

Введення індукторів циклоферону циклоферону, тилорону та полі(І)полі(С) призводило до зростання активності 2',5'-олігоаденілат-синтетази на 32%, 34% та 14%, відповідно, у порівнянні з контролем (рис.1).

При дослідженні впливу мікрогравітації на активність 2,5А-синтетази тимоцитів щурів за умов преінкубації з індукторами інтерферону нами було встановлено, що введення циклоферону, тилорону та полі(І)полі(С) призводило до зростання активності ферменту на 49%, 35% та 50%, відповідно, у порівнянні з контрольними значеннями (рис.1). Максимальну зміну активності 2,5А-синтетази викликало введення тилорону, внаслідок якого активність ферменту зросла на 35 % у порівнянні з контролем без кліностагування та на 10 % у порівнянні з контролем за умов кліностагування. Активацію ферменту 2',5'-олігоаденілат-синтетази можна оцінити як виявлення компенсаторних механізмів імунотропних клітин на вплив пошкоджуючого фактору космічного середовища (мікрогравітації), що, можливо, є пов'язаним із стимуляцією синтезу інтерферону. Оскільки різні індуктори інтерферону посилюють активуючу дію цього фактору на 2',5'-олігоаденілат-синтетазу, це дає підстави припустити, що їх дія викликає підвищення вмісту ендогенного інтерферону в клітинах.

Висновки. Таким чином, за умов дії мікрогравітації відбувається зростання активності ключового ферменту

системи 2',5'-олігоаденілату – 2,5А-синтетази. Це дає підставу вважати, що за умов дії трансформованого середовища відбувається активація процесів сигнальної трансдукції в інтерферон-індукованій системі 2',5'-олігоаденілату, яка може реалізуватися через індукцію інтерферону в лімфоцитах та, як наслідок, посилення експресії генів індукваних ним ферментів. Введення індукторів інтерферону різного спектру дії призводить до подальшого зростання активності цього ферменту, що дозволяє провести корекцію патологічних змін в клітинах та посилити компенсаторні реакції імунної системи у відповідь на дію факторів космічного польоту.

1. Гамалєв Н.Ф., Шишко Е.Д., Горобець О.Б. // Космічна наука і технологія. – 2004. – т. 10, № 5/6. – С. 204 – 207. 2. Головенко М.Я., Борисюк І.Ю. // Клінічна фармація. – 2005, №4 (9). – С. 32-35. 3. Лобенко А.О., Тавар-ткладзе Н.Є. // Вісник морської медицини- 2000, № 3 (11). – С.13-17. 4. Соколова К.М., Лопатина О.А., Носик Н.Н. и др. // Бюл. Эксп. Биол. Мед. – 1993. – т. 115, № 6. – С. 633-634. 5. Cogoli A. // J. Leukoc. Biol. – 1993. – v. 44, № 3. – P. 259-268. 6. Cogoli A., Cogoli-Greuter M. // Adv. Space Biol. Med. – 1997. – v. 6. – P. 33-79. 7. Justensen J., Kjeldgaard N. O. // Anal. Biochem. – 1992. – v. 207, № 1. – P. 90-93. 8. Justesen J., Ferbus D., Thang M. N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1980. – 77, N 8. – P. 4618-4622. 9. Popovich I. G., Zabezhinski M. A., Kovalenko A.L. et al. // Cancer. Lett.-2000. – 148, N 2. – P.215- 219. 10. Sangfelt O., Ericson S., Grandt D. // J. Interferon. Res. – 2000. – v. 10. – P. 198-215.

Надійшла до редколегії 27.03.09

УДК 577.151.645:575.174.015.3

Д. Радіонов, зав. лаб., А. Андрієвський, канд. біол. наук, доц.,
І. Козерецька, канд. біол. наук, доц.

АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ ІЗОФОРМ ЕСТЕРАЗ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* З ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЙ УКРАЇНИ

Використовуючи метод лужного електрофорезу у поліакриламідному гелі, розділяли форми карбоксиестераз самців та самок Drosophila melanogaster із восьми природних популяцій України. Провели порівняння рівня експресії чотирьох ізоформ карбоксиестераз в досліджуваних популяціях. Проаналізовані полові та міжпопуляційні різниці в активності вивчаємих молекулярних форм карбоксиестераз.

The variety of carboxyesterases' molecular forms of male and female of Drosophila melanogaster from eight natural populations of Ukraine has been studied by the method of polyacrylamide gel alkaline electrophoresis. The expressions of four isoforms of carboxyesterases have been compared. Sex and interpopulation differences of carboxyesterases activity have been analyzed.

Вступ. Адаптація до умов навколишнього середовища супроводжується численними фізіологічними та біохімічними змінами, які торкаються більшості систем і структур організмів. Зміна активності ферментів є важливим і швидким засобом змінити функціональну активність біологічних систем, що сприяє пристосуванню тварин до впливу різних зовнішніх факторів [2]. Одну з головних ролей у цих процесах відіграє регуляція активності гідролітичних ферментів, які виконують в організмі функцію підтримання фізіологічного балансу різних біологічно активних речовин. Тому вивчення стану цих ферментативних систем у організмів, що мешкають на територіях з різними екологічними умовами, є ефективним методом оцінювання їх адаптивних можливостей. Одним з найбільш зручних і недостатньо вивчених ферментів у *Drosophila melanogaster* є естерази, що характеризуються широким спектром ізоформ і аллоформ [1, 3, 6].

У зв'язку з цим, метою даної роботи було вивчення спектру ізоформ карбоксиестераз і аналіз їхньої активності у самців і самок імаго *Drosophila melanogaster* з різних природних популяцій України.

Об'єкт та методи досліджень. Для досліджень використовували імаго *Drosophila melanogaster* трьохдобового віку восьми лабораторних популяцій, яких розводили методом масових схрещувань протягом 4-х поколінь, засновники яких були вилучені в 2008 році з природних популяцій на різних територіях України: Водойма – охолоджувач ЧАЕС, Чорнобиль, Пирятин,

Одеса, Магараж, Київ, Варва і Лубни. Розвиток мух відбувався при температурі 25 °С на стандартному поживному середовищі [4].

Для отримання екстрактів тканин окремо взятих 8 самців і 7 самок з кожної популяції (попередньо наркотизованих дітиловим ефіром) гомогенізували протягом 2 хвилин в 10 мкл гліцерин – NaOH буферу рН 9,0 що містить 1% тритон Х-100. Гомогенати центрифугували при 12 000 г протягом 15 хвилин при + 4 °С. До приготованих екстрактів додавали 5 мл 0,01% розчину бромфенолового синього, після чого здійснювали електрофоретичний розподіл в системі лужного (рН 8,3) вертикально-пластинчатого 7,5% поліакриламідного гелю, далі гелеві блоки відмивали дистильованою водою. Наявність різних молекулярних форм естераз визначали за допомогою реакції азосполучення продуктів розщеплення α - та β -нафтилацетатів з сіллю діазонія використовуючи як інкубаційне середовище 25 мл 0,1 М тріс – гліциновий буфер рН 7,4.

Через 20 хвилин інкубації ферменти інактивували термічною обробкою. Активність і рухливість в гелевому блоці ферментів визначали за допомогою ліцензійної комп'ютерної програми аналізатора спектрів зображень "АнаІС" (Поджарський, Рибалка, 2004, Україна) і відображали в одиницях оптичної щільності ($\Delta \bar{D} \circ$) і одиницях рухливості (Rf) відповідно. Статистичну обробку отриманих даних проводили, користуючись комп'ютерною програмою "Excel" з пакета "MS Office" [5].

Результати та обговорення. Результати електрофоретичного аналізу виявили наявність 4 форм естераз в екстрактах тканин самців і самок імаго *Drosophila melanogaster* трьохдобового віку у всіх досліджених популяціях з відповідними показниками Rf: 0,130 (ацетилхолінестераза), 0,150 (ацетилестераза або С-естераза), 0,340 та 0,350 (аллозими β-специфічної карбоксіестерази). Найбільш рухливі молекулярні форми β-специфічних естераз були присутні одночасно не у всіх досліджених екстрактах, в залежності від наявності в генотипі мух алелів які кодували різні форми ферменту (S- і F-аллозими). Як демонструє малюнок 1А, найбільша активність ацетилхолінестерази (Rf 0,130) спостерігалась у самців з популяцій самих південних регіонів України (Одеса та Магарач), а також у самок з популяцій Водойма – охолоджувач ЧАЕС і Лубни. Відповідно в цих же популяціях спостерігався достовірний статевий диморфізм по експресивності даної ізоформи естераз. У екстрактах тканин мух з інших популяцій достовірних між популяційних і внутрішньопопуляційних статевих відмінностей не спостерігалось (рис. 1А).

Найвища активність С-естерази (Rf 0,150) спостерігалась у самців з популяцій Варва, Одеса та Магарач і у самок популяції, яка існує на березі водойми – охолоджувача ЧАЕС (мал. 1Б). Найнижча активність ідентифікована у самок популяції Варва і імаго обох статей Київської популяції. Найбільші між статеві відмінності за

ступенем експресивності даної молекулярної форми ферменту спостерігалися в популяції Варва, де активність С – естерази у самців перевершувала аналогічну активність у самок більш ніж у 4 рази. Достовірно вище активність цієї карбоксіестерази у самців спостерігалась нами також у популяціях Лубни, Магарач та Одеса. В той же час, в популяціях Водойма – охолоджувач ЧАЕС і Чорнобиль активність ацетилестерази була вищою у самок. У популяціях *Drosophila melanogaster* з м. Пирятин та м. Києва достовірних статевих відмінностей за даним показником не спостерігалось (рис. 1Б).

Аналіз рівня експресії S-аллозиму β-специфічної естерази (мал. 1В) показав що він найбільш високий у самців *Drosophila melanogaster* з популяції Магарач, Одеса та Водойма – охолоджувач ЧАЕС і у самок з Чорнобильської популяції, і найбільш низький у самок, які походять з популяції в м. Києва. Підвищена активність даного аллозиму у самців, у порівнянні з самками, встановлена в популяціях Лубни, Магарач, Одеса та Водойма – охолоджувач ЧАЕС (у всіх зазначених випадках активність ферменту у самців була в 2 рази вища ніж у самок) і в Київській популяції, де не зважаючи на низький загальний рівень експресивності S-аллозиму β-специфічної естерази в порівнянні з іншими досліджуваними групами, активність ферменту у самців була вища за аналогічний показник самок більш ніж у 3 рази.

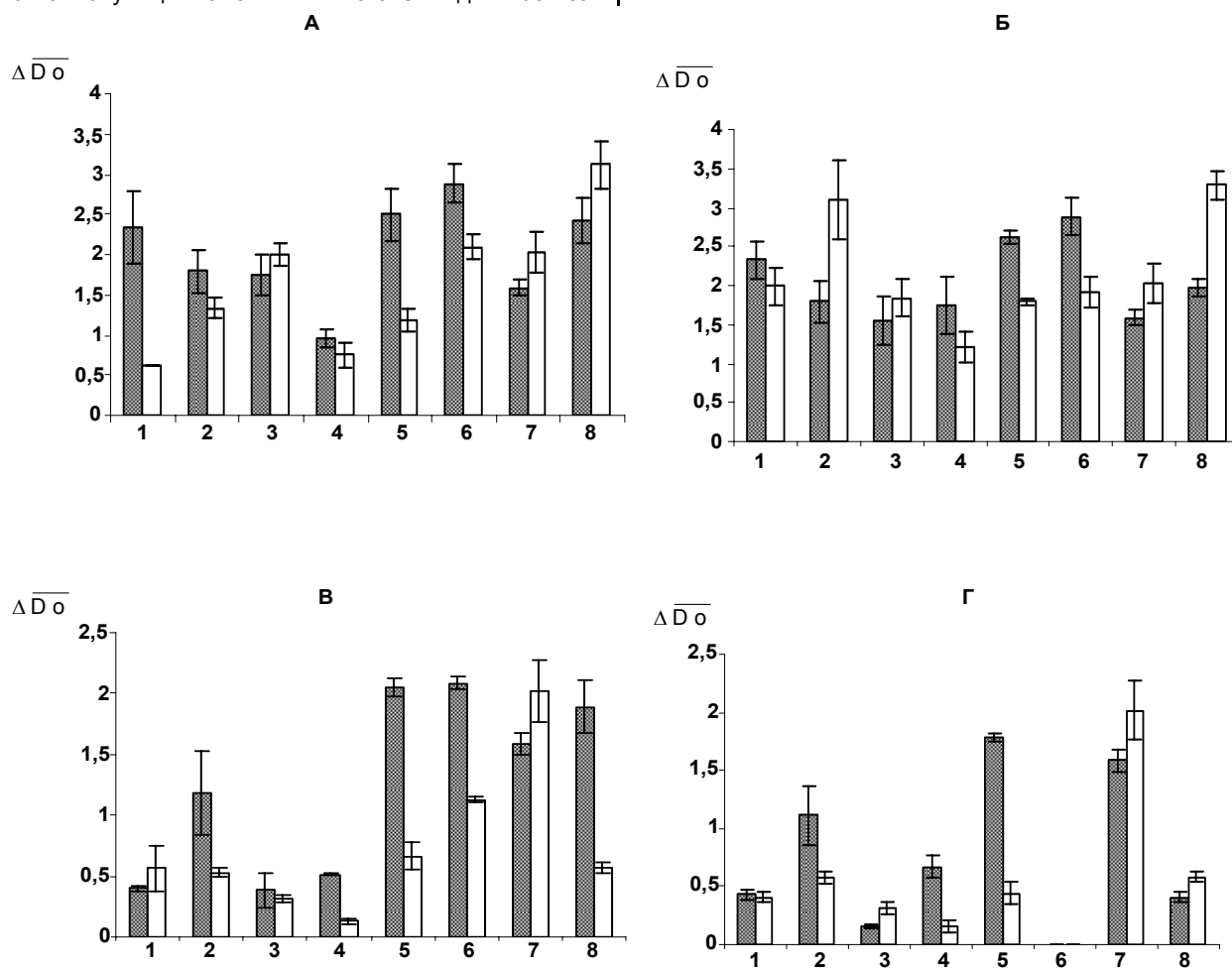


Рис. 1. Порівняльна характеристика активностей ізоформ карбоксіестераз імаго самців і самок *Drosophila melanogaster* з різних природних популяцій України:

А – ацетилхолінестераза (Rf 0,130), Б – ацетилестераза або С-естераза (Rf 0,150), В – S-аллозім β-специфічної естерази (Rf 0,340), Г – F-аллозім β-специфічної естерази (Rf 0,350); 1 – Варва, 2 – Лубни, 3 – Пирятин, 4 – Київ, 5 – Магарач, 6 – Одеса,

7 – Чорнобиль 8 – Водойма – охолоджувач ЧАЕС, ■ – самці □ – самки

Протилежна тенденція, коли активність даної форми карбоксистераз була вище в екстракті тканин самок, показана тільки для Чорнобильської популяції. У мух в популяціях Варва та Пирятин статевих відмінностей не встановлено (мал. 1В). Активність *F*-аллозима β -специфічної естерази була найвищою у самців магарачської і самок чорнобильської популяції. Мінімальна активність відзначалася у самців, які походять з популяції м. Пирятин і у самок з популяції м. Київ (рис. 1Г). У особин *Drosophila melanogaster* з Одеської популяції ця форма естерази виявлена не була. Достовірно вищий рівень експресії цієї ізоформи у самців спостерігався в популяціях Лубни, Київ і Магарач, і у самок з популяції Пирятин, Чорнобиль і Водойма – охолоджувач ЧАЕС. У популяції Варва статевий диморфізм за даною ознакою відсутній. Слід зазначити, також, що в середньому рівень експресії *F*-аллозима β -специфічної естерази був нижче в одних випадках (у самців популяцій Пирятин, Магарач і Водойма – охолоджувач ЧАЕС) або достовірно не відрізнявся від рівня активності *S*-аллозима.

Аналізуючи активність всіх досліджених нами ізоформ естераз в природних популяціях України слід зазначити, що самки *Drosophila melanogaster* з Київської популяції мали найнижчий рівень експресивності за всіма чотирма ферментами (рис. 1А – 1Г).

Статевий диморфізм в досліджуваних популяціях мух має різний характер, так, наприклад, в популяціях Варва та Пирятин за трьома ферментами з чотирьох між статевих розходжень не спостерігалось, а в популяціях Лубни, Магарач, Чорнобиль і Водойма – охолоджувач ЧАЕС достовірні статеві відмінності були зафіксовані за всіма чотирма формами естераз. Цікавим, на нашу думку, є той факт, що активність трьох ферментів (ацетилхолінестерази, *C*-естерази і *F*-аллозима β -специфічної естерази) у самок з популяцій з самих радіоактивно забруднених територіях (м. Чорнобиль і Водойма – охолоджувач ЧАЕС) достовірно перевищує

активність естераз самців (рис. 1А – 1Г). Також активність ацетилхолінестерази, *C*-естерази і *S*-аллозима β -специфічної естерази була значно вищою у самців, у порівнянні з самками, що живуть у південних регіонах (Одеса, Магарач) України (рис. 1А – 1Г).

Висновки 1. У досліджених природних популяціях *Drosophila melanogaster* України ідентифіковано чотири форми карбоксистераз.

2. У самців і самок імаго *Drosophila melanogaster* що походять з різних популяцій України спостерігаються суттєві міжпопуляційні і внутрішньопопуляційні статеві відмінності щодо експресії досліджуваних карбоксистераз.

3. У мух Одеської популяції *F*-аллозим β -специфічної естерази не виявлений.

4. У популяціях, які існують у південних регіонах України активність ацетилхолінестерази, *C*-естерази і *S*-аллозима β -специфічної естерази була значно вищою у самок, ніж у самок.

5. Рівень експресії ацетилхолінестерази, *C*-естерази і *F*-аллозима β -специфічної естерази у самок з популяцій що мешкають на самих радіоактивно забруднених територіях (м. Чорнобиль і Водойма – охолоджувач ЧАЕС) достовірно перевищує активність естераз самців з цих популяцій.

1. Андриевский А. М., Тоцкий В. Н. Генетическая структура экспериментальной популяции *Drosophila melanogaster*, полиморфной по локусу β -фильной карбоксистеразы // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 6. – С. 3-10. 2. Глазко В. И., Созинов И. А. Генетика изоферментов животных и растений. – Киев: Урожай, 1993. – 528 с. 3. Корочкин Л. И. Молекулярно-генетические механизмы регуляции тканеспецифической экспрессии генов est S у дрозофилы // Мол. Биология. – 2000. – т. 34, № 5. – С. 736-742. 4. Медведев Н. Н. Практическая генетика. – М.: Наука, 1968. – 294 с. 5. Рокицкий П. Ф. Введение в статистическую генетику. – Минск: Высшая школа, 1978. – 448 с. 6. Healy M.J., Dumancic M.M., Oakeshott J.G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster* // Biochem Genet. – 1991. – N 29. – 365-388.

Надійшла до редколегії 24.06.09

УДК 578.81

О. Андрійчук, канд. біол. наук, Л. Семчук, канд. біол. наук.,
С. Ромашев, пров. інж.

ОТРИМАННЯ МУТАНТНИХ ФАГІВ ІЗ ШИРОКИМ СПЕКТРОМ ЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Отримано *h*-мутанти фагів 216-V2 та 216-KC до резистентних бактерій – *h*-V2 та *h*-KC, відповідно, що мали стабільну літичну активність. Проведено порівняння їх ДНК за допомогою рестрикції специфічними ендонуклеазами *EcoRI*, *EcoRV*, *BglIII* та *HindIII* геномів. Показано, що електрофоретичні профілі отриманих рестрикційних фрагментів НК фагів 216-V₂, 216-KC подібні. За характером розділення фрагментів вихідні фази та їх *h*-мутанти були повністю відмінними.

H-mutants of phages 216-V2 and 216-KC to resistant bacteria *h*-V2 and *h*-KC, respectively, were obtained; they had stable lity activity. Comparison of their genomic DNA was done by restriction analysis. using specific endonucleases *EcoRI*, *EcoRV*, *BglIII* and *HindIII*. It was shown that electrophoretic profiles of the obtained restricted fragments of DNA of phages 216-V₂ and 216-KC were similar. According to the character of obtained fragments, initial phages and their *h*-mutants were absolutely different.

Вступ. Актуальність вивчення впливу абіотичних та біотичних чинників на особливості циркуляції фагів фітопатогенних бактерій в агроценозах зумовлена необхідністю висвітлення процесів, що відбуваються в екосистемах та ефективного впливу на них. Одним із шляхів такого впливу може бути штучне регулювання чисельності фітопатогенної мікрофлори в біоценозі із використанням фагів. Сучасні засоби боротьби з фітопатогенними бактеріями є, зазвичай, хімічними. Їх не можна назвати екологічно чистими та цілком безпечними для природи. Це зумовлює важливість створення препаратів захисту рослин від бактеріальних патогенів із застосуванням їх природних антагоністів – вірусів бактерій (фагів) [6]. Згідно літературним даним, для досягнення більшого ефекту при їх використанні важливо враховувати утворення клонів резистентних бактерій. Подолання їх стійкості можливе при використанні препаратів на основі суміші бактеріофагів. Вони мають складатися

з фагів, як вихідного типу, так і мутантних, за ознакою кола бактерій – хазяїв (*h*-мутантів) [5]. Метою роботи було отримання мутантів фагів з широким спектром ліричної активності та вивчення взаємодії фітопатогенних бактерій та їх фагів.

Об'єкти та методи досліджень. Об'єктом досліджень були фаги 216-V2 та 216-KC фітопатогенного штаму *Erwinia carotovora* st.216 та їх штучно отримані мутанти. В роботі використовували культуру фітопатогенних бактерій, яка була отримана з колекції музею Інституту мікробіології та вірусології ім. акад. Д.К. Заболотного НАН України, відділу фітопатогенних бактерій (штам: *Erwinia carotovora* st.216).

Для вирощування бактерій та титрування фагів використовували готові, комерційні агаризовані поживні середовища, на основі рибного гідролізату. Титр визначали в бляшкоутворюючих одиницях на мл (БУО/мл) по Грація [3].

© Андрійчук О., Семчук Л., Ромашев С., 2009