають місце при трансдукції сигналу від ЕРФ і його рецепторів. Відомо, що в процес передачі сигналу від ЕРФ і його рецептора є залученою ще одна регуляторна система – аденілатциклазна. Нами показана участь вищезгаданої системи в біохімічних механізмах розвитку різних за походженням виразок. Зміни цАМФ-залежної протеїніназної активності в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів цілком співпадають з порушеннями в функціонуванні мембранної тирозинкінази.

Можливою причиною зміни активності тирозинової кінази може бути посилення синтезу інтерлейкінів викликане утворенням виразки шлунка [6], які відіграють суттєву роль у регуляції активності саме цього ферменту. Іншим фактором, здатним впливати на активність даної кінази, може бути збільшення кількості амінокислот, зокрема ти-

розинових, у зв'язку з посиленням процесу деструкції білків за умов утворення виразки шлунка [7].

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що досліджувані протеїнінази є чутливим ланцюгом ув каскаді біохімічних реакцій, що є залученими до метаболічних шляхів які беруть участь у розвитку даного патологічного процесу.

1. Nardone G., d'Armiento F., Corso G. et al. // Gastroenterology. – 1994. – Vol. 107 (2). – P. 362–368.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К., 2001.
3. Boutin J.C. Tyrosine protein kinase assays // J. of Chromatogr. – 1996. – Vol. 684 – P. 179–199.
4. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности // Под ред. С.Е. Северина, М.Н. Кочетковой. – М., 1985. – С. 287.
5. Dariach J., Bara M., Guet Betra A. Magnesiura et cancer // Med. et nutr. – 1993. – Vol. 29, № 2. – P. 75–79.
6. Nishisaki H., Sakamoto C., Konda Y. et al. Effect of antiulcer drugs on phosphatidylcholine synthesis in isolated guinea pig gastric glands // Dig Dis Sci. – 1992. – P. 1593–1698.
7. Nishisaki H., Sakamoto C., Konda Y. et al. Effect of teprenone and H2-receptor antagonists on phosphatidylcholine synthesis in the isolated guinea pig gastric glands // Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi. – 1990. – Oct. – P. 2352–2357.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 595.773.4

О.В. Жук, інж., І.А. Козерецька, канд. біол. наук

АНАЛІЗ НОВОЇ *miniature* (m^{42})-ПОДІБНОЇ ЛІНІЇ У *DROSOPHILA VIRILIS* ЗА ПЕРЕРОЗПОДІЛОМ КОПІЙ РЕТРОТРАНСПОЗОНУ *PENELOPE* ТА ДИСГЕННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Описано нову крилова *miniature*-подібну мутацію, яку було виділено серед нащадків схрещувань ліній 9 і 160 *Drosophila virilis* унаслідок гібридного дисгенезу, який виникає при схрещуванні цих ліній за рахунок активації ретротранспозону *Penelope*. У новій лінії визначено розташування сайтів *Penelope* з метою порівняння їх з розподілом у лінії 160, що є батьківською. Установлено цитотип лінії, передбачено причино виникнення мутації та ймовірну локалізацію локусу *miniature* на цитологічній карті хромосом.

New miniature-like mutant m^{42} was observed in *Drosophila virilis*. It was received by hybrid dysgenesis process, which is induced by mobilization of *Penelope* retrotransposon in dysgenic traits of strains 9 and 160. We have compared the distribution of *Penelope* sites in 160 and m^{42} chromosomes by *in situ* hybridization and have tested strain m^{42} for ability to induce hybrid dysgenesis in dysgenic traits. It was suggested cause of mutation appearance and most probable localization of miniature locus in *Drosophila virilis*.

Порушення функції генів, що відповідальні за ріст, диференціацію та розвиток клітин призводить до появи особин з різноманітними порушеннями, дослідження яких дозволяє встановити роль того чи іншого локусу в процесах формування організму. Існують загальновізані методи отримання мутантів у *Drosophila*, кожний з яких має свої переваги та недоліки. Явище гібридного дисгенезу є ефективним методом, який активно використовують для виділення широкого спектра мутацій. Закономірності переміщення, активації та розмноження Р-елемента *Drosophila melanogaster* вивчаються з 1977 року і є сьогодні найкраще вивченими на генетичному та молекулярному рівнях. Відомо, що основними ознаками гібридного дисгенезу, викликаного Р-М системою нестабільності, є збільшення частоти мутацій у нащадків, рекомбінація у самців та високий рівень стерильності особин обох статей унаслідок редукції клітин зародкового шляху [1]. У *Drosophila virilis* було описано декілька родин мобільних генетичних елементів, але ключовим елементом, що здатний викликати класичну картину гібридного дисгенезу та мобілізувати інших під час своєї активації є ретротранспозон *Penelope* [2]. Нині вивчено його структуру, визначено спосіб розмноження, але невідомо, яким чином відбувається регуляція його активності та вплив на копії мобільних елементів інших родин. Отримання мутацій у даній системі гібридного дисгенезу дозволяє дослідити закономірності їх виникнення та прослідкувати подальшу поведінку мобільних елементів в новоутворених лініях.

За допомогою системи нестабільності, пов'язаної з функціонуванням *Penelope*, нами отримано низку мутацій. Одна з них характеризується ознаками, що загалом відповідають відомій у *Drosophila melanogaster* мутації гену *miniature* (m), але також має свої, описані вперше, особливості. Відомо, що *miniature* *Drosophila melanogaster* входить до m - dy генного комплексу, продукту якого є трансмембранні білки кутикули, що забезпечують формування кутикули й необхідні для диференціації епітеліальних клітин крила [3]. У даній роботі розглянуто характеристики мутантного алелю m^{42} , розподіл копій ретротранспозону *Penelope* та особливості ефектів, що виникають у дисгенних схрещуваннях отриманої лінії.

Матеріали та методи. Лінії *Drosophila virilis*. У роботі використані лабораторні лінії *Drosophila virilis*: 9 – лінія дикого типу з М-подібним цитотипом (популяція м. Батумі); 160 (маркована рецесивними мутаціями генів *broken* (b : 2–188,0), *gap* L2 (gp L2: 3–118,5), *cardinal* (cd : 4–32,2), *peach* (pe : 5–203,0) та *glossy* (gl : 6–1,0) по всіх аутосомах) є лінією з сильним Р-подібним цитотипом; лінія m^{42} , що містить *miniature*-подібний мутантний алель. Лінії підтримували шляхом масових схрещувань при температурі 25 °С на стандартному середовищі [4].

Наявність гонадного дисгенезу (gonadal dysgenesis – GD – assay). Для встановлення цитотипу лінії використовували схрещування двох типів: А-тест – схрещування самок лінії з М-подібним цитотипом (9) із самцями досліджуваної, та А*-тест – схрещування самок лінії, що тестується, із самцями лінії з сильним Р-подібним цитотипом (160). Отже, М-цитотип відповідає високому рівню редукції

© О.В. Жук, І.А. Козерецька, 2005

гонад в А*-тесті й низькому – в А-тесті, Р-цитотип – навпаки. Нашадків від дисгенних схрещувань розсаджували по пробірках на 7–10 діб для досягнення повного статевого дозрівання. Далі аналізували наявність редукції гонад шляхом їхнього виділення, оцінюючи ступінь розвитку візуально. Ураховували лише повну редукцію яєчників і сім'яників. Використовували особин лінії 9, m^{42} , 160 для визначення фонового рівня редукції гонад. Відсоток GD обчислювали за такою формулою:

$$\%GD = 1/2 \%GD(1) + \%GD(2),$$

де: $\%GD(1)$ – відносна кількість особин з одним редукованим яєчником/сім'яником у відсотках від загальної кількості; $\%GD(2)$ – відносна кількість особин з двобічною редукцією гонад у відсотках від загальної кількості [1].

Помилку частки (m) визначали за формулою

$$\sqrt{\frac{\%GD \times (100 - \%GD)}{N}}$$

де N – загальна кількість проаналізованих особин.

Довірчий інтервал розраховувався (для рівня значущості 0,95) як: $m \pm 1,96 (N > 30)$

Гібридизація in situ на політенних хромосомах. Для приготування давлених препаратів політенних хромосом видаляли слинні залози личинок третього віку, що розвивались при температурі 18 °С, у краплі 45 %-ї оцтової кислоти. Біотин-мічені фрагменти ретротранспозону *Penelope* отримували шляхом нік-трансляції [5]. Локалізацію проводили за цитогенетичними картами політенних хромосом *Drosophila virilis* [6].

Результати та обговорення. Загальна характеристика. Нова крилова мутація була виділена серед нащадків схрещувань ліній 9 і 160 *Drosophila virilis* унаслідок гібридного дисгенезу, що виникає при схрещуванні цих ліній за рахунок активації ретротранспозону *Penelope*. З'ясовано, що мутація є рецесивною, зчепленою зі статтю, гомозиготи життєздатні. Основним проявом є зменшення у розмірі пластинки крила приблизно в 1,4 рази порівняно з диким типом у зв'язку зі зменшенням розміру клітин, що формують крило. Межі клітин крила мутантних особин залишаються видимими у світловому мікроскопі, на відміну від крила мух дикого типу. Порушується орієнтація крилових волосків, крила менш прозорі, темніші, край крила має хвилясту форму, кут між жилками L2 і L5 зменшується. Мутантні особини мають розставлені крила на 45 градусів щодо повздовжньої осі тіла, однак пенетрантність цієї ознаки становить близько 50 %. Досліджена мікроструктура крилових жилок мутантів m^{42} . Виявлені темні, округлі або невірної форми структури (*nvs* – *neomorphic vein structures*), що відсутні в особин дикого типу. Продемонстровано, що *nvs* являють собою потовщення кутикули крила [7].

Гібридизація in situ на політенних хромосомах. Відомо, що гібридний дисгенез призводить до підвищення частоти мутацій унаслідок вбудовування нових копій мобільного елемента та неточного вирізання старих з порушенням нормального функціонування генів. Дисгенні схрещування супроводжуються перерозподілом сайтів на хромосомах за рахунок рекомбінаційних процесів, що може змінювати як роботу генів, так і активність самого транспозону. Тому було цікавим перевіри-

ти наявність і розподіл сайтів ретротранспозону *Penelope* в лінії m^{42} . За результатами гібридизації *in situ* на політенних хромосомах лінії m^{42} було виявлено 20 чітких копій *Penelope*, тоді як у лінії 160 – 36. Порівнюючи картину розташування копій *Penelope* в лінії m^{42} та 160, у першу чергу слід відмітити відсутність копій ретротранспозону в X хромосомі m^{42} лінії. Тобто, поява мутації в локусі *miniature* ймовірно пов'язана або з вбудовуванням іншого мобільного елемента, що активується внаслідок експресії *Penelope*, або внаслідок вирізання саме *Penelope* з певного сайту X хромосоми. Лінія 160 має 6 місць розташування цього ретротранспозону, це ділянки 8A, 8C, 9C, 10A, 11A і 11CD. За попередньою локалізацією мутантний локус картований у X-хромосомі на відстані 28 одиниць генетичної карти від локусу *white* [7]. Таким чином, локалізація локусу збігається з сайтами *Penelope* в 160 лінії, і найбільша ймовірність його розташування в ділянках 10A та 11A. Необхідно відмітити також, що видимі перебудови в X хромосомі лінії m^{42} відсутні.

Загальна картина розподілу ретротранспозону в інших хромосомах в m^{42} подібна до такої в 160 лінії, вони мають 12 спільних сайтів. Один з них – 40A – є характерним лише для ліній з Р-подібним цитотипом, тобто є ймовірною активною копією [8].

Дослідження рівня редукції гонад. Наявність активних копій *Penelope* в m^{42} була підтверджена за її поведінкою у дисгенних схрещуваннях, тобто при визначенні цитотипу лінії за допомогою тесту на редукцію гонад. Виявилось, що самки m^{42} мають підвищений рівень редукції гонад поза дисгенними схрещуваннями (9,09 %), що є характерним для ліній із сильним Р-подібним цитотипом. Однак, в дисгенних схрещуваннях ця лінія веде себе нетипово: редукція сім'яників у нащадків від $9 \times m^{42}$ складає всього 12,5 %, а редукція яєчників спостерігається у 71,11 % особин. У схрещуваннях самок лінії m^{42} з самцями лінії 160 (А*-тест) редукція гонад самців повністю репресується, однак у самок залишається високою (табл.1). Така картина не характерна для ліній, які здатні викликати гібридний дисгенез внаслідок активності *Penelope*. Цей ефект може бути пов'язаний як з перерозподілом мобільних елементів геному, їхніх активних та репресорних копій, так із плейотропною дією досліджуваної мутації. Відомо, що геном 160 лінії містить копії мобільних елементів різних родин, але з них лише ретротранспозон *Penelope* здатний викликати явище гібридного дисгенезу, що супроводжується мобілізацією і інших елементів [2]. Також зрозуміло, що не всі копії *Penelope* є активними, має значення повнорозмірність, ймовірно, сайт розташування та інші, ще не вивчені, фактори. В літературі вказано і на існування особливих дефективних копій, які не викликають дисгенних ефектів, однак репресують інші активні МЕ тієї ж родини [9]. Таким чином, лінія m^{42} , отримана нами в результаті дисгенезу, внаслідок процесів мобілізації і переміщення рухливих елементів може бути несподіваною з точки зору патерну, функціонування *Penelope* в її геномі та особливостей прояву гібридного дисгенезу, який вона викликає. До того ж, сам ген *miniature* задіяний у процеси регуляції формування клітин і не можна виключити його впливу й на розвиток гонад у самок.

Таблиця 1. Рівень редукції гонад в лініях 9, 160, m^{42} у різних типах дисгенних схрещувань

Лінія	Фоновий рівень, %		А-тест, %		А*-тест, %	
	самки	самці	самки	самці	самки	самці
9	0	0	–	–	–	–
160	21,77 ± 8,09	0	27,18 ± 8,72	47 ± 9,78	–	–
m^{42}	9,09 ± 5,64	0	71,11 ± 8,88	12,5 ± 6,49	62,3 ± 9,51	0

Висновки. По-перше, лінія m^{42} , отримана в результаті гібридного дисгенезу, є лінією зі слабким R-подібним цитотипом. По-друге, характер гібридного дисгенезу, який вона викликає в дисгенних схрещуваннях є незвичним для інших подібних ліній. По-третє, визначена ймовірна генетична локалізація локусу *miniature* у *Drosophila virilis*.

Автори висловлюють подяку О.С. Зеленцовій (Інститут молекулярної біології ім. Енгельгардта, м. Москва), І.С. Губенко (Інститут молекулярної біології та генетики, м. Київ) за підтримку в забезпеченні реактивами й матеріалами для проведення досліджень.

УДК 577.391:311

1. Kidwell M.G., Kidwell J.F., Sved A. // Genetics. – 1977. – Vol. 86. – P. 813–833.
2. Evgen'ev M., Zelentsova H., Shostak N. et al. // Genetics. – 1997. – 94. – P. 196–201.
3. DiBartolomeis S.M., Akten B., Genova G. et al. // Mol. Genet. Genomics. – 2002. – Vol. 267. – P. 564–576.
4. Roberts D.B. *Drosophila a practical approach*. – Oxford, 1986.
5. Lim J.K. // Drosophila Inf. Serv. – 1993. – Vol. 72. – P. 73–77.
6. Gubenko I., Evgen'ev M. // Genetica. – 1982. – Vol. 65. – P. 127–139.
7. Kozaretska I., Gubenko I., Gorb S. // J. of Morphology. – 2004. – Vol. 219. – P. 270–275.
8. Zhuk O. // Thesis on conference on molecular biology and genetics, Kyiv, Ukraine, 2003. – K., 2003.
9. Marin L., Lehmann M., Nouaud D. et al. // Genetics. – 2000. – Vol. 155. – P. 1841–1854.

Надійшла до редколегії 30.09.04.

В.О. Чайка, асп., Л.І. Гавриш, канд. біол. наук,
О.В. Скопенко, канд. біол. наук, Є.А. Строцька, інж.

УЧАСТЬ H_3 РЕЦЕПТОРА У ФУНКЦІОНУВАННІ МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНИХ ФЕРМЕНТІВ ПАРІЄТАЛЬНИХ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ВИРАЗКИ

Установлено, що агоніст H_3 гістамінового рецептора R-альфа-метилгістамін знижує активність 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФази в плазматичних мембранах парієтальних клітин слизової шлунка щурів за умов стресової моделі виразки. Введення антагоніста H_3 рецептора тіопераміда приводило до зростання активності обох ферментів.

It was shown that H_3 -receptor agonist (R)-alpha-methylhistamine decrease of 5'-nucleotidase and Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase activity in plasma membrane of rat gastric parietal cells under the experimental stress – induced stomach ulcer formation. The histamine H_3 -receptor antagonist, thioperamide, enhanced 5'-nucleotidase and Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase activity in above-stated cells.

Вступ. Сьогодні відомо, що виразка шлунка – хронічне рецидивне захворювання, що розвивається у результаті розладу нейрогуморальної, ендокринної регуляції, порушення взаємин факторів захисту й агресії слизової оболонки, при цьому в патогенез залучаються кислотний і судинний фактори, а також імунна системи [1]. Особливого значення при вивченні патогенезу захворювання надається парієтальним клітинам слизової, що є основним кислотопродукуючим елементом. Відомо, що функціональна діяльність даного типу клітин контролюється багатьма нейроендокринними сигналами, серед яких особливо важливими є неврональна стимуляція через блукаючий нерв і місцеву невральне сплетення; ендокринна стимуляція через гастрин, що вивільняється з G-клітин і соматостатин, що виділяється D-клітинами; паракринна стимуляція шляхом місцевого виділення гістаміну з ентерохромофіноподібних (ECL) клітин [2]. Останнім часом велику зацікавленість при розробці противиразкових препаратів надається ролі H_3 гістамінового рецептора, який представлений як у центральній та ентєральній нервовій системах, так і на мембранах D-, G- і ECL-клітин і може опосередковано регулювати кислотну продукцію [3]. Дослідження механізмів впливу H_3 -сигналів на структурно-функціональний стан мембран парієтальних клітин допоможе краще оцінити його потенційну терапевтичну дію.

У нашій експериментальній роботі для характеристики стану мембран досліджуваних клітин було обрано ферменти – 5'-нуклеотидазу та Na^+, K^+ -АТФазу. Метою цієї роботи було дослідити, як змінюється активність 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФази в мембранах парієтальних клітинах слизової оболонки шлунка за умов активації H_3 рецептора при експериментальній моделі виразки шлунка.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на нелінійних щурах (самцях) масою 180–220 г. Стрессова виразка викликала за методикою С.Д. Гройсмана і Т.Г. Каревіної ("імобілізаційний стрес") [4]. Парієтальна

клітини виділялись за описаною методикою (ферментативне відщеплення клітин слизової з наступним ультрацентрифугуванням на сахарозо-фікольному градієнті) [5]. R-альфа-метилгістамін і тіоперамід (специфічні агоніст і антагоніст H_3 рецептора, відповідно) вводились внутрішньочеревно в дозах 0,5 і 1,0 мг/кг на другий день формування експериментальної виразки.

Фракцію плазматичних мембран (102 000g) отримували на градієнті сахарози (26 %) за рекомендаціями [6]. Активність 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФази визначали за описаною методикою [7]

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента при $P < 0,05$

Результати досліджень та їх обговорення. Відомо, що при розвитку виразкового захворювання зростає активність 5'-нуклеотидази – ферменту, який слугує загальновідомим маркером запальних процесів. За умов розвитку виразки збільшується кислотна продукція у шлунку, що є пов'язаним з активацією H^+, K^+ -АТФази; активність Na^+, K^+ -АТФази при цьому також змінюється. Оскільки дані про вплив H_3 рецепторів на продукцію соляної кислоти клітинами слизової шлунка у щурів досить суперечливі, визначення активності вищезгаданих ферментів розширює можливість розуміння участі H_3 рецептора в патогенезі виразкової патології.

Дослідження участі H_3 рецептора в роботі 5'-нуклеотидази та Na^+, K^+ -АТФази мембран парієтальних клітин слизової оболонки шлунка проводились за умов розвитку стресової виразки. При цьому одній групі тварин з експериментальною стресовою виразкою внутрішньочеревно вводився R-альфа-метилгістамін, а іншій тіоперамід – специфічний агоніст і антагоніст H_3 рецептора відповідно.