

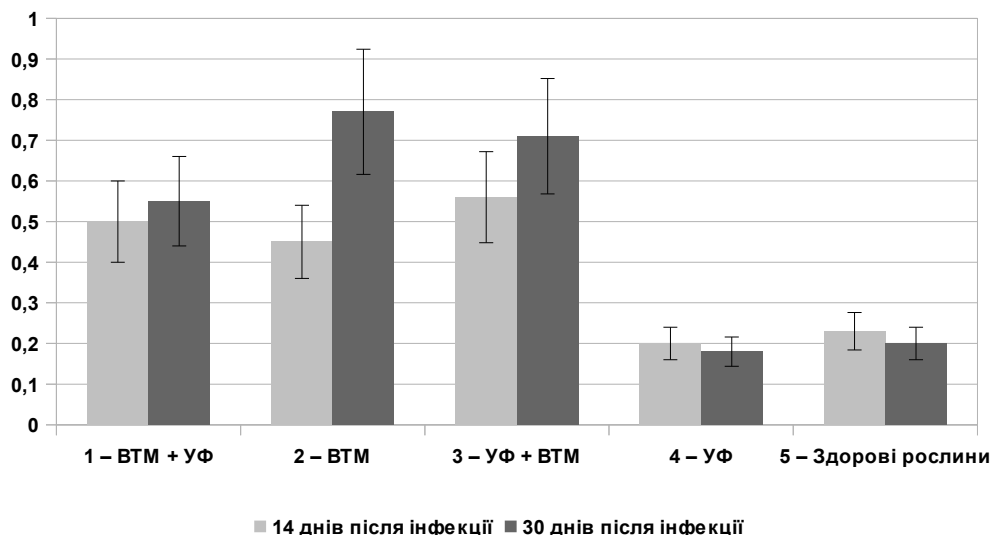


Рис.3. Вміст ВТМ у рослинах тютюну під впливом ультрафіолетового випромінювання типу С на 14 та 30 день після інфекції

Висновки. Досліджено особливості розвитку системної вірусної інфекції під стресовим впливом ультрафіолетового випромінювання типу С у модельній системі "рослини *Nicotiana tabacum* cv. Samsun – вірус тютюнової мозаїки". Показано, що ультрафіолетове випромінювання типу С у стресовій для рослин дозі на віддалено ранніх етапах вірусної інфекції не чинить достовірного впливу на вміст ВТМ у рослинах тютюну. Вперше продемонстровано, що під впливом ультрафіолетового випромінювання типу С відбувається "маскування" типових мозаїчних симптомів вірусної інфекції, не зважаючи на накопичення ВТМ у системно інфікованих рослинах тютюну.

1. A. Dmitriev, O. Shevchenko, V. Polischuk, and N. Guscha Effects of low dose chronic radiation and heavy metals on plants and their fungal and virus infection // Data Science Journal. – 2009. – V.8. – 24 September. – P. 49 – 57. 2. Pyle J.A. Global ozone depletion: observation and theory. Plants and UV-B. Responses to Environmental Change // Cambridge University Press. – 1996. – P.3 –12. 3. Balachandran S. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis // Physiologia Plantarum. – V.100. – P.203-213. 4. Crowther J.R. ELISA. Theory and practice. – N.Y.: Humana Press, 1995. – 96 p. 5. Антитела 1. Методи // Под ред. Д. Кэтті – М.: Мир, 1991. – 196 с. 6. Антитела 2. Методи // Под ред. Д. Кэтті – М.: Мир, 1991. – 216 с.

Надійшла до редколегії 13.12.11

УДК 577.151.6:612.115:616-005

Н. Бурлова-Васильєва, канд. біол. наук,
О. Савчук, д-р біол. наук, Л. Остапченко, проф.

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ АГРЕГОМЕТРІЇ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ НА ТРОМБОЦИТИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК

В статті описано підходи до визначення біологічних властивостей компонентів отрути *Agkistrodon blomhoffi usuriensis*. Визначено дві субстанції, які мають здатність інгібувати агрегацію тромбоцитів *in vitro*. Ступінь інгібування залежить від концентрації ефектора і від часу його інкубації з пробом.

This report reviews the scientific approaches used during the investigation of *Agkistrodon blomhoffi usuriensis* venom components. It was shown that the venom contained two components inhibiting platelet aggregation. The inhibition extent depended on effector concentration and incubation time.

Вступ. Застосування методу агрегометрії є одним з найпоширеніших підходів аналізу стану тромбоцитарної ланки гемостазу. Даний метод дозволяє дослідити не лише процес агрегації, а й оцінити адгезивну та секреторну функцію тромбоцитів. Тромботичні ускладнення є основною причиною розвитку таких важких захворювань, як інфаркт міокарда різної етіології, атеросклероз, гіпертонія і порушення мозкового кровообігу. Саме тому проблема ефективної діагностики стану тромбоцитарної ланки гемостазу та тестування ефективності фармацевтичних препаратів привертає особливу увагу.

Для лікування патологічного тромбоутворення на сьогоднішній день найбільш ефективними є антиагрегантна і тромболітична терапії. Значна кількість антиагрегантів, які застосовують у медичній практиці, отримані/розроблені на основі білків зміїної отрути [11, 5]. Отрути є багатим джерелом протеолітичних ферментів, які застосовуються чи можуть бути застосовані для діагностики серцево-судинних захворювань, а також для лікування і профілактики тромботичних ускладнень. Таким

токсинам притаманні як прокоагулянтні, так і антикоагулянтні властивості, а також здатність впливати на функціонування ендотеліоцитів та тромбоцитів [6, 2, 14].

У даній роботі ми описуємо застосування методу агрегометрії для визначення характеристик компонентів отрути, які впливають на функціонування тромбоцитів з метою виділення білків, які мають терапевтичну цінність.

Об'єкт та методи досліджень. У роботі використовували плазму крові кроля, збагачену тромбоцитами. Кров відбирали пункцією вушної вени з додаванням розчину цитрату натрію (38 г / л) в кінцевому співвідношенні 9:1 і центрифугували 20 хв за 150 g і температури 20° С. Надосадову рідину, яка містила тромбоцити, відбирали і перевіряли клітини на активність за допомогою АДФ. При внесенні в пробу 2,5 мкм індуктора спостерігали агрегацію тромбоцитів.

Агрегаційну активність реєстрували за допомогою агрегометра AP2110 фірми "Солар" (Білорусь). Реєстрували такі параметри агрегаційної кривої, як ступінь агрегації (%) максимальний рівень світлопропускання плазми крові після внесення ефектора. За 1 одиницю

© Бурлова-Васильєва Н., Савчук О., Остапченко Л., 2012

активності інгібітора агрегації тромбоцитів приймали 50% інгібування АДФ-залежної агрегації клітин контрольного зразка. Зміст тромбоцитів стандартизували за показаннями приладу, концентрація клітин становила приблизно 200 000 в мкл кожної проби.

Результати та їх обговорення. До складу зміїної отрути входить ряд компонентів, які впливають на функціонування тромбоцитів. Серед них інгібітори агрегації тромбоцитів, які сприяють припиненню тромбоутворення на стадії формування тромбоцитарних агрегатів. Інгібітори агрегації тромбоцитів ще відомі під назвою дезінтегрини. Вони являють собою пептиди з молекулярною масою 5 – 8 кДа [4, 1]. На сьогоднішній день найбільш ефективними з антиагрегантних препаратів є антагоністи і блокатори глікопротеїнових рецепторів тромбоцитів GP IIb/IIIa. Са-залежний глікопротеїновий IIb / IIIa комплекс – основний рецептор на поверхні клітин і може взаємодіяти з одним з чотирьох протеїнів: фібриногеном, фібронектином, фактором фон Віллебранда і вітронектином (всі містять RGDдомен).

RGD-вмісні білки з отрути змій інгібують агрегацію тромбоцитів шляхом зворотного блокування GPIIb/IIIa рецептора [10]. Інгібування RGD-залежних інтегринів є основною метою фармакологічних досліджень в області багатьох захворювань. Блокування інтегральних рецепторів на тромбоцитах, особливо IIb/IIIa, може також мати застосування в лікуванні певних типів раку [7, 9, 3]. Добре відомо, що тромбоцити беруть участь в механізмах, відбуваються під час росту пухлини, ангиогенезу і утворення метастазів [8].

Зміїні отрути також є найбільш ефективним джерелом фосфоліпази A2. Фосфоліпази з отрути змій розрізняються за своєю структурі і мають безліч ізоформ, во-

ни вміщують від 1 до 5 гомологічних доменів, які складаються з 120 амінокислот, і мають молекулярну масу 14 – 17 кДа. Ферменти містять гістидин в каталітичному центрі і виявляють фосфоліпазну активність у присутності мілімолярних концентрацій кальцію. Вони мають висококонсервативні амінокислотні послідовності в каталітичному центрі і ділянці кальційзв'язуючої петлі, а також 6 – 8 консервативних сульфідних містків. В активному центрі знаходиться також аспартат, який спільно з кальційзв'язуючим доменом виконує роль кишень для іона Ca^{2+} . Ці ферменти каталізують гідроліз фосфоліпідів у позиції 2 з вивільненням жирної кислоти і відповідного лізофосфоліпиду [13]. Фосфоліпази класу A2 з отрути змій виявляють широке розмаїття фармакологічних ефектів, порушуючи протікання фізіологічних процесів [12]. Фермент активує каскад запальних реакцій, які характеризуються підвищенням проникності капілярів і формуванням набряку, зосередження лейкоцитів і вивільнення запальних медіаторів, що призводить до численних системних і локальних запальних процесів у людей. Принципу і механізму дії фосфоліпази може дати ключ до розуміння отруйної дії зміїного укусу і допомогти в розробці альтернатив традиційним протиотрутам. Ці ферменти є дуже токсичними і впливають на функціонування тромбоцитарної ланки системи гемостазу за рахунок розщеплення мембранних трогліцеридів.

Як бачимо з Рис. 1. у складі отрути виявлено компоненти, які інгібують агрегацію тромбоцитів. Найбільш ефективними інгібіторами є фракція 2 та фракція 3. Подальше дослідження цих компонентів з використанням специфічних хромогенних та флюорогенних субстратів дозволить встановити, до якої групи належить ці інгібітори.

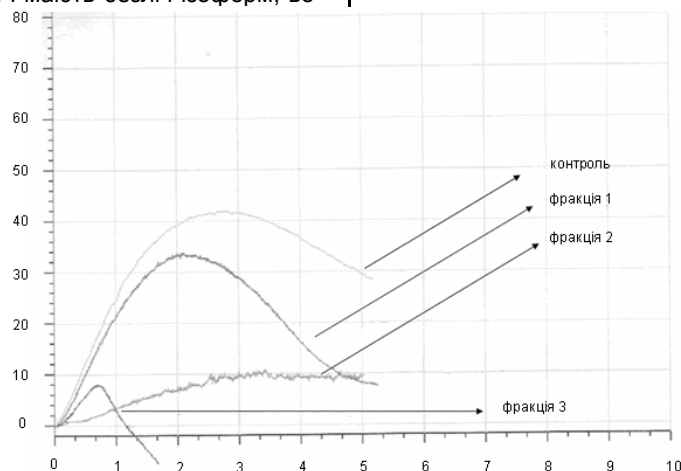


Рис. 1. Вплив різних фракцій отрути *Agkistrodon blomhoffi usuriensis* на агрегацію тромбоцитів

На Рис. 2. представлені дані інгібування агрегаційної активності тромбоцитів фракцією 3 отрути *Agkistrodon blomhoffi usuriensis*. Максимальний ефект інгібування проявляє доза, що дорівнює 1/5 від загального об'єму проби. У цьому випадку ступінь АДФ-залежної агрегації становить 4%, що нижче контрольного показника у 14 разів.

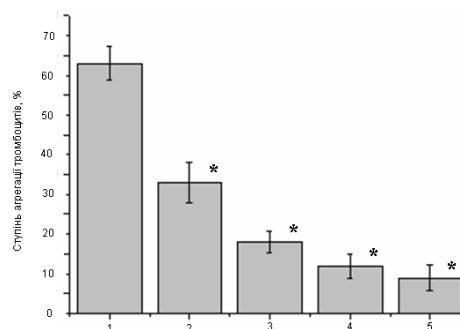


Рис. 2. АДФ-залежна агрегація тромбоцитів під дією фракції 3:

(1) контроль; та під дією фракції в кількості, рівній 1/25 загального об'єму проби (2), 1/12 загального об'єму проби (3), 1/6 загального об'єму проби (4), 1/5 загального об'єму проби (5)
* – $P \leq 0,05$ відносно контролю.

На Рис. 3. представлені дані інгібування агрегаційної активності тромбоцитів фракцією 2. Як видно, ступінь АДФ-залежної агрегації під впливом компоненту фракції склала 35%, в той час як для контрольного зразка цей показник дорівнює 52%.

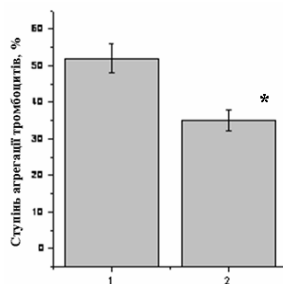


Рис.3. АДФ-залежна агрегація тромбоцитів під дією фракції 2:

(1) контроль; та під дією фракції в кількості, рівній 1/5 загального об'єму проби (2)

* – $P \leq 0,05$ відносно контролю.

Висновки.

1. За допомогою методу агрегометрії виявлено компоненти отрути *Agkistrodon blomhoffi usuriensis*, які інгібують агрегацію тромбоцитів. Дані компоненти можуть бути перспективними для використання у медицині як антиагрегантні препарати.

УДК 575.23: 595.773.4

- Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA. Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venoms // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – V. 195. – P. 168 – 172.2. Hutton R. A., Warrell D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system // Blood. – 1993. – V. 7, № 3. – P. 176 – 189. 3. Knudsen KA, Tuszyński GP, Huang TF, Niewiarowski S. Trigramin, an RGD-containing peptide from snake venom, inhibits cell-substratum adhesion of human melanoma cells // Exp. Sell Res. – 1988. – V. 179, №1. – P. 42 – 53.4. Marcinkiewicz C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication // Curr. Pharm. Des. – 2005. – V. 11, № 7. – P. 815 – 827.5. Markland F. S. Snake venoms and the hemostatic system // Toxicon. – 1998. – V. 36, № 12. – P. 1749 – 1800.6. Matsui T., Fujimura Y., Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis // BBA. – 2000. – V. 1477. – P. 146 – 156. 7. Rucinski B. Niewiarowski S, Holt JC, Soszka T, Knudsen K. Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – V. 1054, № 3. – P. 257 – 264. 8. Ruggeri Z. M. Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation // J. Clin. Invest. – 2000. – V. 105, № 6. – P. 699 – 701. 9. Sozka T, Knudsen KA, Bevilacqua L, Rossi C, Poggi A, Niewiarowski S. Inhibition of murine melanoma cell-matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris* // Exp. Sell Res. – 1991. – V. 196, №1. – P. 6 – 14.10. Trikha M., Nakada M. T. Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy // Semin. Thromb. Hemost. – 2002. – V. 28, № 1. – P. 39 – 44.11. Tu A. T. Overview of snake venom chemistry // Adv. Exp. Med. Biol. – 1996. – V. 391, № 5. – P. 37 – 62.12. Valentin E., Lambeau G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1488, № 1-2. – P. 59 – 70.13. Verheij H. M., Boffa M. C., Rothen C., Bryckert M. C., Verger R., de Hass G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A2 // Eur. J. Biochem. – 1980. – V. 112, № 1. – P. 25 – 32.14. White J. Snake venoms and coagulopathy // Toxicon. – 2005. – V. 45. – P. 951 – 967.

Надійшла до редколегії 12.12.11

С. Серга, асп., С. Демидов, д-р. біол. наук,
С. Крамаренко, канд. біол. наук, І. Козерецька, канд. біол. наук

ЕНДОСІМБІОТИЧНІ БАКТЕРІЇ РОДУ *WOLBACHIA* ТА МУТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Wolbachia надзвичайно поширена бактерія в природних популяціях популярного модельного об'єкту *Drosophila melanogaster*. Проте причини такого поширення залишаються не розкритими. У наведеній роботі продемонстровано, що мутантні особини за геном *mei-41* (*meiotic-41*: 1-54.2) за впливу радіоактивного випромінювання у дозі 500 R виживають краще у випадку їх інфікованості ендосимбіотичною бактерією *Wolbachia*. Виживання мутантних особин може призводити до підвищення відсотка поліморфізмів в популяціях *D. melanogaster*.

The bacteria *Wolbachia* are extremely wide-spread in natural populations of the popular model species *Drosophila melanogaster*. Still, the reasons behind its ubiquitous presence remain unclear. In the present work, we demonstrate that fruit flies with a mutant *mei-41* (*meiotic-41*: 1-54.2) gene exposed to a 500 R radiation dose survive better if infected with the endosymbiotic *Wolbachia*. The survival of mutant individuals might lead to elevated rates of polymorphism in *D. Melanogaster* populations.

Вступ. Дослідження останніх років дозволили сформулювати нову теорію еволюції, яка базується на усвідомленні того факту, що окремий організм завжди співіснує з цілою низкою представників інших видів, що врешті решт і визначає його долю у кожний конкретний момент його існування [18]. Наші знання механізмів таких взаємодій іще вкрай обмежені, але сьогодні вже відомо, що, патогенні бактерії здатні активувати апоптоз для руйнування клітин організму-хазяїна та швидко розповсюдження в його тканинах, або навпаки гальмувати цей процес для того, щоб залишатися у оточенні клітини якомога довше [19]. Саме останню стратегію використовують бактерії роду *Wolbachia* для мутуалістичного співіснування з деякими безхребетними. Так відомо, що вони гальмують апоптоз у харчуючих клітинах під час овогенезу осі *Aobara tabida* [14] та перешкоджають апоптозу у клітинах зародкового шляху і ембріонах нематод *Brugia malayi* та *Onchocerca volvulus*, для яких *Wolbachia* є облигатним симбіонтом [7]. Механізми впливу бактерії на запуск запрограмованої клітинної смерті залишаються невідомими. Проте описаний відповідний вплив *Wolbachia in vitro* на культурі клітин людини (PMNs – polymorphonuclear cells),

який пов'язаний з інгібуванням апоптозу поверхневим білком бактерії WSP [5].

Wolbachia зустрічається у переважній більшості досліджених сьогодні природних популяцій *Drosophila melanogaster* [15], хоча причини такого явища все ще залишаються не з'ясованими [1; 6; 12; 16].

Вплив *Wolbachia* на мутаційні процеси у виду-хазяїна раніше не досліджувався, хоча, як відомо, мутаційний процес є одним із факторів динаміки популяцій [4].

У наведеній роботі продемонстровано, що мутантні особини за геном *mei-41* (*meiotic-41*: 1-54.2) за впливу радіоактивного випромінювання у дозі 500 R виживають краще у випадку їх інфікованості ендосимбіотичною бактерією *Wolbachia*.

Матеріали та методи досліджень. Лінії *D. melanogaster* та схрещування.

У дослідженні було використано лінії *D. melanogaster*, які представлено у таблиці 1. Лінії утримували на стандартному середовищі (на 1 літр води 6 г агару, 15 г дріжджів, 50 г цукру, 55 г манної крупи).

© Серга С., Демидов С., Крамаренко С., Козерецька І., 2012