

МАТЕРІАЛИ Х УКРАЇНСЬКОГО БІОХІМІЧНОГО З'ЇЗДУ 13–17 ВЕРЕСНЯ 2010 р., м. ОДЕСА (доповнення)

МЕТАБОЛІЗМ ЖИРНИХ КИСЛОТ В ОРГАНІЗМІ МЕДОНОСНИХ БДЖІЛ

Л. М. КОВАЛЬСЬКА¹, Я. І. КИРИЛІВ², Ю. В. КОВАЛЬСЬКИЙ²

¹Інститут біології тварин УААН, Львів, Україна;

*²Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій ім. С. З. Гжицького, Україна;*

e-mail: prikarpmed@ukr.net

Динаміка вмісту ліпідів та інтенсивність їхнього обміну в організмі медоносних бджіл є важливим показником, який характеризує його функціональний стан. У різних видів тварин обмін ліпідів організму відбувається по-різному. Медоносні бджоли не є винятком. Енергетичну і біологічну цінність ліпідів бджолиного корму складають, в першу чергу, довголанцюгові жирні кислоти.

Матеріалом для біохімічних досліджень служило бджолине обніжжя, маточне молочко, тканини неплідних і плідних маток медоносних бджіл.

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що найвагомішу частку у складі жирних кислот бджолиного обніжжя займає пальмітинова кислота. Залежно від видової приналежності обніжжя її кількість складає від 22 до 25% від суми всіх кислот. За споживання обніжжя бджоли здатні продукувати інший корм – маточне молочко. Залежно від часу перебування маточного молочка в маточнику зміни концентрації жирних кислот мають переважно синусоїдальний характер. Зі збільшенням віку личинки у маточному молочці зменшується кількість поліненасичених жирних кислот, при цьому зростає вміст насичених жирних кислот. Найбільшу масову частку займають олеїнова, міристинова та стеаринова кислоти, які в сумі складають більше 40% від загальної кількості всіх кислот. Аналізуючи дані досліджень жирнокислотного складу деяких тканин плідних та неплідних маток медоносних бджіл можна зауважити, що в діапазоні жирних кислот з кодом від 8:0 до 14:0 у тканинах плідних маток виявлено нижчий вміст цих кислот. Їхній вміст у структурі жирних кислот складає 1% у плідних маток та 10% – у неплідних. Отже, можна припустити, що у процесі оогенезу в організмі плідних маток використовується більша кількість зазначених вище жирних кислот. Щодо вмісту у тканинах поліненасичених жирних кислот, то у плідних маток їх виявлено у 2 рази більше. Зокрема, лінолевої та ліноленової кислот є більше у 2,3 та 3,5 рази. Серед усіх кислот найвищий вміст був олеїнової кислоти – 66,2%. Її кількість у неплідних та плідних маток практично однакова. Високий вміст олеїнової кислоти у тканинах неплідних і плідних маток медоносних бджіл очевидно є біологічною

особливістю, оскільки у процесі росту з усіх кислот маточного молочка личинка отримує її найбільшу кількість.

Отже, для нормальної життєдіяльності організму медоносних бджіл у раціон мають надходити збалансовані корми з достатнім вмістом пальмітинової і олеїнової кислот.

OVEREXPRESSION OF ADAPTOR PROTEIN RUK/CIN85 IN TUMOR CELLS INFLUENCES PROLINE HYDROXYLASE-DEPENDENT HIF-1 α STABILITY

¹KOZLOVA N., ¹SAMOYLENKO A., ²KIETZMANN T., ¹DROBOT L.

¹*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany;*

e-mail kozlovanina@gmail.com

Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a DNA-binding protein that regulates transcription of a number of genes involved in maintaining biological homeostasis. HIF-1 is a heterodimer composed of an oxygen-destructible α -subunit and a β -subunit, levels of which are not dependent on the presence of oxygen. The α -subunit of HIF-1 is regulated by 2-oxoglutarate-dependent oxygenases PHD1-4 and FIH that, in the presence of oxygen, hydroxylate specific prolyl and asparaginyl residues of HIF-1 α , inducing its proteasome-dependent degradation and repression of transcriptional activity, respectively. Hypoxia inhibits oxygenases, stabilized HIF-1 α translocates to the nucleus, dimerizes with HIF-1 β , recruits coactivators and induces expression of its transcriptional targets via binding to hypoxia-responsive elements (HREs). While the existing body of work provides a general picture of hypoxia-dependent gene expression, the roles played by individual molecular components are uncertain. It was recently demonstrated that SH3 domain-containing adaptor/scaffold protein Ruk/CIN85 can induce the expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene via HIF-1. The aim of present study was to characterize the mechanisms by which Ruk/CIN85 influences HIF-1 α -dependent gene expression.

It was found that both transient and stable overexpression of Ruk/CIN85 in breast adenocarcinoma MCF-7 cells induced HIF-1 α protein levels and HIF-1 activity as shown by Western blotting analysis and luciferase reporter gene assay using a construct containing three copies of the HRE from erythropoietin gene. Downregulation of Ruk/CIN85 by using RNA interference (short hairpin RNA) approach reversed these effects. To investigate whether Ruk/CIN85 may interfere with HIF-1 α stabilization or transactivation, the cells were co-transfected with the luciferase reporter construct pG5-E1B-Luc that contains 5 copies of a Gal4 response element and vectors allowing expression of fusion proteins consisting of the Gal4-DNA binding domain (Gal4) and either HIF-1 α N-terminal (NTAD) or C-terminal (TADC) transactivation domains along with the Ruk/CIN85 expression vector. It was found that Ruk/CIN85 interfered with the proline hydroxylation-dependent HIF-1 α protein destabilisation but not with asparagine hydroxylation-dependent HIF-1 α transactivation. By using co-immunoprecipitation assays it was shown that Ruk/CIN85 forms complex with PHD2. Moreover, in the cells overexpressing Ruk/CIN85 the levels of PHD2 were significantly reduced. Therefore, these results indicate that Ruk/CIN85

influences HIF-1 α stability and HIF-dependent gene expression via modulation of PND stability and/or activity.

ВПЛИВ ОМЕПРАЗОЛІНДУКОВАНОЇ ГІПЕРГАСТРИНЕМІЇ НА ОРГАНИ ПОРОЖНИНИ РОТА

НЕПОРАДА К. С., МАНЬКО А. М., СУХОМЛИН А. А.

*ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», Полтава;
e-mail : neporada_69@mail.ru*

Метою дослідження було вивчення впливу довготривалого введення омепразолу на тканини органів порожнини рота щурів. Об'єктами дослідження були піднижньощелепні слинні залози, тканини пародонта та кров щурів. Експерименти виконані на 29 щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 180–250 г з дотриманням рекомендацій щодо проведення медико-біологічних досліджень згідно з Європейською конвенцією. Дослідним тваринам протягом 28 діб внутрішньоочередово вводили омепразол (Sigma, США) у дозі 14 мг/кг. Контрольним щурам протягом 28 діб внутрішньоочередово вводили 0,2 мл води для ін'єкцій. Встановлено, що вміст гастрину в плазмі крові щурів контрольної групи на 28 день складав $59,0 \pm 35,5$ пг/мл порівняно з дослідними тваринами – $170,7 \pm 90,7$ пг/мл. В гомогенаті тканин пародонта та слинних залоз визначали вміст окисно-модифікованих протеїнів (Дубинина Е. Е., 2008), молекул середньої маси (Габриєлян Н. И., 1983), активність протеаз (Уголев А. М. и др., 1969), колагеназ (Mandl J. et al., 1953), антитриптичну активність (Веремеєнко К. М. та ін., 1988), α -амілази (Caraweay, 1959) і активність орнітиндекарбоксилази (Храмов В. А., 1997).

Нами встановлено, що вміст окисно-модифікованих протеїнів в слинних залозах щурів в умовах 28-денного введення омепразолу збільшується в 1,3 раза, а в тканинах пародонта – в 3,6 раза ($P < 0,05$), вміст молекул середньої маси – в 1,32 та в 1,06 раза відповідно ($P < 0,05$). В умовах омепразоліндукованої гіпергастринемії у тканинах слинних залоз щурів загальна протеолітична активність підвищилась в 1,17 раза, а колагенолітична в тканинах пародонта зросла в 1,07 раза ($P < 0,05$) порівняно з контролем. В той самий час загальна антитриптична активність зменшилась в 1,35 та 1,4 раза відповідно ($P < 0,05$). В умовах тривалого введення омепразолу в тканинах слинних залоз щурів також підвищується активність α -амілази в 1,14 раза ($P < 0,05$) та орнітиндекарбоксилази в 1,27 раза ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Таким чином, довготривале введення омепразолу спричинює гіпергастринемію та розвиток патологічних змін в органах порожнини рота, а саме: активацію процесів вільнорадикального окислення, активацію синтезу регуляторних поліамінів, α -амілази та призводить до розвитку дисбалансу протеїназно-інгібіторного потенціалу за декомпенсаторним типом.

BIOCHEMICAL CHANGES IN THE DIFFERENT REGIONS OF YOUNG RATS BRAIN SUBJECTED TO CHLORPYRIFOS NEUROTOXICITY

SALYHA Y. T., TALOKHA N. I., BUDZAN H. R.

*Institute of Animal Biology, NAAS of Ukraine, Lviv;
e-mail: yursalyha@yahoo.com*

Chlorpyrifos (CPF) is one of the most commonly used organophosphorus (OP) pesticides in the world. Like the other OP, CPF (O, O-diethyl-3, 5, 6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate) inhibits the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which destroys acetylcholine, the neurotransmitter that activates cholinergic neurons. But number of scientist repeatedly demonstrated that CPF toxicity is not limited to cholinesterase inhibition alone but can act by other mechanisms. The aging brain shows selective neurochemical changes involving several neural cell populations. Increased brain metal levels have been associated with normal aging and a variety of neurodegenerative disorders. Copper is an important modulator of NMDA-receptor activity, zinc – of glutaminergic transmission. It is thus important to elucidate the mechanisms by which metal homeostasis of brain is maintained and how metals function in cellular processes, including neurotoxic damages.

In present work we have studied changes in the activities of some antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in tissues of the different brain regions after exposure to low doses of chlorpyrifos. Simultaneously we have studied levels of copper, zinc and iron in hippocampus, cerebellum and cerebral cortex of growing rats subjected to low doses of chlorpyrifos. Experiments were conducted in male rats. All rats were housed according to standard animal care protocols and fed standard laboratory chow and tap water *ad libitum*. The animals were decapitated under anaesthesia. After that brain was immediately removed, cleaned of blood clots and visible vascular structures. Hippocampus, cerebellum and cerebral cortex were isolated and immediately prepared for future analysis. The metals level measurements were done with an atomic absorptiometer S-115PC (Ukraine).

We observed some age-dependent and brain region-dependent changes in antioxidant enzymes activity. Our data suggests that in the effects of CPF on rats may be caused the oxidative stress. Our data demonstrates also age-dependent changes of investigated metal levels in different brain regions. A whole series of biochemical analysis of different parts of rat brain and our previous experiments with Morris water maze confirm the CPF neurotoxicity and at the same time impel for investigations on cellular and molecular level.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СВИНЦА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ КРЫС

*ТОМАЧИНСКАЯ Л. И., НЕПИЙВОДА Х. Д.,
СЕНЧИЛО Н. В., ПОЧТАРЕВА А. А.*

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: kristina_84@ukr.net*

Токсическое действие ионов свинца проявляется при замещении ими некоторых жизненно важных антагонистов, в частности серосодержащих аминокислот, витаминов, ионов Ca, Mg, Zn, Fe, P, Se. Отмечена способность свинца, обладающего большим сродством к электрону сульфгидрильной и гемсодержащей групп, блокировать поступление в клетку кальция, что может приводить к модификации основных ферментативных клеточных систем. Одним из важных звеньев иммунной защиты организма от экзогенного поступления тяжелых металлов является функциональный статус фагоцитов, хемотаксис которых активируется при попадании кальция в клетку и сокращению актина и миозина. Поэтому целью настоящего исследования была оценка уровня функциональной активности перитонеальных макрофагов крыс после внутрибрюшинного введения ионов свинца.

По данным литературы известно, что летальная доза (LD_{100}) соли свинца для крыс составляет 250 мг/кг веса. Для определения изменений в метаболическом статусе фагоцитов под влиянием ионов свинца животные были разделены на 4 группы по 5–6 животных в каждой: контроль и три группы с однократным введением ацетата свинца в концентрации $LD_{100}/2$; $LD_{100}/5$ и $LD_{100}/10$. Перитонеальные макрофаги отбирали у животных на 7-е сутки после введения агента. Функциональную активность определяли в НСТ-тесте. Функциональный резерв перитонеальных макрофагов определяли после их активации зимозаном (3 мг/мл). Статистический анализ проводили по критерию Стьюдента, при $P < 0,05$.

Установлено, что спонтанная активность макрофагов в группе $LD_{100}/2$ и $LD_{100}/10$ снижена на 34 и 26% соответственно по сравнению с контролем, в то время как в группе $LD_{100}/5$ этот показатель превышает контрольный на 30%. Функциональный резерв перитонеальных макрофагов после их инкубации с зимозаном в контрольной группе равнялся 12, в группе с $LD_{100}/2$ – 26, $LD_{100}/10$ – 28, а в группе $LD_{100}/5$ был снижен на 17,2%.

Таким образом, функциональный статус перитонеальных макрофагов нарушается при введении ионов свинца во всех трех исследуемых концентрациях: спонтанная активность по сравнению с контролем ниже в группе $LD_{100}/2$ и $LD_{100}/10$ и выше в группе $LD_{100}/5$; функциональный резерв для групп $LD_{100}/2$ и $LD_{100}/10$ высокий, в то время как в группе $LD_{100}/5$ он ниже уровня спонтанной активности.

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ІОННИХ КАНАЛІВ МЕМБРАН ЯДЕРНОЇ ОБОЛОНКИ НЕЙРОНІВ

ФЕДОРЕНКО О. А., МАРЧЕНКО С. М.

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: olena.fedorenko@biph.kiev.ua*

В еукаріотичних клітинах генетичний апарат обмежений ядерною оболонкою, яка складається із зовнішньої та внутрішньої ядерних мембран, що відокремлені перинуклеарним простором. Ядерна оболонка не лише відокремлює генетичний матеріал клітини, вона є напівпроникним бар'єром між цитоплазмою та каріоплазмою. Великий інтерес викликає дослідження механізмів транспортування іонів Ca^{2+} між цитоплазмою та ядром клітини, адже збільшення концентрації Ca^{2+} в ядрі запускає генну транскрипцію або через активацію ядерних Ca^{2+} -чутливих кіназ та фосфатаз, або через пряму взаємодію з Ca^{2+} -залежними факторами транскрипції.

У роботі, використовуючи метод «patch-clamp» у режимі фіксації потенціалу ми дослідили іонні канали на внутрішній мембрані ізольованих ядер пірамідальних нейронів ділянки CA1 гіпокампа та нейрони Пуркінє мозочка щурів.

Встановлено, що кластеризація інозитолтрифосфатних рецепторів у клітинних мембранах має велике значення в їхньому функціонуванні. Так, зокрема, вірогідність відкритого стану поодинокого каналу у кластері залежить від кількості каналів, які знаходяться поруч. Крім того, наші результати вказують на алостеричні взаємодії між IP_3Rs у кластері.

Показано, що вірогідність відкритого стану інозитолтрифосфатних рецепторів ядерної оболонки нейронів ЦНС залежить від потенціалу: у разі негативних потенціалів вірогідність відкритого стану цих каналів різко зменшується. Це відбувається за рахунок того, що на негативних потенціалах час відкритого стану та частота спрацьовувань каналу істотно понижуються. Крім того, активність катіонних каналів зі значною провідністю, які знаходяться в тих самих мембранах ядерної оболонки нейронів, має аналогічну потенціалзалежність, що свідчить про можливу участь каналів цих двох типів у виконанні однієї спільної функції.

На основі одержаних даних нами запропоновано новий механізм регуляції тривалості кальцієвого сигналу в ядрі центральних нейронів. Ми припускаємо, що потенціалзалежне інгібування іонних каналів ядерної оболонки, яке спостерігається при негативних потенціалах, є однією із причин припинення надходження Ca^{2+} з перинуклеарного простору всередину ядра, і, таким чином, призводить до термінації кальцієвого сигналу. Одержані результати дають змогу краще зрозуміти механізми регуляції внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації.

БИОТЕСТИРОВАНИЕ НЕРАСТВОРИМЫХ В ВОДЕ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОРСКИХ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ

ШАНДРОВСКАЯ А. С., КАЦЕВ А. М.

*Крымский государственный медицинский университет
им. С. И. Георгиевского, Симферополь, Украина;
e-mail: shandrovskayalen@mail.ru*

В ходе работы была исследована биологическая активность ряда гидрофобных веществ, маркированных как KVO-х и Les-х. Определяли наиболее оптимальное значение рН среды для проведения дальнейших экспериментов. Изучали действие различных растворителей для исследуемых веществ на биолюминесценцию. Сравнивали действие изучаемых веществ в суспензионной, эмульсионной форме, а также в форме раствора. В опытах был применен метод биолюминесцентного анализа. Определяли эффективные концентрации фактора, которые вызывают изменение интенсивности биолюминесценции бактерий. Острую токсичность определяли путем измерения эффективной концентрации, которая ингибирует биолюминесценцию в течение 10–30 минут, хроническую токсичность – за 24 часа. Результаты измерения биолюминесценции выражали в процентах от контрольных значений и по графику зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации или разведения исследуемого вещества, которые вызывают ингибирование свечения.

Согласно полученным результатам установлено, что наиболее оптимальным растворителем для анализируемых веществ является диметисульфоксид. Он не оказывает влияния на биолюминесценцию фотобактерий в нейтральной среде при 5%-ой концентрации в тесте на острую токсичность. Анализ суспензионных, эмульсионных форм, а также форм в виде раствора веществ, полученных путем введения тритона, который повышает их растворимость, в количестве, которое не влияет на интенсивность свечения бактерий, показал повышенную чувствительность данного метода к эмульсионной форме и форме раствора.