

Таблиця 1. Вплив харчових добавок на схожість насіння та утворення хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми *Allium fistulosum* L.

Варіант досліду	Схожість насіння, % Через 72 год	Вивчено анафаз, n	Частота аберантних анафаз, %	X2	Пошкодженість аберантної клітини, %
Дистилят	74 ± 3,10	1053	8,17 ± 0,84	–	132,6
"vita"	55 ± 3,52	337	8,31 ± 1,48	0,17	126,0
"конго"	42 ± 3,49	426	1 1,50 ± 2,48	1,67	126,2
"спорт"	43 ± 3,50	601	7,15 ± 1,04	0,41	127,9
"похудіння"	68 ± 3,30	634	15,77 ± 1,46	22,57	133,0

Примітки: X20,05 = 3,84, X20,01 = 6,63

Як видно з табл. 1, частота аберантних анафаз у клітинах кореневої меристеми батуну у варіантах "vita" і "спорт" залишалась у межах контролю.

Помітне зростання частоти аберантних анафаз спостерігається в меристемних клітинах проростків з варіанту "конго". Однак тут можна говорити лише про тенденцію до наростання, оскільки відмінність між даним варіантом і контролем статистично не значима (табл. 1). Хоча відсутність статистично значимої відмінності в частоті аберантних анафаз між варіантом "конго" і контролем може пояснюватись іншими порушеннями, що привели до втрати життєздатності насіння (табл. 1). До того ж, у мітозних клітинах, крім зростання кількості аберацій, мали місце різні порушення ядра. Перш за все, це К-мітозні метафази, "розбиті" профазы – як перешкода для переходу клітини до стадії анафази, коли аберації враховуються. Багатополісні мітози, що мали місце, так само не враховуються як аберації, однак про цитогенетичну активність препарату загалом можуть свідчити.

Подібні цитогенетичні ефекти спостерігалися нами й у варіанті з препаратом "спорт", тоді як частота аберантних анафаз залишалась на рівні контролю (табл. 1).

У варіанті з препаратом "похудіння" спостерігалось значне підвищення частоти аберантних анафаз з високою оцінкою статистичної достовірності, як це видно з табл. 1.

Що стосується пошкодженості аберантної клітини, то, як видно з тієї ж таблиці, цей показник у дослідних варіантах мало відрізняється від контрольного. Однак статистично достовірне зростання ЧАА за незмінного рівня ПАК у варіанті "похудіння" свідчить про те, що під впливом даного препарату мутаційний процес інтенсифікується за рахунок пошкодження хромосом у нових, ще непошкоджених клітинах, а не шляхом зростання нестійкості хромосом у вже пошкоджених клітинах. Ще виразніша картина спостерігається у варіанті з препаратом "конго". Підвищення ЧАА (хай і не достовірне статистично) супроводжується зниженням показника

ПАК. Отже, і даний препарат, не пошкоджуючи хромосоми в уже пошкоджених клітинах, залучає до мутаційного процесу клітини ще не пошкоджені.

Таким чином, дослідженнями нами харчовим добавкам властива різного ступеню цитотоксична й цитогенетична активність. З них препарат "vita" гальмує поділ клітини, не впливаючи на утворення хромосомних аберацій. Інші досліджувані препарати, крім цитотоксичного ефекту, який позначився на схожості насіння, виявили цитогенетичні ефекти різних механізмів. Якщо пошкоджуюча дія препарату "похудіння" виявляється в підвищенні частоти аберантних анафаз, тобто в прискоренні мутаційного процесу, то препарати "конго" і "спорт" порушують генетичний апарат шляхом інших механізмів.

Незважаючи на закодованість досліджуваних нами препаратів, що не дозволяє проаналізувати можливі механізми впливу кожного з них як на мітотичний апарат, так і на хромосоми, нами було виявлено потенціальну здатність деяких харчових добавок пошкоджувати хромосомний матеріал. Той факт, що всі досліджувані препарати належать до харчових добавок, дозволяє робити висновки про необхідність обов'язкового генетичного тестування всіх харчових добавок, які надходять у виробництво.

1. Aimee L. Jackson and Lawrence A. Loeb. // Genetics. – 1998. – Vol. 148, № 4. – P. 1483–1490. 2. Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J.F. // Genetics. 1998. – Vol. 148, № 4. – P. 1667–1686. 3. Краєчук О.П. Принципові підходи до гігієнічного регламентування пестицидів з урахуванням їх мутагенної активності // Матеріали наук.-практ. конф. "Актуальні проблеми екологічної токсикології", Київ, 28–29 травня 1998. – К., 1998. – Ч. 1. – С. 136–142. 4. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. – М., 1989. – С. 13–160. 5. Grant W.F. // Mutat. Res. – 1982. – Vol. 99. – P. 273–291. 6. Rank J., Nielsen M.H. // Mutat. Res. – 1994. – Vol. 312. – P. 17–24. 7. Fiskesjo G. // Mutat. Res. – 1988. – Vol. 197. – P. 243–260. 8. Лазаренко Л.М. // Автореф. ... дис. канд. біол. наук. – К., 1999. 9. Лакін Г.Ф. Биометрия. – М., 1990. – С. 181–214.

Надійшла до редколегії 30.09.04

УДК 612.438.612.017.1

С.В. Демидов, д-р біол. наук, І.В. Чорна, пров. інж.,
Н.М. Дергай, пров. інж.

ВПЛИВ ТИМАЛІНУ Й ТИМОГЕНУ НА ВМІСТ ДНК І РНК У Т-ЛІМФОЦИТАХ СЕЛЕЗІНКИ МУРЧАКІВ ПРИ СЕНСИБІЛІЗАЦІЇ ТА АНАФІЛАКТИЧНОМУ ШОКУ

Установлено, що збільшення кількості ДНК при сенсibilізації та анафілактичному шоку свідчить про активацію проліферативних процесів в імунокомпетентних клітинах. Виявлено, що застосування тималіну й тимогену призводить до активації генетичного апарату клітин, що у свою чергу активує метаболізм імунокомпетентних клітин, що призводить до проліферації та диференціювання Т-лімфоцитів.

Increasing of DNA content by sensitization and anaphylactic shock reports about activation of proliferation in immunocompetent cells. Tymalin and tymagen use leads to genetic apparatus activation. As result general metabolism of immunocompetent cells is activated causing T-lymphocytes proliferation and differentiation.

Вступ. Розкриття біологічної ролі нуклеїнових кислот як матеріальних носіїв генетичної інформації, діючих на всіх рівнях (при передачі інформації від одного покоління до іншого, її збереженні в індивідуальному організмі, її фенотипічному вираженні) є одним із успіхів молекулярної біології.

ДНК посідає особливе місце, тому що генетична інформація записана в нуклеотидних послідовностях її величезних молекул. У ядрі еукаріот відбувається також утворення субодиниць рибосом шляхом комплексування синтезованих в ядрах рибосомних РНК з рибосомальними білками, які синтезуються в цито-

© С.В. Демидов, І.В. Чорна, Н.М. Дергай, 2005

плазмі й переносяться в ядро. Так, порушення репараційних процесів буде призводити до зміни первинної структури ДНК і автоматично – до зміни структури білків, що вірогідно позначиться на їхній специфічній активності, яка може просто щезнути чи перебудуватися так, що не буде забезпечувати клітинні функції, у результаті чого клітина загине.

Порушення редуплікації ДНК призведуть до зупинки розмноження клітин або до виникнення клітин з неповноцінним набором генетичної інформації, що також згубно для клітин. До такого самого наслідку приведе порушення процесів розподілення генетичного матеріалу (молекул РНК) під час поділу клітини. Випадання в результаті пошкодження ядра чи у випадку порушення будь-яких регуляторних процесів синтезу кожної форми РНК автоматично приведе до зупинки синтезу білка в клітині або до грубих його порушень [1–4]. Збільшення вмісту ДНК при сенсibiliзації та анафілактичному шоку свідчить про активацію проліферативних процесів в імункомпетентних клітинах. Оскільки активація проліферативних процесів у лімфоцитах селезінки сполучена з прискоренням синтезу ДНК, метою наших досліджень є вивчення вмісту нуклеїнових кислот за розвитку гіперчутливості негайного типу й анафілактичному шоку та вплив тималіну й тимогену на ці процеси. Ураховуючи ці міркування, вивчалися зміни вмісту ДНК і РНК у перерахунку на одну клітину селезінки мурчаків при розвитку цих процесів.

Об'єкт і матеріали досліджень. У дослідях використано 50 мурчаків масою 250 ± 25 г. Для розвитку гіперчутливості негайного типу взяли класичну модель імунізації тварин конячою сироваткою.

Спектрофотометричний метод виявлення нуклеїнових кислот заснований на вимірюванні різниці екстинцій перхлорних екстрактів тканин [5]. Наважку тканини від 5 до 500 мг поміщають у центрифужну пробірку з ретельно відміряною кількістю (5–10 мл) 0,5 Н розчину HClO_4 і підігрівують 20 хв на киплячій водяній бані. Після охолодження й центрифугування надосадову рідину використовують для вимірювання абсорбції в ультрафіолетовій області спектра на спектрофотометрі. Вимірювання проводять проти контролю, яким є 0,5 Н HClO_4 при 270–290 нм у кварцових кюветах в 1 см. Різниця між обома величинами, поділена на 0,19, дає кількість мікрограмів нуклеїнового фосфору в 1 мл досліджуваного розчину (0,19 – питома екстинція, яка в межах 270 нм є практично однаковою для РНК і ДНК. Для перерахунку фосфору на кількість нуклеїнових кислот використовують коефіцієнт перерахунку: для РНК – 10,5, для ДНК – 10,1. Таким чином,

$$C = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19},$$

де C – концентрація нуклеїнового фосфору в мл; D_{270} – оптична щільність досліджуваного гідролізату при 270 нм; D_{290} – оптична щільність досліджуваного гідролізату при 290 нм; 0,19 – питома екстинція

В усіх випадках додатково вимірюють оптичну щільність при 260 нм. Узагалі вона дорівнює оптичній щільності при 270 нм з невеликими відхиленнями в межах $\pm 15\%$. Велике відхилення вказує на наявність домішок не нуклеїнового характеру. Для усунення їх попередньо відмивають наважку тканини на холоді 0,2 Н розчином HClO_4 чи знижують температуру нагрівання зі 100 до 70 °C і скорочують термін нагрівання з 20 до 10 хв.

Таблиця 1. Вплив тималіну (2) і тимогену (3) на вміст ДНК і РНК у Т-лімфоцитах селезінки мурчаків при сенсibiliзації та анафілактичному шоку

№	Інтактні тварини		Сенсibiliзовані тварини		Тварини з викликанням анафілактичним шоком	
	ДНК	РНК	ДНК	РНК	ДНК	РНК
1	$3,6 \pm 0,4$ $P_{1,2} > 0,05$	$3,7 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,5^*$ $P_{1,2} > 0,05$	$8,1 \pm 0,4^*$ $P_{1,2} < 0,05$	$5,4 \pm 0,5^*$ $P_{1,2} < 0,05$	$5,6 \pm 0,4^*$
2	$4,2 \pm 0,4$ $P_{1,3} > 0,05$	$4,4 \pm 0,6$	$10,3 \pm 0,9$ $P_{1,3} < 0,05$	$10,7 \pm 0,7$	$7,1 \pm 0,6$ $P_{1,3} < 0,05$	$7,4 \pm 0,7$
3	$4,9 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,7$	$12,6 \pm 0,8$	$12,5 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,5$

1 – тварини, які не отримували препарати; * – імовірність розходжень між показниками в групі тварин, які не отримували препарати; $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Дослідження показали, що розвиток гіперчутливості негайного типу супроводжується збільшенням кількості ДНК у 2,2 раза і становить $7,8 \pm 0,5$ пг на клітину порівняно з $3,6 \pm 0,4$ пг у інтактній групі тварин.

У групі тварин, які перенесли анафілактичний шок, кількість ДНК у клітині була вища, ніж у інтактної, $5,4 \pm 0,3$ пг, однак суттєво нижче, ніж у сенсibiliзованих тварин.

У мурчаків, які отримували препарати, відмічалось підвищення вмісту ДНК у Т-лімфоцитах селезінки (табл. 1). Найбільший стимулюючий ефект мав тимоген. Так, в інтактній групі тварин застосування тимогену призводило до збільшення вмісту ДНК на 40 %, а в групі сенсibiliзованих тварин – на 190 %, у тварин з анафілактичним шоком – на 100 %. Така сама динаміка у тималіну, але з меншими показниками (табл. 1). Отже, і в цьому разі підтверджується, що збільшення вмісту ДНК при сенсibiliзації та анафілактичному шоку свідчить про активацію проліферативних процесів в імункомпетентних клітинах. Застосування препаратів тимуса (тималіну, тимогену) суттєво впливає на ці процеси. Однією з головних властивостей ядерця є синтез рибосомальної РНК. Відомо, що існує залежність між об'єктом

ядерець і концентрацією в них РНК, з одного боку, і кількістю РНК і білка в цитоплазмі з іншого боку.

Отже, розміри, число ядерця можуть бути показниками метаболічних процесів у клітинах, а також критерієм активності ділянок ДНК, які кодують рибосомальні гени за кількісними показниками їхніх продуктів [6, 7]. Характер змін морфологічних показників ядерця відповідає змінам РНК у клітині. Так, сенсibiliзація тварин конячою сироваткою призводить до збільшення концентрації РНК в 1,2 раза. Така сама залежність і при застосуванні препаратів з тимуса.

Висновки. Розвиток алергічних реакцій негайного типу супроводжується змінами імунореактивності лімфоїдних клітин.

Зміна функціональної активності Т-лімфоцитів при сенсibiliзації та анафілактичному шоку є наслідком експресії генетичної інформації (процесів редуплікації та транскрипції).

Збільшення кількості ДНК при сенсibiliзації та анафілактичному шоку свідчить про активацію проліферативних процесів в імункомпетентних клітинах.

Сенсibiliзація тварин конячою сироваткою приводить до збільшення відношення РНК/ДНК у Т-лімфо-

цитах з 1,04 в інтактної групи тварин до 2,28 у сенситивізованих, що показує на активацію процесів транскрипції в Т-лімфоцитах.

Застосування тималіну й тимогену приводить до активації генетичного апарату клітин, а це у свою чергу активує метаболізм імунокомпетентних клітин, що приводить до проліферації та диференціації Т-лімфоцитів. Найбільшу активність має тимоген.

УДК 616.34+577.115

1. Свенсон К., Узбестер П. // Клетка. – М., 1980. 2. Де Робертис Е., Новинский В., Сазс Ф. // Биология клетки ядра. – М., 1974. 3. Ченцов Ю.С., Поляков В.Ю. // Ультраструктура клеточного ядра. – М., 1974. 4. Зегенбуш Г. // Молекулярная и клеточная биология. – М., 1982. – Т. 1, 2. 5. Кучеренко М.С. // Биохимия нуклеиновых кислот. – К., 1976. – С. 190–204. 6. Хесин Л.Е. Размеры ядер и функциональное состояние клеток. – М., 1967. – С. 14. 7. Zweite L., Dex.V. // Activity of bith mouse and Chinese hamster ribosomal RNA genes in somatic cell hybrids // Exptl. cell Res. – 1979. – Vol. 123. – P. 424–428.

Надійшла до редколегії 10.04.04

В.А. Ковальова, інж., Л.І. Кузьменко, асп.,
Ю.В. Степанов, канд. біол. наук, Л.І. Остапченко, д-р біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ТИРОЗИНОВОЇ ПРОТЕЇНКІНАЗИ В МЕМБРАНАХ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ВИРАЗКИ

Досліджено активність тирозинової протеїнкінази в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів у нормі й за дії різних ульцерогенних чинників. Показано, що у тварин з ерозивно-виразковими ушкодженнями слизової, викликаними аспірином, етанолом і стресом, активність тирозинової протеїнкінази змінюється по-різному: при аспіриновій і етаноловій виразках вона зменшується, а при стресовій підвищується.

Activity of tyrosine protein kinase in stomach mucous cell membranes in rats under different ulcerogenic factors action was investigated. It was shown that activity of tyrosine protein kinase changes in different ways in animals with erosive-ulcerous damages of mucous caused by aspirin, ethanol and stress. Under aspirin and ethanol ulcers it decreases but it increases under stress model.

Протягом останніх десятиріч у сфері інтенсивних наукових досліджень знаходиться патологія органів травлення. Виразкова хвороба шлунка – найпоширеніше захворювання органів травлення. Виразковий процес у шлунка є кінцевим етапом складного захворювання, у патогенез якого включені центральна нервова система, загальна ендокринна система, біогенні аміни та поліпептиди травної системи. Крім того, у механізмах утворення виразки беруть участь місцеві агресивні фактори й порушення механізмів захисту епітелія слизової оболонки [1].

Сьогодні виявлено суттєві зміни у функціонуванні тирозинових протеїнкіназ при патології органів травлення. Дослідження цих ферментів викликає певний інтерес, тому що тирозинові протеїнкінази залучені до здійснення важливих метаболічних процесів, зокрема ростових функцій, передачі внутрішньоклітинних сигналів, імунної відповіді тощо. Активність тирозинових протеїнкіназ дуже часто асоціюється з проліферацією пухлин.

Метою роботи було дослідити активність протеїнкіназ у мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів в умовах дії різних ульцерогенних чинників.

Матеріали та методи. Експерименти проводили на щурах-самцях з масою тіла 150–200 г. Тварин було поділено на 4 групи (по 10 тварин у кожній). 1 група – контроль; 2, 3, 4 групи – щури, в яких моделювали аспіринову, етанолову та стресову виразку [2]. Визначення активності тирозинових протеїнкіназ проводили за рекомендаціями [3]. Про активність тирозинових протеїнкіназ судили за включенням $^{32}\text{P}_\text{H}$ із ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}$)-АТФ) в ангіотензин II.

Результати та їх обговорення. Тирозинові протеїнкінази – це бісубстратні ферменти, які каталізують переніс фосфатних груп від АТФ на Туг залишки білкових субстратів. Фізіологічна активність рецепторних тирозинових протеїнкіназ забезпечується компенсаторною дією системи рецепторних тирозинових фосфатаз, яка спрямована на автофосфорильовані тирозинові залишки, що входять до структури каталітичних доменів рецепторів ЕРФ. Таким чином, зв'язування рецепторних тирозинових протеїнкіназ цілком залежить від ступеня їх автофосфорильовання [4].

Надмірна чи невідповідна продукція гормонів, лігандів (ростових факторів), рецепторів, тирозинових протеїнкіназ або їхніх субстратів може призводити до надлишкового росту клітини. Будь-яке помилкове збільшення активності тирозинових протеїнкіназ у рамках сигнальної трансдукції

викликає дисбаланс системи контролю росту нормальних клітин, що спричиняє клітинну трансформацію [5].

Відомо, що активація ЕРФ-рецепторних тирозинових протеїнкіназ відбувається за міжмолекулярним механізмом шляхом взаємодії з цитокінами родини ЕРФ. ЕРФ регулює регенерацію епітеліоцитів слизової оболонки шлунка. Зниження секреції ЕРФ веде до підвищення секреції НСІ.

Визначення активності указаної кінази показало, що за умов розвитку різних експериментальних моделей виразок шлунка, його активність змінюється по-різному: при аспіриновій і етаноловій моделях виразки шлунка спостерігалось зниження активності тирозинової кінази, а при стресовій активність ферменту зростає (рис. 1).

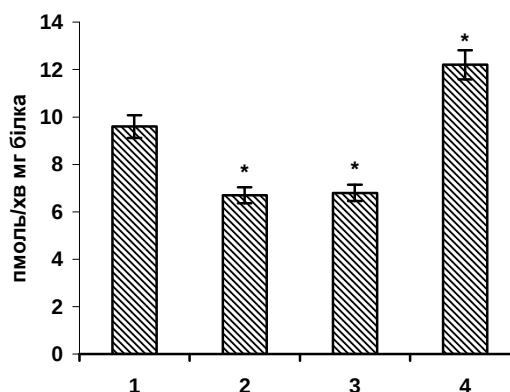


Рис. 1. Активність тирозинової протеїнкінази в мембранах клітин слизової оболонки шлунка щурів при різних експериментальних моделях виразки (1–контроль; 2–аспірин; 3–етанол; 4–стрес)

Підвищення активності ЕРФ-рецепторних тирозинових протеїнкіназ при стресовій виразці може свідчити про виникнення порушень у взаємодії ЕРФ з його мембранними рецепторами. Крім того, виявлений ефект може бути пов'язаним із залученням інших механізмів, які викликають гіперактивацію ЕРФ-рецепторних тирозинових кіназ за умов розвитку даної патології. Серед таких механізмів, перш за все, можуть бути конформаційні перебудови структури ферменту, які можуть привести до порушення його взаємодії з субстратами фосфотрансферної реакції та з регуляторами його активності.