

Використання морфометричного аналізу дозволило оцінити рівень метаболічної активності клітин культивованих з різними додатками за визначенням ЯЦС. У роботі застосували виборку з 300 клітин з кожної культивованої групи у 6 повторях. Значення ЯЦС клітин, що культивувались без додатків до поживного середовища дорівнювало $0,391 \pm 0,021$, зі стандартним додаванням

ЕТС – $0,311 \pm 0,019$, з додаванням інактивованої ЗБТП – $0,268 \pm 0,024$, неінактивованої ЗБТП – $0,211 \pm 0,020$. Отже, біологічно активні добавки до поживних середовищ вочевидь спричиняють зниження показників ЯЦС клітин культур (рис.1). З'ясування механізмів цього ефекту потребує подальших досліджень.

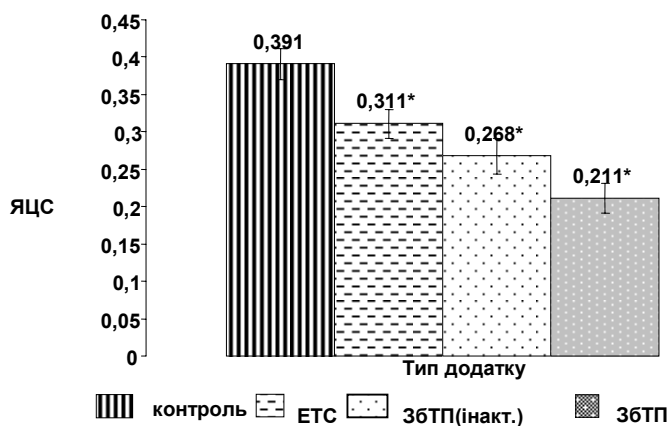


Рис.1. Залежність значення ЯЦС від типу добавки до поживного середовища (* $p \leq 0,05$)

Висновки. При культивуванні клітин НЕК 293 на середовищі DMEM з додаванням ЗБТП виявлена поява значної кількості нетипових форм клітин, багаточарових клітинних конгломератів, відзначається підвищена щільність культури. Клітини, що культивувались з додаванням неінактивованої та інактивованої теплової шляхом ЗБТП мали знижене ЯЦС, що може свідчити про певні зміни метаболічної активності, але виявляли посилену активність ядерного матеріалу. Інактивована ЗБТП спричиняла стимулюючий ріст ефект, хоч і у меншій, ніж неінактивована ЗБТП, мірі. Оцінка сумарного ефекту впливу ЗБТП на клітинні культури потребує подальших досліджень.

1. Freshney R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss: 5th ed., 2005. – 672p.
2. Mannello F., Tonti G.A. All That Glitters Is Not Gold! Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium, or Ad Hoc Formula? Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma // Stem Cells. – 2007. – Vol.25. – P. 1603-1609.
3. Marx R.E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use // J Oral Maxillofac Surg. – 2004. – Vol.62. – P.489-496.
4. Johansson L., Klinth J., Holmqvist O., Ohlson S. Platelet lysate: a replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? // Journal Cytotechnology. – 2003. – Vol.42, № 2. – P.67-74.
5. du Toit D.F., Kleintjes W.G., Otto M.J., Mazyala E.J., Page B.J. Soft and hard-tissue augmentation with platelet-rich plasma: Tissue culture dynamics, regeneration and molecular biology perspective // Int J Shoulder Surg. – 2007. – Vol.1. – P.64-73.

Надійшла до редколегії 30.05.09

УДК 577.543.426

А. Майданюк, канд. біол. наук,
В. Пивоваренко, канд. хім. наук

МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АТР В РОЗЧИНАХ ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДУ

Запропоновано спосіб визначення концентрації АТР у водних розчинах за допомогою флуоресцентного зонду -3 гідрокси -4'-диметиламінофлавоу.

Fluorometric method for quantitative detection of ATP in water solution was developed.

Вступ. Порушення пуринового обміну та вмісту пуринів в клітинах у післяпроменевий період, являється одним із ранніх і характерних процесів апоптозу тимоцитів [2, 3]. Апоптоз – енергозалежний процес, опосередкований молекулярними, біохімічними механізмами наявними у кожній клітині організму. Центральну роль у здійсненні апоптозу відіграють цистеїнові протеази – каспази. Усі вони синтезуються клітиною у неактивній формі і активуються шляхом обмеженого протеолізу у відповідь на вплив апоптогенного сигналу. Активізація каспаз, що здійснюють деструкцію клітинних компонентів відбувається різними шляхами. Незважаючи на численні докази щодо зміни активності ферментів і метаболізму клітин у процесі апоптозу, питання про те, що служить безпосередньою причиною їх загибелі остаточно не вирішене. Одне із пояснень зв'язує загибель клітин за апоптозу з енергетичним голодом, який

викликається витратами АТР на роботу з репарації ДНК та зниженням функцій мітохондрій. Зниження концентрації аденолових нуклеотидів відбувається за рахунок їх посиленого катаболізму за схемою: АТР→АДР→АМР→аденозин→гіпоксантин і виходу із клітини, що в часі співпадає з максимальним накопиченням полідезоксинуклеотидів (ПДН) і розпадом хроматину[3]. Вважається, що прискорення катаболізму аденіннуклеотидів являється загальною реакцією клітини на дію будь-яких стресорних факторів. Згідно приведеної схеми прискорений катаболізм аденолових нуклеотидів буде мати своїм наслідком зменшення внутрішньоклітинної концентранції АТР. Зниження вмісту АТР зареєстроване в ході прямих досліджень апоптичних клітин [2, 5]. Експериментально встановлено, що клітини, в яких рівень АТР становив менше 50 % від контрольних значень, гинули за варіантом некрозу, а

при більш високих значеннях макроергу спостерігався розвиток апоптичної загибелі [3]. Враховуючи все вищенаведене можна заключити, що розробка швидкого та чутливого методу кількісного визначення АТР являє собою актуальне завдання при дослідженні біохімічних механізмів апоптозу.

Метою роботи було дослідити флуоресцентний зонд 3-гідрокси-4'-диметиламінофлаво́н на його придатність для кількісного визначення концентрації АТР у водному середовищі флуориметричним методом.

Об'єкт та методи досліджень. Аденозин-5'-трифосфорної кислоти динатрієва сіль (АТР) виробництва фірми Reanal (Угорщина), 3-гідрокси-4'-диметиламінофлаво́н (Україна). Визначали концентрацію АТР у стандартних розчинах, загальний об'єм проб був 2 мл, спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Scinco SUV-2120 (Германія), спектрофлуориметричним методом на спектрофлуориметрі RF-510 фірми Shimadzu (Японія). Величини поглинання (екстинції) $E_{260-290}$ у випадку спектрофотометричного аналізу та інтенсивність флуоресценції (емісії) I_f (або їх відношення) у випадку флуоресцентного аналізу відкладали на осі ординат (Y), на осі абсцис (X) – концентрацію стандартних розчинів АТР (моль/л), (або у логарифмічних координатах) для побудови калібрувального графіку або використовували ці значення для визначення коефіцієнтів рівняння лінійної регресії та коефіцієнта

кореляції (r) згідно програми [1]. Математично коректними вважали значення не нижчі 0,8.

Результати та їх обговорення. Інтенсивність флуоресценції (em) вимірювали на довжині хвилі 540 нм. Числові значення відношення інтенсивностей емісії при збудженні (ex) на 480 та 410 нм (I_f 480/ I_f 410) використовували як ось ординат. За значення (Y) брали також відношення інтенсивності флуоресценції стандартних розчинів АТР (I_f) до контрольного розчину (без АТР) – (I_{f0}) на (ex) – 480 нм (I_f / I_{f0} 480) та відношення (I_f / I_{f0} 480/ I_f / I_{f0} 410) Раніше було показано [7], що взаємодія флуоресцентного зонду – 3 гідрокси-4'-диметилфлаво́ну (ДМАФ) з АТР приводить до утворення комплексу ДМАФ АТР і це має своїм наслідком зміщення смуги збудження (ex) з 405 – 410 нм (характерного для ДМАФ у водному розчині) до (ex) на 475 – 480 нм. Проте положення максимуму випромінювання флуоресценції (em) при цьому не змінюється (540 -550 нм). Специфічність цього ефекту тільки для АТР показана [7] і в наших дослідженнях (Табл.1 А). Оскільки збільшення концентрації АТР призводить до зростання інтенсивності випромінювання флуоресценції при збудженні на 480 нм, ця властивість використана для розробки методу кількісного визначення АТР у водному розчині [4, 6] та в даній роботі (Табл. 1 В) Результати першої частини таблиці (Табл. 1 А) свідчать, що ефект зсуву смуги збудження є специфічним для АТР і не проявляється у присутності високих концентрацій ADP (5×10^{-4} M).

Таблиця 1. Результати спектрофотометричного (СФ) та спектрофлуориметричного (ФЛ) визначення концентрації АТР у водних розчинах (n=8)

А	Нуклеотид	Відношення параметрів флуоресценції				
		I _f / I _{f0} 480		I _f 480/ I _f 410		I _f / I _{f0} 480/I _f /I _{f0} 410
	5x10 ⁻⁴ M,ATP	4,1	1,4		3,2	
	5x10 ⁻⁴ M,ADP	0,9	0,5		0,7	
В	Метод	Задана концентрація АТФ, мкмоль/л				
		10	100	250	500	750
		Визначена концентрація АТФ, мкмоль/л				
	СФ	9,50	100,05	250,04	499,93	749,81
	ℓ = 0,2 см y= E ₂₆₀₋₂₉₀ x= [ATP] r= 0,99					
	ФЛ	16,05	86,13	231,62	466,50	799,93
	ℓ = 1,0 см y= I _f / I _{f0} 480 x= ℓg[M] r= 0,97					
ФЛ	10,20	102,73	237,63	517,16	712,19	
ℓ = 1,0 см y= I _f 480/ I _f 410 x= ℓg[M] r= 0,98						
ФЛ	—	111,51	235,79	493,66	779,32	
ℓ = 1,0 см y= I _f / I _{f0} 480/I _f /I _{f0} 410 x= ℓg[M] r= 0,98						

Аналіз результатів наведених, в другій частині таблиці (Табл. 1 В) дозволяє заключити, що залежність відносних параметрів флуоресценції від $\lg [ATP]$ є лінійною, що засвідчується високими значеннями розрахованих коефіцієнтів кореляції (0,97-0,98). Найближчі до заданих значень концентрації АТР визначаються за відношеннями I_f 480/ I_f 410 або I_f / I_{f0} 480/ I_f / I_{f0} 410. Похибка методу при цьому, за винятком крайніх точок, не перевищує 5–10 %.

Висновки. Установлено, що в діапазоні концентрацій – 10^{-5} – $7,5 \times 10^{-4}$ M маємо лінійну залежність дослі-

джених параметрів флуоресценції від $\lg [ATP]$, тобто обґрунтовану підставу для побудови калібрувальних графіків. Визначена похибка методу становить 5–10 %.

1. Войцицкий В.М., Бабенюк Ю.Д., Рудич В.В., Марченков Ф.С. Общие принципы организации биохимических исследований. – К. 1989. – С. 40. 2. Дворченко К.О., Матишевська О.П., Майданюк А.В. Дослідження вмісту адениннуклеотидів аденозину й аденіну у опромінених тимоцитах щурів // Вісн. Київ. ун-ту. ім. Т. Шевченка. Біологія – 2005 – Вип. 45–46. – С. 52–53. 3. Кучеренко М.С. (загальна редакція) Радіаційно – індукована структурно – метаболічна модифікація ентероцитів та лімфоїдних клітин. К. 2006. – 211с. 4. 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. 5. Тронов В.А., Константинов Е.М., Крамаренко И.И. Роль эксцизионных механизмов репарации ДНК в индукции апоптоза // Биохимия – 2002 – Т. 67 – №7 – С.882-889. 6. 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. 7. 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 05.06.09

УДК.6/6.34+577.115

А. Сергійчук, студ., В.Ковальова, канд. біол. наук,
О. Моргаєнко, асист., Л. Остапченко, д-р біол. наук

АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ У СЛИЗОВІЙ ШЛУНКА ЗА УМОВ ДІЇ РІЗНИХ ЧИННИКІВ

Установлено, що препарати природного походження – амівіт і сквален нормалізують активність СОД в клітинах слизової оболонки шлунка щурів за умов етанолової моделі виразки.

The intensification of the lipid peroxidation and the depression of superoxide dismutase activity under experimental model stomach ulceration in the mucosae cells of Wistar rats is occurred. Ammivit and squalen normalized the activity of superoxide dismutase.

Вступ. Протягом останніх десятиріч у сфері інтенсивних наукових досліджень знаходяться патології органів травлення, серед яких домінує виразкова хвороба шлунка. Виразковий процес в шлунку є кінцевим етапом складного захворювання, в патогенез якого залучені процеси нейрогуморальної і ендокринної регуляції, біогенні аміни та поліпептиди травної системи. Крім того, в механізмах утворення виразки беруть участь місцеві агресивні фактори та порушення механізмів захисту епітелію слизової оболонки.

Виразкова хвороба має низку фонових та основних факторів, які можна поділити на неспецифічні (екзогенні) та ендогенні. Однією з найбільш поширених вважається етанолова виразка. Алкоголь у невеликій кількості має протективну дію, а надмірне вживання міцних спиртних напоїв стимулює секрецію кислоти та дезорганізує слизовий бар'єр шляхом злушчування епітелію слизової оболонки і зниження продукції полісахаридів. Суть агресивного впливу кислотно-пептичного фактору полягає у зворотній дифузії протонів у стінку шлунка при виникненні їх надпорогової концентрації чи у випадку порушення бар'єрної функції покривних тканин. Таким чином етанол має подвійну дію: чинить пригнічуючий вплив на "захисний бар'єр" слизової оболонки гастродуоденальної системи, а також викликає гіперплазію гастринпродукуючих клітин слизової оболонки шлунка [1]. Незважаючи на зроблений за останнє десятиріччя дійсний "прорив" у розумінні тонких молекулярних механізмів виразкової хвороби шлунка, істотного прогресу в лікуванні цієї хвороби досягти не вдалось. Застосування сучасних засобів лікування не дає бажаних результатів, у зв'язку з цим хвороба набуває затяжного характеру. Останнім часом помітно активізувалися дослідження, які спрямовані на розробку нових противиразкових препаратів природного походження, а саме антиоксидантів. До таких природних антиоксидантів можна віднести сквален і амівіт.

Сквален – це вуглецева сполука, яка є похідною ізопрена, попередник тритерпенів та стероїдних сполук. Відомим джерелом сквалену є амарантове масло. Препарат має широкий спектр позитивних фармакологічних властивостей, сприяє підвищенню загальної резистентності організму. Сквален здатний підвищувати стан імунної системи, забезпечуючи тим самим стійкість організму до різних захворювань. Сквален володіє радіопротекторними властивостями, має високу проникну здатність, оскільки входить до складу клітин покривів шкіри. Амівіт – препарат, до складу якого входять амінокислоти та вітаміни. При моделюванні запальних

процесів було показано, що амівіт діє на речовини, які супроводжують запальний процес – простагландини, лейкотрієни та систему комплементу. При цьому амівіт не тільки гальмує процеси перекисного окиснення ліпідів у мембранах, а також нормалізує концентрацію цитокінів та лімфоцитів, що відповідають за клітинний імунітет. Тобто амівіт проявляє антизапальні та імуномодуючі властивості [2].

Метою даної роботи було визначити активність супероксиддисмутази в клітинах слизової оболонки шлунка щурів у динаміці експериментальної (етанолової) виразки та оцінити вплив препаратів природного походження амівіту та сквалену на ці процеси.

Об'єкти і методи дослідження. В досліді використовували білих щурів лінії Вістар обох статей масою 130-150 г. Щурів утримували на стандартному раціоні виварію. За добу до проведення дослідів щури мали доступ лише до води. Модель експериментальної виразкової хвороби шлунка створювали за методом Окабе [3]. Ізольовані клітини слизової оболонки шлунка отримували за модифікованим методом Левіна та ін. [4]. Активність СОД у клітинах слизової оболонки шлунка визначали за методом, описаним у роботі [5]. Усі показники перераховано на 1 мг білка. Амівіт вводили по 50 мкл 2 рази на добу per os. Сквален вводили одноразово в комбінації з амівітом per os.

Результати та їх обговорення. Супероксиддисмутаза (СОД) – один з ключових антиоксидантних ферментів – каталізує дисмутацію супероксиданіона до пероксида водню та молекулярного кисню. Методи визначення активності СОД базуються на їх здатності інгібувати перетворення деякої індикаторної молекули, при дії супероксидного аніон-радикалу. Це пов'язано з тим, що СОД конкурує за аніон-радикал з індикаторною "пасткою" супероксидного аніона. СОД локалізована та функціонує зазвичай разом з каталазою, що швидко та ефективно розкладає H_2O_2 . Швидкість СОД – реакцій досить велика, константа швидкості другого порядку досягає $2 \cdot 10^9$ моль⁻¹·с⁻¹. Активний центр ферменту містить метали зі змінною валентністю [5].

В результаті дослідження активності СОД в клітинах слизової оболонки шлунка щурів встановлено, що етанолова виразка призводить до суттєвих змін в антиоксидантній захисній системі шлунка щурів. Встановлено, що в динаміці етанолової виразки активність СОД знижується вже на першу добу в 1,3 рази, на п'яту – в 1,75 порівнюючи з контролем і в подальшому залишається зниженою (табл. 1).