

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ КОНФЕРЕНЦІЇ МОЛОДИХ УЧЕНИХ «АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ БІОХІМІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ – 2011»

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, червень, 2011 р., Київ

За результатами таємного голосування журі визначило переможців конференції молодих учених:

I місце

Короткевич Наталія Валеріївна за роботу: Дослідження шляхів внутрішньоклітинного транспортування ліганд–рецепторного комплексу sHB-EGF/EGFR у клітинах карциноми людини (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

II місце

Бучковська Іванна Михайлівна за роботу: Стан детоксикаційної системи мишей в умовах відсутності запасів вітаміну А (Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича).

Касаткіна Людмила Олександрівна за роботу: Протонний градієнт секреторних гранул та транспортування глутамату у тромбоцитах за зниження рівня мембранного холестеролу (Київський національний університет імені Тараса Шевченка, навчально-науковий центр «Інститут біології», Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

III місце

Коршун Людмила Миколаївна за роботу: Оптимізація умов бактеріальної експресії рекомбінантних аналогів глікопротеїну G вірусу простого герпесу типу 2 та їхні антигенні властивості (Акціонерне товариство закритого типу науково-виробнича компанія «Діапроф-Мед»).

Кошель Тетяна Анатоліївна за роботу: Просторова орієнтація α C-регіонів молекули фібрин(оген)у під час його послідовного перетворення у фібрини дезАА та дезААВВ (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

Федосеєнко Аліна Павлівна за роботу: Вклад надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 до механізмів, асоційованих із підтриманням фенотипу ракових стовбурових клітин (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

Журі призначило також заохочувальні премії:

Гулько Вікторія Олегівна за роботу: Роль плацентарних протеїнів в формуванні задержки росту плода (ФДМ «Ростовський НДІ акушерства і педіатрії» Мінздорвоцрозвитку РФ).

Єфанова Ольга Леонідівна за роботу: Дослідження ролі β -дефенсину-2 людини як регулятора клітинного циклу в моделі *in vitro* (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України).

Чумаченко Ігор Миколайович за роботу: Методи комплексної оцінки обміну NO в організмі (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

Дипломи за активну участь у конференції одержали:

Демків Ірина Ярославівна за роботу: Стан глутатіонової ланки антиоксидантної системи в умовах кріогенного панкреатиту різної тривалості (Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського).

Порожан Євгенія Олександрівна за роботу: Состояние лимфоидных и стромальных элементов тимуса при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите до и после применения фетальных нервных клеток (Институт проблем кріобіології і кріомедицини НАН України)

Ровенко Богдана Михайлівна за роботу: Калорійність дієти впливає на перебіг вільнорадикальних процесів у *Drosophila melanogaster* (Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника).

Тобілевич Тетяна Олександрівна за роботу: Порівняльна характеристика препаратів β -глюканази, стабілізованих за участю вітчизняних природних мінералів (Білоцерківський національний аграрний університет).

КУЛЬТИВУВАННЯ МУЛЬТИПОТЕНТНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН – ПОХІДНИХ НЕРВОВОГО ГРЕБЕНЯ В КОЛАГЕНОВОМУ ТА ФІБРИНОВОМУ ГЕЛЯХ

Р. Г. ВАСИЛЬЄВ

*Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ;
e-mail: rvasiliev@ukr.net*

В останнє десятиріччя із тканин дорослих хребетних виділено мультипотентні стовбурові клітини – похідні нервового гребеня (МСК-ПНГ). Вони виявляють здатність до самовідновлення та диференціювання у нейральні, мезенхімальні та інші типи клітин. МСК-ПНГ зумовлюють значний інтерес щодо використання у регенеративній медицині.

Метою роботи було оцінити можливість культивування МСК-ПНГ у колагеновому та фібриновому гелях.

Культуру МСК-ПНГ одержували із бульбарного регіону волосяного фолікула вібрис мишей лінії FVB. Культивували у середовищі DMEM:F12 із 10% ембріональної телячої сироватки (ЕТС). Здатність до росту в умовах клональної щільності досліджували у тесті на колонієутворюючі одиниці (100 клітин на чашку Петрі з діаметром 100 мм). Здатність до самовідновлення визначали пересівом клональної колонії в чашку Петрі за допомогою клонуючих циліндрів. Остеогенне диференціювання проводили у DMEM з 10% ЕТС, 100 нМ дексаметазону, 10 мМ β -гліцерофосфату та 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфату. Адипогенне диференціювання проводили у DMEM із 10% ЕТС, 1 мкМ дексаметазону, 200 мкМ індометацину, 500 мкМ ізобутилметилксантину та 5 мкг/мл інсуліну. Колагеновий гель (КГ) виготовляли з оцтовокислого розчину колагену (10 мг/мл) за методом E. Bell (1981). Фібриновий гель (ФГ)

виготовляли шляхом об'єднання 0,5 мл розчину фібриногену (4 мг/мл) з 0,5 мл розчину тромбіну (2 од/мл). Клітини засівали у концентрації 5×10^5 /мл гелю та культивували протягом 7 діб.

МСК-ПНГ характеризуються значним проліферативним потенціалом, здатністю до росту в умовах клональної щільності та самовідновленням у разі їхнього субклонування. Мультипотентність МСК-ПНГ підтверджена диференціацією в остеобласти та адипоцити. У КГ та ФГ клітини виживали та ремодельовали гелі. Після створення гелю клітини мають округлу форму, яка через 24 год змінюється на фібробластоподібну. Під час подальшого культивування відбувається утворення міжклітинних контактів. Культивування МСК-ПНГ у колагеновому гелі призводить до його контракції (зменшення діаметра гелю на 30%). У разі культивування у фібриновому гелі відбувається його деградація з повною резорбцією після 7 діб. При цьому кількість клітин становить більше 800 000, що свідчить про проліферацію клітин у ФГ.

Показано, що під час культивування МСК-ПНГ у колагеновому та фібриновому гелях клітини виживають, формують міжклітинні контакти та ремодельовують гелі. Культивування клітин у тривимірних гелях дозволяє створювати трансплантати заданої форми для заповнення дефектів тканин.

УДК 578.81

БІОРИЗНОМАНІТНІСТЬ ФАГІВ ЛАКТОБАКТЕРІЙ ТА ЇХНЯ ІДЕНТИФІКАЦІЯ

К. А. ВАШУТИНА, О. В. НАУМЕНКО, Н. Ф. КІГЕЛЬ

*Технологічний інститут молока та м'яса НААН України, Київ;
e-mail: naumenkoo@list.ru*

Систематизована колекція фагів молочно-кислих бактерій є базою не тільки для проведення генетичних, біотехнологічних досліджень, спрямованих на створення фагорезистентних культур лактобактерій, але і для науково-практичних розробок ефективних протифагових заходів на виробництві різноманітної ферментованої молочної продукції.

Метою роботи було вивчення біологічних властивостей та ідентифікація бактеріофагів із колекції промислових вірулентних фагів відділу біотехнології ТІММ НААН.

Об'єктом досліджень були фаги молочно-кислих бактерій, виділені з різних біологічних джерел у промислових умовах. Було застосовано як традиційні мікробіологічні, вірусологічні методи досліджень, так і самостійно вдосконалені методики, які більше підходили до обраного об'єкту досліджень. Фаги нагромаджували на гомологічних культурах у високому титрі не менше ніж 10^{10} БУО/см³.

Відповідно до вимог Міжнародної комісії з таксономії вірусів для ідентифікації фагів проводили їх морфологічний та морфометричний аналіз. За результатами електронного мікроскопування встановлено, що фаги мали довгі нескоротливі хвостові відростки, тому їх було віднесено до порядку *Caudovirales*, родини *Siphoviridae*. Вони розрізнялися за формою голівки: виявлено фаги з ікосаедричними голівками морфотипу В1 (69,3% від загалу) і фаги з пролатними голівками морфотипу В2.

Фаги морфотипу В1 залежно від розмірів хвостового відростка утворювали 2 підгрупи.

Показано, що фаги мали літичну активність у межах 10^2 – 10^{10} БУО/см³, літичний індекс – 0,03–0,39 і розрізнялися за морфологією негативних колоній (4 типа) та видоспецифічністю (5 груп). Встановлено, що найбільша кількість фагів лізувала два чи три підвиди *L. lactis* – 68 і 16% відповідно. Видоспецифічні фаги активні щодо мезофільної мікрофлори *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. diacetylactis* і термофільного стрептококу *S. thermophilus* складала по 8%. Порівняння результатів дослідження літичної активності та морфології фагів показало, що між цими показниками немає корелятивних зв'язків. У колекції присутні фаги, що мають подібне коло хазяїв, але різну морфологію та належать до різних морфотипів. І, навпаки, є фаги одного морфотипу з різним спектром літичної активності.

Порівняльний аналіз одержаних даних з відомими (для типових фагів) щодо таксономічних ознак показав, що колекційні фаги морфотипу В1 можна віднести до 936 виду, а фаги морфотипу В2 – до с2 виду. Поширення фагів морфотипу В1 в Україні збігається з даними досліджень багатьох зарубіжних науковців європейських країн, Нової Зеландії, США, Канади тощо (Prevots F. et al., 1990; Moineau S. et al., 2002; Miklic A. et al., 2003).

АНТИ-GroEL АНТИТІЛА У ПРОГНОЗУВАННІ РИЗИКУ РЕПРОДУКТИВНИХ УСКЛАДНЕНЬ У ЖІНОК ІЗ ХРОНІЧНИМИ ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ОРГАНІВ МАЛОГО ТАЗУ

О. Р. ВИДЖАК^{1,4}, Л. Ф. ЯКОВЕНКО¹, О. В. РОМАЩЕНКО², Л. М. КАПУСТЯН¹,
М. В. МАКАРЕНКО³, Д. А. ГОВСЕЄВ³, Л. Л. СИДОРИК¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

²ДУ «Інститут урології АМН України», Київ;

³Пологовий будинок № 5 Солом'янського району, Київ, Україна;

⁴Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: olgavydzhak@mail.ru

Антитіла (АТ) до мікробного Hsp60 можуть використовуватися як діагностичний маркер при деяких захворюваннях: АТ до Hsp60 *Helicobacter pylori* (а.з. 141–160) та Hsp65 *Mycobacterium tuberculosis* асоційовані з розвитком і прогресуванням атеросклерозу, АТ до Hsp60 *Streptococcus pyogenes* (а.з. 357–368 та 418–427) – з розвитком глаукоми, АТ до хламідійного Hsp60 – з високим ризиком розвитку трубних порушень, ектопічної або ендометріоз-асоційованої вагітностей, втрати вагітності на ранніх стадіях, передчасних пологів, низької результативності запліднення *in vitro*.

Метою дослідження було виявлення АТ до одержаного нами рекомбінантного протеїну GroEl *E. coli* (гомолог Hsp60 людини та хламідійного Hsp60) у жінок із хронічними запальними захворюваннями органів малого тазу (ХЗЗОМТ) та виявлення можливо-го взаємозв'язку між наявністю таких АТ та розвитком порушень репродуктивної функції внаслідок хронічних запальних захворювань органів малого тазу.

Обстежено 28 жінок віком від 18 до 45 років із ХЗЗОМТ (у 12 з них діагностовано трубне безпліддя, у 5 жінок в анамнезі мало місце невиношування вагітності) та 118 жінок-породіль. Контрольну групу склали 12 клінічно здорових жінок. Рівень анти-GroEl АТ визначали методом ELISA. Одержання та

очищення рекомбінантного протеїну GroEl *E. coli* проводили за розробленою методикою.

У породіль рівень анти-GroEl АТ знаходиться в межах контролю (у 92,86% випадків). Рівень анти-GroEl АТ підвищений у 27,2% жінок з ХЗЗОМТ, а у разі ускладнення трубним безпліддям або невиношуванням вагітності відповідно у 75 та 100% обстежених ($P < 0,05$, порівняно з групою хворих на ХЗЗОМТ). Коефіцієнт діагностичної значимості становить при ХЗЗОМТ – 1,2, при трубному безплідді – 0,248, при невиношуванні вагітності – 0,078. Підвищена анти-GroEl реактивність асоційована із формуванням порушень репродуктивної функції (коефіцієнт взаємного спряження $K = 0,475$). Майже у всіх жінок із хламідійною, цитомегаловірусною або хламідійно-цитомегаловірусною інфекцією спостерігається підвищений рівень анти-GroEl АТ.

Встановлено зв'язок між підвищенням рівня анти-GroEl АТ та розвитком у обстежених жінок порушень репродуктивної функції внаслідок ХЗЗОМТ. Виявлення АТ до досліджуваного протеїну поєднано з діагностованою хламідійною, цитомегаловірусною або хламідійно-цитомегаловірусною інфекцією і може вказувати на істотний ризик розвитку репродуктивних ускладнень (трубне безпліддя, невиношування вагітності).

УДК 577.1+618.3

РОЛЬ ПЛАЦЕНТАРНЫХ ПРОТЕИНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ЗАДЕРЖКИ РОСТА ПЛОДА

В. О. ГУНЬКО, Т. Н. ПОГОРЕЛОВА

*ФГУ «Ростовский НИИ акушерства и педиатрии»
Минздравсоцразвития РФ, Ростов-на-Дону, Россия;
e-mail: rniip@yandex.ru*

Инновационным подходом в поиске специфических биомаркеров осложненной беременности является протеомный анализ плаценты. Поскольку нормальное развитие гестации во многом определяется состоянием протеинового обмена плаценты, его изучение способствует выяснению причин возникновения акушерской патологии, в том числе задержки роста плода (ЗРП), которое занимает одно из ведущих мест в структуре перинатальной заболеваемости.

Целью работы было изучение протеомного спектра плацентарной ткани при физиологической беременности и осложненной ЗРП.

В проспективное исследование были включены 20 женщин в возрасте от 23 до 33 лет, у 11 из которых беременность протекала без осложнений, а у 9 была ЗРП. Материалом исследования служили экстракты плаценты (39–40 недель), полученные на холоду.

Фракционирование протеинов плаценты проводили методом двухмерного электрофореза с последующим окрашиванием ионами серебра. Фореграммы анализировали с помощью пакета программ PDQuest (Био-Рад, США). Времяпролетную масс-спектрометрию экстрагированных из геля пептидов проводили на масс-спектрометре Autoflex II (Брукер, Германия). Идентификацию протеинов осуществляли с помощью программы Mascot (Matrix Science, США), опция Peptide Fingerprint и баз данных Swiss-Prot и NCBI. Достоверность идентификации рассчитана по покрытию аминокислотной последовательности протеина совпадающими пептидами.

В результате проведенных экспериментов выявлено 60 протеинов (32 идентифицированы), экспрессия которых значительно снижена или отсутствует при ЗРП, среди них: цитоскелетные протеины (γ - и β -актин, протеины комплекса Act 2/3), шапероны (прохитин, эндоплазматический ретикулярный протеин Egr29), протеасома 20S, аннексины A2 и A4, ингибитор диссоциации Rab, кислый рибосомальный протеин 60 S. Особую значимость представляет нарушение экспрессии энзимов, участвующих в β -окислении жирных кислот (диеноил-КоА-изомеразы, альдегиддегидрогеназы) и углеводном обмене (нейтральной α -гликозидазы AB, митохондриальной цитратсинтазы), которое может приводить к энергетическому дефициту в плаценте. Компенсаторное действие при данном осложнении беременности, очевидно, оказывает повышенная экспрессия ряда протеинов: виментина, α -актинина, митохондриальной α -кетоглутаратдегидрогеназы и молекулярного шаперона – эндоплазматическая ретикулина. Увеличение продукции этих протеинов может способствовать доношиванию осложненной беременности. В то же время подавление экспрессии плацентарных протеинов, характерных для нормальной беременности и участвующих в регуляции энергетического обмена, процессах клеточной трансдукции и межклеточного транспорта, по-видимому, создает условия, приводящие к развитию ЗРП и последующим осложнениям периода новорожденности.

**ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ β -ДЕФЕНСИНУ-2 ЛЮДИНИ ЯК РЕГУЛЯТОРА
КЛІТИННОГО ЦИКЛУ В МОДЕЛІ *IN VITRO***

*О. ЄФАНОВА, О. ЖУРАВЕЛЬ, Ю. ЮЗЕФОВИЧ,
М. СОЛДАТКІНА, П. ПОГРІБНИЙ*

*Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: pogrebnoy@onconet.kiev.ua*

Дефенсини – мультифункціональні пептидні антибіотики із групи алармінів (протеїнів-компонентів системи неспецифічного імунітету), які є сигналами небезпеки для організму при інфекції, запаленні та злоякісній трансформації. Залежно від локальної концентрації дефенсини можуть виявляти про- чи антипроліферативну дію на пухлинні клітини, зумовлювати апоптоз та інгібувати деякі клітинні ензими. У той же час механізм дії цих біомолекул на клітинному рівні не встановлено.

Метою нашого дослідження було встановити механізм впливу β -дефенсину-2 людини (human β -defensin-2 (hBD-2)) на проліферативні властивості злоякісно трансформованих епітеліальних клітин людини.

Дослідження було проведено *in vitro* на двох клітинних лініях – аденокарциноми легені людини A549 та епідермоїдної карциноми людини A431 із використанням рекомбінантного hBD-2, експресованого в бактеріях у вигляді злитого протеїну hBD-2-GST. Вплив hBD-2 на швидкість клітинного поділу та на розподіл клітин за фазами клітинного циклу досліджували методами прямого підрахунку клітин та проточної цитометрії. Для аналізу внутрішньоклітинної локалізації дефенсину застосовували конфокальну мікроскопію

та імуноцитохімічний аналіз, а вплив hBD-2 на сигнальні каскади, залучені до регуляції клітинного циклу, досліджували методом вестерн-блот аналізу.

Згідно з одержаними даними рекомбінантний hBD-2 має концентраційно-залежний вплив на параметри росту культивованих клітин ліній A549 та A431 і спричинює значне пригнічення проліферації клітин у діапазоні концентрацій від 100 до 500 нг/мл ($P < 0,05$). Із застосуванням проточної цитометрії було встановлено, що таке пригнічення росту пов'язане з арештом клітинного циклу у фазі G1/S. Методом вестерн-блот аналізу було показано відсутність фосфорильованої форми pRB у клітинах, які інкубували з дефенсином, порівняно з контрольними клітинами. Дослідження внутрішньоклітинної локалізації hBD-2 у клітин лінії A549, які інкубували із hBD-2 протягом 48 годин, продемонструвало, що екзогенний дефенсин виявляється в цитоплазмі та значною мірою акумулюється в ядрі.

Результати дослідження свідчать про те, що можливим механізмом дії β -дефенсину-2 людини на культивовані епітеліальні клітини може бути hBD-2-залежний арешт клітин у фазі G1/S клітинного циклу.

УДК 577.1:582.284.3:664.647

**БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГЛИБИННОГО
КУЛЬТИВУВАННЯ ЛІКАРСЬКОГО БАЗИДІОМІЦЕТА
Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst.**

Т. С. ІВАНОВА, Т. А. КРУПОДЬОРОВА

*ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ;
e-mail: ivanova_tatiana_wat2@bigmir.net*

Лікувально-профілактичні властивості базидіального гриба *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. використовували в народній медицині Китаю, Японії ще в давні часи. Сучасні дослідження науковців присвячені вивченню біологічно активних речовин цього гриба і можливості їхнього ефективного одержання внаслідок переробки дешевої сировини. Для більшості базидіальних грибів характерним субстратом є деревина і різноманітні лігно- та целюлозовмісні відходи сільського господарства і промисловості.

Метою нашої роботи було дослідження біосинтетичної активності штаму *G. lucidum* 1900, який культивували на хлібній крихті, об'єми якої під час виробництва хліба тільки на одному хлібокомбінаті становлять до 7 т на місяць.

Хлібну крихту Київського хлібокомбінату № 12, ВАТ «Київхліб» використовували як субстрат. *G. lucidum* вирощували у колбах на стерильному середовищі при температурі 26 ± 2 °C на качалці (120 об./хв). Біохімічні особливості росту культури, рН культурального середовища та утворення метаболітів визначали в динаміці один раз у три доби до 15-ї доби включно. Контролем було стерильне середовище із хлібною крихтою. Міцелій відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрації, сушили при 105 °C до постійної маси. У культуральній рідині визначали редуруючі речовини фериціанідним методом, рН – потенціометрично, за методиками В. Г. Бабіцької – екзополісахариди (Babitskaya et al., 2000), органічні кислоти та поліфеноли (Бабицкая и др., 2003).

За результатами наших експериментів ріст *G. lucidum* в умовах глибокого культивування підпорядковувався загальним закономірностям розвитку мікроорганізмів. Максимальна кількість міцеліальної маси становила $18,1 \pm 0,2$ г/л на 15-ту добу. Відомо, що ріст будь-якого гриба значною мірою визначається характером його взаємодії з навколишнім середовищем. Важливе місце в цьому займає поглинання компонентів живильного середовища та виділення метаболітів. Встановлено, що кількість сухих речовин живильного середовища поступово зменшується (з 42,2 до 17,5 г/л на 15-ту добу) зі збільшенням міцеліальної маси *G. lucidum*. Найбільший вміст поліфенолів (6,3 г/л) виявлено на 3-тій добу. Ендо- та екзополісахариди є цінними біологічно активними речовинами лікарських базидіальних грибів. Максимальну швидкість біосинтезу екзополісахаридів (1,02 г/л/добу) та максимальну швидкість споживання джерела вуглецю для утворення екзополісахаридів (3,72 г/л/добу) спостерігали з 3-ї по 6-ту добу. На 15-ту добу було одержано максимальну концентрацію екзополісахаридів – $5,2 \pm 0,3$ г/л. Зазначимо, що максимальну концентрацію органічних кислот (0,12 г/л) у культуральній рідині було зафіксовано на 9-ту добу експерименту при мінімальному значенні рН – 3,2.

Таким чином, нами вперше одержано результати про накопичення міцеліальної маси та утворення біологічно цінних метаболітів у культуральній рідині, які свідчать про перспективність та можливість використання відходів харчової промисловості України – хлібної крихти – для культивування лікарського гриба *G. lucidum*.

ПРОТОННИЙ ГРАДІЄНТ СЕКРЕТОРНИХ ГРАНУЛ ТА ТРАНСПОРТ ГЛУТАМАТУ У ТРОМБОЦИТАХ ЗА ЗНИЖЕННЯ РІВНЯ МЕМБРАННОГО ХОЛЕСТЕРОЛУ

Л. О. КАСАТКІНА^{1,2}, Т. О. БОРИСОВА¹

¹*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;*

²*Навчально-науковий центр «Інститут біології», Київський національний
університет імені Тараса Шевченка;
e-mail: ludmilka.kasatkina@gmail.com*

Тромбоцити експресують високоафінні глутаматні транспортери (EAAT1-3) та рецептори глутамату (AMPA-, NMDA-, кайнатні рецептори). Передбачається роль глутамату як модулятора функціональної активності тромбоцитів. На мембрані секреторних гранул тромбоцитів виявлено везикулярні транспортери глутамату VGLUT1-2, які використовують протонний електрохімічний градієнт як рушійну силу транспортування.

Зниження протонного градієнта секреторних гранул тромбоцитів термодинамічно сприяє реверсному функціонуванню (транспорт у зворотному напрямі) везикулярних глутаматних транспортерів. Це може зумовлювати вивільнення глутамату із секреторних гранул тромбоцитів у цитозоль, а у разі реверсії глутаматних транспортерів плазматичної мембрани і в позаклітинний простір.

Було досліджено протонний градієнт секреторних гранул та транспорт глутамату в ізольованих тромбоцитах під час зниження рівня мембранного холестеролу. Як акцептор холестеролу було використано метил- β -циклодекстрин (M β CD) – циклічний олігосахарид, який містить гідрофобну порожнину та гідрофільну поверхню. Зниження рівня мембранного холестеролу у тромбоцитах на 40% за дії 15 мМ M β CD було показано методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії з використанням флуоресцентного зонда філіпіну.

Спектрофлуориметричні дослідження із рН-чутливим флуоресцентним зондом – акридиновим оранжевим – показали, що за дії 5 та 15 мМ M β CD спостерігається зниження протонного градієнта секреторних гранул тромбоцитів на 16 та 56% відповідно. Збагачення плазматичної мембрани тромбоцитів холестеролом у складі комплексу M β CD-холестерол (1 : 0,2) супроводжується додатковою акумуляцією акридинового оранжевого, що свідчить про підвищення активності протонної V-АТФ-ази секреторних гранул. Дослідження активації тромбоцитів методом проточної цитофлуориметрії та активності екзогенної глутаматдегідрогенази в суспензії тромбоцитів у присутності тромбіну (0,5 од./мл) показало вивільнення глутамату із секреторних гранул тромбоцитів. Водночас, зниження протонного градієнта секреторних гранул за дії 15 мМ M β CD не призводить до вивільнення глутамату з тромбоцитів. M β CD не спричинює змін розміру та гранулярності цитоплазми тромбоцитів і не впливає на вивільнення глутамату шляхом екзоцитозу під час активації тромбіном.

Встановлено, що M β CD спричинює дисипацію протонного градієнта секреторних гранул тромбоцитів, не змінюючи здатність секреторних гранул до екзоцитозу і не зумовлюючи вивільнення глутамату із тромбоцитів шляхом реверсного функціонування везикулярних глутаматних транспортерів і/або транспортерів глутамату плазматичної мембрани.

УДК 577.152.1:577.161.1.

СТАН ДЕТОКСИКАЦІЙНОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ В УМОВАХ ВІДСУТНОСТІ ЗАПАСІВ ВІТАМІНУ А

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. О. ШМАРАКОВ, І. М. БУЧКОВСЬКА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru

Печінка займає центральне місце у метаболізмі ксенобіотиків. Під впливом ензиматичної конверсії, чужорідні сполуки можуть перетворюватися як у біологічно неактивні метаболіти, так і в інтермедіати з високою реакційною здатністю, що призводить до зниження детоксикаційної активності органа. Важливу роль у процесах біотрансформації відіграють мікросомні монооксигенази, провідними серед яких є цитохром *P*-450 (1.14.14.1; CYP) та ензими кон'югації – глутатіонтрансферази (2.5.1.18; GST). Ретиноїди здатні прямо або опосередковано індукувати експресію певних ізоформ CYP.

Мета роботи – дослідити рівень гідроксилазної та глутатіонтрансферазної активності у мікросомній та постмікросомній фракціях печінки мишей в умовах відсутності запасів вітаміну А.

Показники гідроксилазної активності цитохрому *P*-450 оцінювали за швидкістю деметилювання диметиланіліну (N-деметилазна активність) та гідроксилювання аніліну (п-гідроксилазна активність), яку визначали за кількістю утвореного формальдегіду та п-амінофенолу з урахуванням коефіцієнтів їхньої молярної екстинкції 1,5 та 13,3 мМ⁻¹·см⁻¹ та виражали в нмоль/хв/мг протеїну.

Активність GST реєстрували шляхом ензиматичного утворення глутатіон-S-2,4-динітробензолу та виражали у мкмоль продукту за 1 хв на 1 мг протеїну.

Результати досліджень показали, що на тлі підвищення глутатіонтрансферазної активності в мікросомній фракції печінки мишей, які перебували на А-авітамінозній дієті,

спостерігається зниження п-гідроксилазної та N-деметилазної активності CYP порівняно із показниками тварин, які впродовж експерименту одержували напівсинтетичний раціон, збалансований за всіма нутрієнтами. Вірогідно, зниження гідроксилазної активності цитохрому *P*-450 не стільки пов'язане із нестачею вітаміну А, скільки є причиною пригнічення метаболізму і печінкового кліренсу субстратів певних ізоформ CYP, що призводить до активації активності GST за рахунок захисних ефектів адаптації стрес-лімітуючих систем.

З метою нівелювання стресорних впливів А-авітамінозного раціону в експериментах використано трансгенних мишей, нокаутних за геном *Lrat* (експериментальна модель мишей, які не здатні синтезувати ретинілефіри в печінці і тому повністю позбавлені запасів ретиноїдів) та дикого типу (з нормальним рівнем ретинілефірів у печінці). Результати досліджень засвідчують пригнічення глутатіонтрансферазної активності на тлі зниження гідроксилазної активності CYP у печінці *Lrat*^{-/-}-мишей порівняно із показниками в контролі. Зниження активності CYP у мікросомній фракції печінки нокаутних мишей, вірогідно, зумовлене відсутністю запасів вітаміну А. Цей факт можна пов'язати з тим, що реакції гідроксилювання, які відбуваються за участю цитохрому *P*-450, індукуються саме ретиноїдами.

Отже, відсутність запасів вітаміну А супроводжується зниженням ензиматичної активності глутатіонтрансферази на тлі пригнічення гідроксилазної активності цитохрому *P*-450.

ДОСЛІДЖЕННЯ ШЛЯХІВ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ТРАНСПОРТУВАННЯ ЛІГАНД–РЕЦЕПТОРНОГО КОМПЛЕКСУ sHB-EGF/EGFR У КЛІТИНАХ КАРЦИНОМИ ЛЮДИНИ

Н. В. КОРОТКЕВИЧ, А. Ю. ЛАБИНЦЕВ

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: gnr.nata@gmail.com*

Гепаринзв'язувальний фактор росту, подібний до епідермального ростового фактора – HB-EGF (від англ.: Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor), належить до родини епідермальних ростових факторів та синтезується у вигляді мембранозаякореного попередника pro-HB-EGF, здатного утворювати розчинну форму фактора (sHB-EGF) за дії на нього металопротеїназ типу ADAM. Рецепторами для sHB-EGF є гомодимери рецепторів родини епідермальних ростових факторів першого (EGFR, HER-1, Human Epidermal Growth Factor Receptor) та четвертого типу (HER-4), а також їхні гетеродимери із HER-2 та HER-3. Зв'язування sHB-EGF із рецептором приводить до утворення ліганд–рецепторного комплексу sHB-EGF/EGFR та активації сигнальних шляхів, які відіграють вирішальну роль у регулюванні проліферації, диференціації, міграції та інгібуванні апоптозу, що є особливо важливим у разі злоякісних перетворень.

Відомо, що утворений ліганд–рецепторний комплекс sHB-EGF/EGFR у подальшому зазнає лізосомної деградації або ресайклінгу (receptor recycling) на поверхню плазматичної мембрани. З іншого боку, дослідження останніх років виявили, що зв'язування з EGFR інших лігандів (EGF, TGF- α) веде до ядерної транслокації ліганд–рецепторного комплексу, де останній, за рахунок наявності кіназної активності EGFR, виконує функції регулятора транскрипції шляхом фосфорилування низки ядерних протеїнів, що спричинює посилення проліферативного статусу клітини.

Метою цієї роботи було дослідження здатності секреторної форми гепарин-

зв'язувального ростового фактора (sHB-EGF) стимулювати ядерну транслокацію EGFR, а також шляхів внутрішньоклітинного транспортування ліганд–рецепторного комплексу. Окрім того, оскільки sHB-EGF взаємодіє із протеогліканами на поверхні плазматичної мембрани, цікавим було дослідити вплив гепаринзв'язувальної ділянки у складі sHB-EGF на його здатність стимулювати ядерну транслокацію EGFR.

У ході виконання роботи було одержано нові дані щодо механізмів реалізації біологічної активності sHB-EGF людини, а саме його здатності стимулювати ядерну транслокацію власного рецептора (EGFR), де останній може впливати на проліферативний потенціал клітини, шляхом фосфорилування ряду внутрішньоядерних мішеней. Так, у клітинах карциноми людини A431 методом конфокальної мікроскопії було виявлено ліганд–рецепторний комплекс sHB-EGF/EGFR у таких внутрішньоклітинних органах як апарат Гольджі та ендоплазматичний ретикулум, що може вказувати на ретроградний шлях ядерної транслокації. Одержані дані також дозволяють зробити припущення відносно того, що sHB-EGF може не лише стимулювати ядерну транслокацію EGFR, а є необхідним елементом транслокаційного комплексу.

Висловлюємо подяку ст. наук. співр., канд. фіз.-мат. наук В. Ф. Горчеву та ст. наук. співр., канд. техн. наук О. Ю. Чуніхіну за технічну підтримку під час проведення цього дослідження.

УДК 57.083.3:616.578.7:616.579.61

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНИХ АНАЛОГІВ ГЛІКОПРОТЕЇНУ G ВІРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСУ ТИПУ 2 ТА ЇХНІ АНТИГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ

Л. М. КОРШУН, Г. В. КОВТОНЮК

*АТЗТ НВК «Діапроф-Мед», Київ, Україна;
e-mail: KL2004@ukr.net*

Останнім часом у всьому світі зростає розповсюдженість інфекцій, спричинених вірусами простого герпесу типів 1 та 2 (ВПГ-1 та ВПГ-2 відповідно). Захворювання зумовлені ВПГ-2, перебігають більш тяжко, з частішими рецидивами та ускладненнями порівняно із ВПГ-1. Тому під час проведення клініко-лабораторних досліджень важливо робити диференційну діагностику між цими типами вірусу. Серед скринінгових лабораторних досліджень найпоширенішим є метод твердофазного імуноензимного аналізу (ІЕА). Під час розробки діагностичних тест-систем застосовують нативні протеїни ВПГ або їхні рекомбінантні аналоги.

Мета роботи полягала в оптимізації умов бактеріальної експресії рекомбінантного аналога типоспецифічного глікопротеїну G ВПГ-2 у клітинах бактерій *Escherichia coli* та одержання високоактивного препарату, придатного для використання у складі імуносорбента для розробки діагностичних тест-систем.

На основі вектора рЕТ28а було сконструйовано дві рекомбінантні плазміди: рЕТ28-Gal-HSV2gG та рЕТ28-GST-HSV2gG, продукти експресії яких у бактеріальній системі *E. coli* BL21(DE3) є поліпептидами, що містять імунодомінантні ділянки глікопротеїну G ВПГ-2 та послідовності N-кінцевого фрагмента β -галактозидази (Gal-HSV2gG) або глутатіон-S-трансферази (GST-HSV2gG) відповідно. Виявлено залежність рівня біосинтезу цільових протеїнів та їхніх антигенних властивостей від особливостей генно-інженерної конструкції та умов культивування продуцентів. Дослідження

антигенних властивостей очищених протеїнів у форматі непрямого ІЕА показало, що використання протеїну GST-HSV2gG дозволяє підвищити чутливість діагностичної тест-системи для визначення імуноглобулінів класу G до ВПГ-2 в 1,43 раза, порівняно з протеїном Gal-HSV2gG.

Встановлено, що поліпептид GST-HSV2gG накопичується у клітинах бактерій *E. coli* як у розчинній формі, так і в тільцях включень. Показано, що антигенна активність розчинного протеїну у 3 рази ($P < 0,05$) вища, ніж у тільцях включень. Найбільш високий рівень синтезу протеїну у розчинній формі було досягнуто за умов культивування продуцента з використанням середовища ТВ та індукції культури 0,1 мМ ІПТГ у фазі прискорення росту з подальшим культивуванням впродовж 3,5 год при температурі 37 °С.

Рекомбінантний протеїн GST-HSV2gG очищали за допомогою технологій іммобілізованої метал-афінної та афінної хроматографії. Питомий вихід очищеного препарату із клітинного супернатанту за оптимізованих умов складав 78,7% від загальної кількості рекомбінантного протеїну в клітині та становив 26,75 мг на 1 л культурального середовища.

Отже, нами було одержано рекомбінантний протеїн GST-HSV2gG ВПГ-2, підбрано оптимальні умови його експресії у клітинах *E. coli* та підтверджена можливість його застосування в діагностичній імуноензимній тест-системі.

ПРОСТОРОВА ОРІЄНТАЦІЯ α C-РЕГІОНІВ МОЛЕКУЛИ ФІБРИН(ОГЕНУ) ПІД ЧАС ЙОГО ПОСЛІДОВНОГО ПЕРЕТВОРЕННЯ У ФІБРИНИ дезАА ТА дезААВВ

Т. А. КОШЕЛЬ

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: Tanya_kow@list.ru*

Молекула фібриногену є мультидоменним протеїном, в якому розрізняють центральний регіон Е, два периферичних регіони Д та два α C-регіони (A α 220-610). Через свою високу рухливість структурне положення α C-регіонів у молекулі фібрин(огену) візуалізувати не вдається. Відсутні чіткі дані про зміну структурної позиції α C-регіонів під час послідовного перетворення фібриногену у фібрин дезАА та фібрин дезААВВ під дією тромбіну. Метою роботи було дослідити зміни просторового місцезнаходження та визначити можливу функціональну роль α C-регіонів молекули фібрин(огену) під час його послідовного перетворення у фібрини дезАА та дезААВВ.

Проти частково денатурованого фібрину було одержано моноклональні антитіла (монАТ) названі FnII-2М, які належать до імуноглобулінів класу М. Методом імуноблот аналізу показано, що ці монАТ реагують з А α -ланцюгом молекули фібрин(огену). Імуноензимним методом (ELISA) було показано, що монАТ FnII-2М є фібрин дезААВВ-специфічними, епітоп яких знаходиться в α C-фрагменті молекули фібрин(огену) A α 240-491.

У ході дослідження виявилось, що, не дивлячись на позитивну реакцію одержаних монАТ FnII-2М із фібрином дезААВВ у методах ELISA та поверхнево-плазмонного резонансу (ППР), ці монАТ не реагують із плазмою крові хворих людей, в якій за попередніми даними

було виявлено значну кількість розчинного фібрину. Пояснити цей феномен дали змогу результати дослідів, одержані методами ELISA та ППР, які показали, що монАТ FnII-2М не реагують із фібрином дезАА, який містить фібринопептиди В. Методом ELISA виявлено, що додавання фібриногену до фібрину дезААВВ істотно знижує реакцію монАТ FnII-2М із фібрином дезААВВ.

Показано, що у фібриногені та фібрині дезАА фрагменти A α 240-491, в яких знаходиться епітоп для монАТ FnII-2М, не експоновані, напевно, через їхні внутрішньомолекулярні взаємодії з фібринопептидами В та один з одним. Ці фрагменти залишаються закритими і під час полімеризації фібрину дезАА з утворенням олігомерів та протофібрил. Однак після відщеплення фібринопептидів В від молекули фібрину дезАА α C-регіони відходять від остова молекули, що призводить до експонування епітопів та внаслідок цього до реакції вже утвореного фібрину дезААВВ з монАТ FnII-2М.

Одержані результати дозволяють передбачити, що в молекулі фібриногену та фібрину дезАА α C-регіони зв'язані з фібринопептидами В своїм фрагментом A α 240-491. Після відщеплення фібринопептидів В від фібрину дезАА α C-регіони відходять від остова молекули та один від одного, переключаючи свої внутрішньомолекулярні контакти на міжмолекулярні і, тим самим, беруть участь у латеральній асоціації протофібрил та фібрил.

УДК 577.151.4+543.555

**SILICALITE AS A PROMISING CARRIER FOR UREASE
IMMOBILIZATION BY ADSORPTION***I. S. KUCHERENKO^{1,2}, O. O. SOLDATKIN¹, SEÇKIN ÖZTÜRK³,
BURCU AKATA³, A. P. SOLDATKIN^{1,2}, S. V. DZYADEVYCH^{1,2}**¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kucherenko.i.s@gmail.com;**²Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;**³Middle East Technical University, Ankara, Turkey*

Standardization of the method of immobilization of biomaterial onto transducer surface is a key stage in biosensor commercialization. Despite intensive investigations aimed at stabilization of methods of enzyme immobilization, there is still no sufficient achievement in the subject. Thus, improvement of the methods of biomaterial immobilization remains an actual challenge in biosensorics. The standard adsorption procedure is the simplest method of enzyme immobilization, however this approach is far from optimal because of requirement of large amount of enzymes and their gradual wash-out.

New possibilities in optimization of adsorption are associated with the advancement in nanotechnology, which means improvement of the methods of synthesis of nanoparticles with given properties, in particular, of silicalite used in our work.

To study a possibility of efficient urease adsorption on silicalite and to compare this approach with other methods of immobilisation.

Conductometric method of measurement was used. This method is based on measuring conduc-

tivity of solution between two pairs of electrodes. Urease-based bioselective membranes were deposited on the first pair, and referent membranes with bovine serum albumin – on the second.

The conventional in biosensorics methods of urease immobilization are compared with the developed by us method of the enzyme adsorption on silicalite. The duration of urease adsorption on silicalite is optimized. The dependences of biosensor response on pH and ionic strength of the working solution are plotted. Intra-reproducibility of the biosensors developed, their operational and storage stability are investigated.

In the work a possibility of urease adsorption on silicalite was shown; the efficiency of this process was demonstrated to be not less than that of other methods of immobilization. Moreover, adsorption on silicalite is notable by some advantages – simple and fast performance, non-use of toxic compounds, high intra-reproducibility. These characteristics are especially important from the viewpoint of commercialization and industrial manufacture of biosensors.

СТАН ГЛУТАТІОНОВОЇ ЛАНКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В УМОВАХ КРІОГЕННОГО ПАНКРЕАТИТУ РІЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ

Н. Є. ЛІСНИЧУК, І. Я. ДЕМКІВ, М. І. КУЛІЦЬКА

*Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського, Україна;
e-mail: duduchka@ukr.net*

Розвиток багатьох захворювань супроводжується оксидативним стресом внаслідок інтенсивного утворення у клітинах активних форм кисню (АФК). Завдяки високій реакційній здатності, АФК можуть призводити до ураження клітин, спричинюючи окислення біомолекул та ініціювання ланцюгових процесів пероксидного окислення ліпідів у мембранах. Зміна ліпідного оточення мембран та посилення процесів пероксидації призводять до структурних порушень у клітинах і модуляції активності мембранозв'язаних ензимів. Важлива роль у цих процесах належить ензимам глутатіонової антиоксидантної системи.

Тому метою експериментального дослідження було вивчення змін активності функціонування глутатіонзалежної ланки антиоксидантної системи щурів в умовах змодельованого кріогенного ураження підшлункової залози.

Для дослідження використовували 40 білих щурів масою 180–185 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Піддослідних тварин було розділено на групи: інтактна – 10 щурів; з експериментальним панкреатитом – 30 щурів (3; 7; 14 доби). Панкреатит моделювали за методом С. О. Шалімова (1989). Активність глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонредуктази (ГР) визначали методом Г. О. Кругликова (1976). Концентрацію

відновленого глутатіону (G-SH) вимірювали згідно з методом G. L. Ellman (1959).

Однією з ланок, що захищає клітини від переокислення є система глутатіону, яка включає ензими – ГП та ГР, а також неензимний компонент – G-SH. Дослідження показало зниження активності ГП та ГР, а також концентрації G-SH при експериментальному панкреатиті.

Так, активність ГП достовірно знижується на 3-ю (у 3,1 раза), 7-у (у 1,4 раза) та 14-у (у 3,6 раза) доби експерименту, проти аналогічного показника у контрольних тварин. Водночас активність ГР достовірно знижується у 1,3, 1,4 та 2,2 раза відповідно на 3-ю, 7-у та 14-у добу дослідження порівняно з контрольними тваринами. Внаслідок змодельованого кріогенного панкреатиту спостерігається вірогідне зниження концентрації G-SH протягом усього експерименту: на 3-ю добу цей показник знижується у 2,3 раза, на 7-у – у 2,2 раза та на 14-у – у 1,2 раза відносно аналогічного показника в контрольній групі тварин.

Результати проведених досліджень свідчать, що експериментальний кріогенний панкреатит супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окислення, на що вказує зниження активності ензимів глутатіонової ланки антиоксидантної системи та зниження концентрації неензимного показника цієї ланки G-SH.

УДК 575.174.015.3:612.017

**ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ ФАКТОРІВ ОДЕРЖАННЯ «МОДЕЛІ»
ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ЯВИЩА МІКРОХИМЕРИЗМУ**

*Т. М. ЛУЦЕНКО¹, О. В. ОКУНЕВ¹, М. В. КОВАЛЬЧУК²,
Т. П. ГУЛЬКО², В. А. КОРДЮМ²*

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України», Київ;
e-mail: amn_igrm@ukr.net;

²Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

На сьогодні відомо, що явище мікрохимеризму (Mc) може мати природне походження (фетоплацентарний Mc під час вагітності) та штучне (у разі трансплантацій). Mc характеризується наявністю невеликої кількості чужерідних (мікрохимерних) клітин або ДНК, одержаних з іншого організму. Мікрохимерні клітини здатні до диференціювання та проліферації в організмі хазяїна. Це явище відоме і вже використовується у клініці під час трансплантацій. У зв'язку з цим визначення причин Mc та умов регуляції цього процесу стає дедалі актуальнішим.

Тому метою нашої роботи був пошук «моделі» для вивчення явища Mc, відпрацювання умов експерименту та контролю результатів.

Експерименти проводили на лабораторних мишах. Важливим етапом було вибрати донора та реципієнта для одержання необхідної моделі, що включало генотипування лабораторних ліній. Для цього аналізували

мікросателіти лабораторних мишей: ICR/IMBK, BALB/c по локусу *Eb* на 17-й хромосомі, за допомогою ПЛР. Лінії мишей виявились забрудненими, тому було розпочато роботи з відбору чистих ліній відносно цього локусу.

За даними літератури відомо, що одним із природних факторів росту і диференціації прогеніторних клітин крові є інтерлейкін 3 (ІЛ-3), який діє навіть і на зрілі клітини. Фізіологічна роль ІЛ-3 може полягати у залученні допоміжних клітин кісткового мозку, необхідних для ефективної імунної відповіді, до місця реакції. Тому для наших досліджень даний цитокін клонували, провели відбір клонів, а з вирощеної культури (продукта цільового протеїну) виділили та очистили протеїн.

Таким чином, внаслідок проведеного дослідження було підготовлено базу для коректних робіт із вивчення явища Mc та подальших експериментів.

ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОЇ УРЕАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ*С. В. МАРЧЕНКО¹, О. А. НАЗАРЕНКО¹, Е. К. КРАСЮК², О. П. СОЛДАТКІН¹**¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
e-mail: svmarchenkosv@ukr.net;**²Київський міський науково-практичний центр нефрології та гемодіалізу, Україна*

Сечовина – головний і кінцевий продукт обміну протеїнів. Рівень сечовини у крові є надійним маркером роботи нирок, а її визначення – один із найпоширеніших тестів у рутинній клінічній діагностиці. Нормальний рівень сечовини у крові складає 2,5–7,5 мМ. За патофізіологічних умов цей показник може досягати 100 мМ. При концентрації сечовини 30 мМ хворому необхідно проводити гемодіаліз.

Як відомо, сечовина також широко розповсюджена у природі, тому її моніторинг є важливим для сільського господарства, харчової промисловості та охорони навколишнього середовища.

Традиційні методи визначення ґрунтуються на формуванні кольорових комплексів із сечовиною чи амонієм, що утворюється під час гідролізу сечовини уреазою. Такі методи складні у використанні в зв'язку із значним комплексом реакцій (на чому базується аналіз), потребують попередньої пробопідготовки і непридатні для on-line вимірювань.

Біосенсорні методи на основі рН-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої уреазы прості, дешеві, точні та дозволяють проводити вимірювання в режимі реального часу. Але, головним недоліком таких методів є вузький лінійний діапазон визначення сечовини, тому перед вимірюванням необхідно розводити біологічні зразки. Одним із шляхів

вирішення цієї проблеми є використання конкурентних інгібіторів уреазы, наприклад, тетраборату натрію або перспективніше та придатніше для клінічної діагностики застосування рекомбінантної уреазы.

Робота присвячена розробці потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів та рекомбінантної уреазы зі збільшеною K_m (200 мМ) з наступною апробацією створеного біосенсора на реальних зразках.

У ході роботи відпрацьовано умови іммобілізації рекомбінантного ензиму в насичених парах глутарового альдегіду, підібрано рН-оптимум його роботи, визначено залежність величини відгуку іммобілізованої уреазы від буферної ємності та іонної сили. Встановлено нижню межу чутливості розробленого біосенсора, яка складає 0,5 мМ, та лінійний динамічний діапазон чутливості – 0,5–15 мМ. Знайдено оптимальні умови визначення сечовини в сироватці крові хворих на ниркову недостатність. Встановлено концентрацію сечовини у пробах крові та проведено її порівняння у разі визначення контрольним методом, показано позитивну кореляцію одержаних даних.

Таким чином, розроблено потенціометричний біосенсор на основі рекомбінантної уреазы і показано можливість його використання для контролю вмісту сечовини у сироватці крові хворих на ниркову недостатність.

УДК: 612.133; 615.255

**ЗАСТОСУВАННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ КОНСТРУКЦІЇ
siRNA-PLASMID ДЛЯ САЙЛЕНСИНГУ δ -ІЗОФОРМИ
ПРОТЕЇНКІНАЗИ С НОРМАЛІЗУЄ СУДИННІ ПОРУШЕННЯ
ЩУРІВ З ГЕНЕТИЧНО ДЕТЕРМІНОВАНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ**

Т. НОВОХАЦЬКА¹, О. БОЛДИРЬОВ², С. ТИШКІН¹, В. ДОСЕНКО², А. СОЛОВЙОВ¹

¹*Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ;
e-mail: tetiananovokhatska@gmail.com;*

²*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ*

Однією з головних причин збільшення констрикторної активності гладеньком'язових клітин судин є зміни провідності $ВК_{Ca}$ -каналів, стан яких, у свою чергу, залежить від активності протеїнкінази С (ПКС). Встановлено, що збільшення активності ПКС та розвиток гіперскоротливості судинної стінки у щурів із генетично детермінованою гіпертензією (ГДГ) корелює зі зменшенням активності $ВК_{Ca}$ -каналів.

Метою цього дослідження було нормалізувати підвищений тиск та іонну каналопатію у щурів із ГДГ з використанням малих інтерферуючих РНК (міРНК) та конструкції міРНК на базі плазмиди рSilencer (sh δ ПКС) для посттрансляційного сайленсингу гену δ ПКС.

Показано, що внутрішньовенне введення як міРНК, так і sh δ ПКС значно знижує

тиск (1-й день) на 16 ± 5 та 17 ± 4 мм.рт.ст. відповідно, яке зберігається протягом наступних 7 діб. Величина вихідних $ВК_{Ca}$ струмів, зареєстрованих за допомогою методу петч-клепм, у здорових щурів становила 52 ± 5 та 25 ± 2 пА/пФ у щурів з ГДГ. Густина $ВК_{Ca}$ струму у щурів з ГДГ після введення міРНК була 35 ± 3 пА/пФ, а після введення sh δ ПКС – 36 ± 3 пА/пФ ($P < 0,05$, $n = 24$). Одержані дані демонструють, що застосування РНК-інтерференції δ -ізоформи ПКС відновлює ендотелійзалежне розслаблення та функцію $ВК_{Ca}$ -каналів у гладеньком'язових клітинах судин щурів з ГДГ. Отже, РНК-інтерференція може бути відповідним методом для «нокдауну генів» ПКС та нормалізування вазодилаторного потенціалу в щурів із ГДГ.

СОСТОЯНИЕ ЛИМФОИДНЫХ И СТРОМАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ТИМУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ ДО И ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Е. А. ПОРОЖАН

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: janepor@yandex.ru*

При нейродегенеративных патологиях аутоиммунного генеза происходят значительные изменения структурно-функциональных характеристик лимфоидных и стромальных элементов главного органа иммуногенеза — тимуса. Это обусловлено тесным взаимодействием тимуса с нервной и эндокринной системами организма, функционирование которых нарушается при нейродегенеративных состояниях. Для лечения такого рода заболеваний применяются модуляторы надсистемного действия, комплексно корригирующие системы гомеостаза, входящие в нейроиммуноэндокринный блок. К таковым в полной мере можно отнести фетальные нервные клетки (ФНК), которые приобретают новые терапевтические свойства в процессе криоконсервирования. Тем не менее, в настоящее время клиническое использование ФНК опережает темп исследований, направленных на изучение механизмов их действия.

В связи с этим целью данной работы была оценка влияния криоконсервированных ФНК (кФНК) на состояние лимфоидного и стромального компартментов тимуса в динамике развития экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ).

Эксперименты на крысах проведены в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985). ЭАЭ индуцировали у крыс по методу Давыдовой. Суспензию ФНК из мозга эмбрионов крыс (11 суток гестации) криоконсервировали по двум режимам (Р1 и Р2) на программном замораживателе. Суспензию кФНК крыс вводили

внутрибрюшинно на 14-е сутки развития ЭАЭ. Контролем служили животные, которым вводили: а) нативные ФНК, б) клетки костного мозга, в) взрослые нервные клетки. Методом проточной цитофлуориметрии на 7–35-е сутки развития патологии определяли содержание в тимусе клеток CD3⁺, CD4⁺CD25⁺, DC⁺, IL-10⁺ с использованием моноклональных антител (Becton Dickinson, США). Методом ELISA определяли концентрацию тимозина β4 (Abcam, Великобритания) и TGF-β (Becton Dickinson, США). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна–Уитни.

Проведенные исследования показали гиперэкспрессию CD3⁺ Т-клеток в тимусе крыс с ЭАЭ на протяжении всего срока наблюдения. Количество регуляторных Т-клеток превышало контрольные значения лишь на пике патологии (14-е сутки). При этом IL-10⁺ клетки и концентрация TGF-β находились в противофазе с CD4⁺CD25⁺ клетками. Концентрация тимозина β4 изменялась прямопропорционально количеству дендритных клеток. Введенные кФНК вызывали изменения субпопуляционного состава клеток тимуса. Самое раннее (через 6 суток после введения) и существенное снижение клинических признаков проявления патологии (до 0,3 балла) наблюдалось после применения кФНК в Р2. При этом показатели CD3⁺, CD4⁺CD25⁺, DC⁺, IL-10⁺ клеток приближались к значениям контроля.

Рассматриваются возможные причины разбалансировки субпопуляционного состава клеток тимуса в патогенезе ЭАЭ и пути коррекции подобного рода нарушений кФНК.

УДК 579.864.1:615.331

**ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОМОДУЛЮЮЧИХ
ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРОБІОТИКІВ***Р. В. ПУТІЄНКО¹, І. В. ЛИЧ¹, Н. І. НАСТОЯЩА²*¹*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна;
e-mail: rus19491@i.ua;*²*ДП «Центр імунобіологічних препаратів», Київ, Україна*

Важливим аспектом дії пробіотиків є їхня імуностимулююча активність, що підвищує рівень захисту організму хазяїна від збудників як кишкових, так і генералізованих інфекцій. Метою роботи було вивчення імунomodуючих властивостей пробіотиків і виділених із них специфічних штамів із референс-штамами музейних культур, що використовуються для контролю якості цих препаратів.

У дослідженнях використовували препарати «Біфідумбактерин» та «Лактобактерин» виробництва НВО Мікроген (Росія) та ізольовані з них, а також еталонні штами *Lactobacillus plantarum* і *Bifidobacterium bifidum*. Дослідження проводили, з урахуванням експериментальних даних щодо імунологічної реактивності дослідних тварин – 210 білих безпородних мишей, яким протягом 21 доби перорально вводили суспензію відповідних зразків та фізіологічний розчин як контроль. Здатність пробіотичних мікроорганізмів впливати на клітини імунного захисту визначали за зміною функціональної активності макрофагів перитонеального ексудату, одержаного із черевної порожнини тварин, після евтаназії на 7-, 14- та 21-у добу досліджень та пофарбованого за модифікованим методом Паппенгейма–Крюкова. Кількість макрофагів рахували під мікроскопом та визначали відсоток фагоцитозу (ВФ), тобто відсоток макрофагів, які містили клітини дріжджів, та фагоцитарне

число (ФЧ), що показує середню кількість поглинутих клітин дріжджів.

Результати свідчать про зростання показників фагоцитозу порівняно із контрольною групою. Зокрема на 21-у добу для «Лактобактерину» та «Біфідумбактерину» відповідно ВФ зростає на 16 та 14% і становить 74 та 76% порівняно з 60% (контроль), а ФЧ – на 4,5 та 5 ум.од. Найвищі значення показників спостерігались для еталонних та ізольованих штамів мікроорганізмів. Зокрема, на 21-у добу значення ВФ для препаратів «Лактобактерин» та «Біфідумбактерин» становили 76 та 74% відповідно, а для еталонних штамів 84 та 85%. Найвищі значення показника ФЧ спостерігаються для ізольованих штамів *L. plantarum* і *B. bifidum*, які становлять 8,25 та 8,13 ум. од. порівняно з відповідними препаратами (7,50 та 7,75 ум. од.).

Отже, пробіотики виявляють імунomodуючі властивості. Порівняння з ізольованими та еталонними штамми підтверджує вплив технологічних операцій на процес виготовлення препаратів, під час якого частково втрачається функціональна активність пробіотичних штамів. Проведені дослідження дають підстави для розроблення наукового обґрунтування показань, доз і схем застосування пробіотиків щодо підвищення стійкості організму до інфекцій та оздоровлення імунної системи.

**КАЛОРИЙНІСТЬ ДІЄТИ ВПЛИВАЄ НА ПЕРЕБІГ
ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ
У *Drosophila melanogaster***

Б. М. РОВЕНКО, О. В. ЛУЩАК

*Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: bohdanarovenko@gmail.com*

Зміна антиоксидантного статусу є основою регуляції багатьох функцій клітин і значною мірою залежить від надходження енергії. У роботі ми намагалися з'ясувати як калорійність дієти впливає на перебіг вільнорадикальних процесів у плодової мушки *Drosophila melanogaster*.

Мушки розвивалися на агаризованих вуглеводо-дріжджових середовищах, калорійність яких була від 56,8 до 846,8 кКал на 1 л середовища за рахунок використання різних концентрацій фруктози або глюкози від 0,25 до 20%.

Кількість калорій, які надходили в організм плодової мушки обох статей, була вищою в умовах споживання середовищ із вищим вмістом вуглеводу, незважаючи на те, що мушки споживали найбільше їжі на низькокалорійних дієтах (0,25 і 1%). Більше того, було знайдено вірогідне підвищення споживання середовища із фруктозою (приблизно на 30%) порівняно із середовищем із глюкозою.

Кількість карбонільних груп протеїнів була у 1,3 раза вищою під час споживання низькокалорійної дієти. Вміст протеїнових тиольних груп був на 40% меншим під час споживання середовища, яке містило 0,25% вуглеводу порівняно з 20%-ю вуглеводною дієтою. Водночас кількість тиольних груп у низькомолекулярних сполуках не змінювалася. Таким чином, споживання низькокалорійної дієти спричинювало окисну модифікацію молекул протеїнів плодових мушок. Супероксиддисмутаза (СОД), каталаза і сечова

кислота належать до першої ланки захисту біомолекул від пошкоджень, що пов'язані з дією активованих форм кисню. Активність СОД та кількість сечової кислоти у самців була на 50 та 20% вищою на середовищах із 0,25% вуглеводу порівняно з 20%-ю вуглеводною дієтою. Активність каталази була вищою в 1,2 раза у самців, які споживали середовище з 0,25%-ю концентрацією вуглеводу порівняно із середовищем, що містило 20%-ю концентрацію вуглеводу. Самки, які розвивалися на середовищі із 20%-ю концентрацією вуглеводу, мали в 1,3 раза вищу активність каталази порівняно із самками, що утримувалися на низькокалорійній дієті. Активність тіоредоксинредуктази була на 30% вища в особин, які розвивалися на середовищі з найнижчою калорійністю. Самці, які розвивалися на середовищі із фруктозою, і самки, які утримувалися на глюкозній дієті, мали найбільшу активність глутатіон-S-трансферази в умовах найменш калорійної дієти. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази на середовищах із вмістом вуглеводу 1 і 4% була в 1,5 раза вища за таку на середовищах із 0,25- або 20%-ю концентрацією вуглеводу. Калорійність дієти не впливала на активність ізоцитратдегідрогенази.

Таким чином, низькокалорійна дієта спричинює оксидативний стрес у плодової мушки, який супроводжується окисною модифікацією протеїнів та активацією системи антиоксидантного захисту.

УДК 577.161.2 : 612.015.6

**ІМУНОМОДУЛЮЮЧА ДІЯ БІСФОСФОНАТІВ ТА ВІТАМІНУ D₃
В УМОВАХ АЛІМЕНТАРНОГО ОСТЕОПОРОЗУ***В. М. РЯСНИЙ**Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: Riasniy@ ukr.net*

В останні роки продемонстрована імуномодулююча дія вітаміну D₃ і бісфосфонатів, які знаходять широке застосування при патологіях кісткової системи. Відомо, що біологічну активність виявляє гормонально-активна форма вітаміну D₃ – 1,25(OH)₂D₃, рецептори до якої знайдено в більшості типів імунних клітин. Імуномодулююча роль бісфосфонатів на імунну систему залишається недостатньо з'ясованою. Вважають, що одним із механізмів впливу бісфосфонатів на імунну систему є їхня здатність зменшувати концентрацію вільного кальцію, який є регулятором процесів росту та диференціації імунокомпетентних клітин.

Метою роботи було дослідити синергічну дію вітаміну D₃ та різних форм бісфосфонатів в умовах аліментарного остеопорозу.

Усі досліди проводили на самках щурів лінії Wistar, яких утримували на експериментальній дієті, що зумовлює розвиток остеопорозу. Тваринам з ознаками остеопорозу протягом одного місяця вводили вітамін D₃ та бісфосфонати – алендронову кислоту та дигідрат динатрієвої солі метиленбісфосфонової кислоти (МБФК), а також комбінації вітаміну та бісфосфонатів. Контролем слугували тварини, яких утримували на дієті віварію.

Фагоцитарну активність досліджували за допомогою тест-набору PHAGOTEST. Рівень імуноглобулінів визначали імуноензиматично в сироватці крові щурів.

Одержані дані свідчать, що в умовах аліментарного остеопорозу фагоцитарна активність гранулоцитів зменшується в

1,6 раза. Введення вітаміну D₃ приводить до збільшення цього показника в 1,5 раза відносно такого показника за остеопорозу. Фагоцитарна активність не істотно зростає у тварин, яким вводили МБФК та алендронат. Однак рівень активних гранулоцитів у тварин, яким комбіновано вводили холекальцитріол та МБФК повертається до норми. У щурів, які разом з вітаміном D₃ одержували інший бісфосфонат – алендронат – нормалізації фагоцитарної активності не спостерігається.

Вивчення гуморальної ланки імунітету в умовах остеопорозу показало незначне зниження рівня сироваткового IgG. У разі сумісного додавання вітаміну D₃ та бісфосфонатів спостерігається підвищення його рівня порівняно з таким при остеопорозі.

Дослідження сироваткового IgA показало істотне, більш ніж удвічі, зниження рівня даного імуноглобуліну при аліментарному остеопорозі. Введення вітаміну D₃ до істотних змін цього показника не призводить. У той же час рівень сироваткового IgA збільшується в 1,5 та в 1,9 раза в групах тварин, які відповідно одержували МБФК та алендронат, ніж при остеопорозі. Сумісне введення вітаміну та різних форм бісфосфонатів кардинально не впливає на рівень IgA.

Одержані результати свідчать, що в умовах аліментарного остеопорозу відбувається пригнічення функціональної активності фагоцитуючих клітин крові та порушення гуморальної ланки імунітету. Показано імуномодулюючу дію вітаміну D₃ та бісфосфонатів в умовах аліментарного остеопорозу.

МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ФОРМАЛЬДЕГІДУ В ОРГАНІЗМІ ТВАРИН ТА ДЕЯКІ ЙОГО ЕКЗОГЕННІ ДЖЕРЕЛА

М. САВЧУК

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: mnsavchuk@gmail.com

В організмі людини формальдегід (ФА) утворюється ендогенно в процесі метаболізму амінокислот і ксенобіотиків та може надходити з екзогенних джерел. Формальдегід виявляє мутагенну, генотоксичну, імуногенну та канцерогенну дії, є одним із чинників розвитку злоякісних новоутворень дихальної системи та лейкемії у людини, здатний утворювати інтрамолекулярні зшивки в протеїнах і нуклеїнових кислотах та міжмолекулярні зв'язки між цими сполуками.

Нами розроблено новий метод визначення концентрації формальдегіду (ФА) в організмі тварин, що наближений до умов *in vivo*. Процедура методу наступна: за 40 хв до забою тваринам перитоніально вводять 1%-й розчин дімедону на фізрозчині; гомогенат тканини печінки готують на 5%-му розчині аміаку (1 : 5); протеїни осаджують $\text{Ba}(\text{OH})_2$ та ZnSO_4 . До 1 мл надосадової рідини додають 1 мл 20%-го оцтовокислого амонію (рН 5,5), зразки нагрівають на водяній бані (100 °С) 20 хв, після чого швидко охолоджують. Утворений флуоресцентний продукт визначають при λ_{ex} 380 нм та λ_{em} 460 нм. Метод апробовано на щурах: 1) за перорального введення 0,1%-го розчину ФА в дозі 10 мл/кг через 40 хв концентрація ФА в тканині печінки становила: контроль –

136 ± 24 нмоль/г, дослід – 254 ± 42 нмоль/г ($P < 0,05$); 2) за перорального введення розчину семікарбозиду – інгібітора SSAO, основного ензиму синтезу ФА, в дозі 200 мг/кг на дві години: контроль – 139 ± 24 нмоль/г, дослід – 78 ± 13 нмоль/г ($P < 0,05$). На підставі одержаних результатів можна стверджувати, що розроблений метод дозволяє адекватно оцінити вплив на обмін ФА.

На основі розробленого методу досліджено деякі можливі екзогенні джерела ФА: 1) тіопролін – амінокислота, що є продуктом взаємодії ФА та цистеїну; за перорального введення в дозі 446 мг/кг на годину, контроль – 125 ± 23 нмоль/г, дослід – 183 ± 39 нмоль/г ($P < 0,05$); 2) форміат натрію – кінцевий продукт метаболізму формальдегіду, за перитоніального введення в дозі 533 мг/кг на 40 хв: контроль – 131 ± 23 нмоль/г, дослід – 135 ± 30 нмоль/г; 3) метиламін – субстрат SSAO, за перорального введення розчину метиламіну в дозі 250 мг/кг на 40 хв, контроль – 128 ± 21 нмоль/г, дослід – 164 ± 28 нмоль/г, ($P < 0,05$).

Таким чином, доведено, що тіопролін та метиламін є екзогенними джерелами формальдегіду в організмі; можливість утворення ФА з форміату не підтвердилася.

УДК 604.2:661.727.4

ПОШУК ПЕРСПЕКТИВНИХ ШТАМІВ АЦЕТОНОБУТИЛОВИХ БАКТЕРІЙ

О. І. СКРОЦЬКА, Я. В. ГАВРИШ

*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна;
e-mail: Skrotska@yandex.ru*

Органічні розчинники, зокрема ацетон, застосовуються у виробництві лікарських препаратів, лакофарбній промисловості, у виробництві пластмас, синтетичного каучуку і хімічних волокон, а також є сировиною для синтезу багатьох інших органічних продуктів. Ацетон використовується у виробництві оцтового ангідриду, ацетонціангідрину, дифенілолпропану, а також застосовується для знежирення поверхонь під час різних виробничих процесів. У харчовій промисловості ацетон використовується як екстрагент у виробництві різноманітних продуктів. Зокрема, з його допомогою проводять екстракцію кофеїну із кавових зерен, виділення жирів, вітамінів та біологічно активних сполук із рослинної та тваринної сировини. Однак серед відомих хімічних методів одержання ацетону майже завжди в кінцевому продукті виявляється присутність домішок у вигляді залишкової кількості початкової сировини або проміжних продуктів хімічного синтезу. Одержання ацетону в процесі ацетонобутилового бродіння не має зазначених недоліків, тому доволі актуальним є пошук перспективних штамів ацетонобутилових бактерій (АББ).

АББ виділяли зі зразків ґрунту та ризосфери рослин, які було відібрано з болотистої місцевості міста Києва та приміських районів, мулу озер та річок, активного мулу очисних споруд, гною великої рогатої худоби та куря-

чого посліду. Всього для дослідження було відібрано 86 зразків. Для виділення АББ використовували картопляне середовище. Попередній відбір АББ проводили візуально за такими критеріями: виділення вуглекислого газу, розрідження середовища, освітлення середовища. Вторинний відбір АББ проводили за наявності ацетону. З активних накопичувальних культур АББ ізолювали чисті культури, під час чого використовували синтетичне напіврідке агаризоване середовище на основі розчинного крохмалю. У ході проведених робіт 42% відібраних ізолятів бактерій дали позитивну реакцію на ацетон. У подальших пасажах близько 3% виділених АББ втрачали властивість до синтезу ацетону. У стабільнопозитивних ізолятів було проведено кількісне визначення ацетону та порівняльний аналіз найактивніших (за ацетоном) ізолятів із різних природних ніш. Водночас 22% АББ продукували ацетон у кількості від 4,0 до 5,0 г/л. Найактивніші за кількістю синтезованого ацетону штами АББ були виділені з польового ґрунту, мулу озера Супій, торфу, кар'єрного піску та курячого посліду.

Таким чином виділені ацетонобутилові бактерії є перспективними для подальшого вивчення з метою ізоляції чистих культур та оптимізації умов їхнього культивування для збільшення виходу ацетону.

БІОСИНТЕЗ ТРЕОНІНУ ДРІЖДЖАМИ *Candida utilis* Л-3

О. О. ТИГУНОВА, А. Ф. ТКАЧЕНКО, Н. Е. БЕЙКО,
А. І. ХОМЕНКО, С. М. ШУЛЬГА

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, Київ;
e-mail: Tigunova@ukr.net

Під час відбору мікроорганізмів – продуцентів амінокислот, перш за все, необхідно знайти серед великої кількості культур ті організми, що виявляють підвищений синтез необхідних амінокислот.

Для одержання ефективного продуцента треоніну проведено скринінг культур мікроорганізмів – представників різних видів за ознакою «якісний склад продукуємих амінокислот». Проведені дослідження показали, що мікроорганізми суттєво різняться як за кількістю, так і за якісним складом продукуємих амінокислот. За результатами вивчення складу амінокислот різних видів мікроорганізмів із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» Інституту харчової біотехнології і геноміки НАНУ для подальшого дослідження було відібрано дріжджі *Candida utilis* Л-3 (як продуцент L-треоніну).

Загальновідомо, що умови культивування та склад поживного середовища впливає на кількісний і якісний склад синтезуємих амінокислот. Характер вуглеводу в середовищі, додавання вітамінів та інших біологічно активних речовин зменшує або збільшує їхню кількість.

Проведено дослідження впливу джерела вуглецю на синтез треоніну. Продуцент вирощували на середовищах, що містять тільки одне джерело вуглецю (глюкозу, сахарозу, арабінозу, етиловий спирт або оцтову кислоту). Ці джерела в тих чи інших співвідношеннях

містяться в сільськогосподарських рослинних відходах. Протеїн дріжджів, одержаний на середовищі з глюкозою, був значно багатший на треонін порівняно із протеїном дріжджів, які вирощували на сахарозі. Культура, вирощена на оцтовій кислоті і етиловому спирті (як джерело вуглецю), також містила всі життєво необхідні амінокислоти, але накопичувала меншу кількість треоніну – 1,25 і 1,32% відповідно.

Встановлено, що в умовах нестачі в середовищі вітамінів: нікотинової кислоти, біотину та пантотенової кислоти або одного з них ріст дріжджів не призупиняється, але відбуваються зміни в кількісному та якісному складі утворюваних амінокислот. Пантотенова кислота відіграє особливо важливу роль у синтезі амінокислот і впливає на їхнє кількісне співвідношення. Синтез треоніну (накопичення) на середовищі з пантотеновою кислотою складає 3,5% до сухої маси дріжджів проти 1,8% без додавання пантотенової кислоти.

Для збільшення накопичення треоніну проведено пошук оптимальних умов культивування і стимуляції синтезу треоніну. За результатами проведених досліджень встановлено, що для підвищення ефективності синтезу треоніну необхідно культивувати продуцент при температурі 35 °С, рН 4,8–5,2 та за аерації – 11 г О₂/л/год.

Таким чином, доведено, що синтез треоніну можна підвищувати за допомогою змін умов культивування.

УДК 573.6:615.35:577.15:636.087.8

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТІВ β-ГЛЮКАНАЗИ, СТАБІЛІЗОВАНИХ ЗА УЧАСТЮ ВІТЧИЗНЯНИХ ПРИРОДНИХ МІНЕРАЛІВ

Т. О. ТОБІЛЕВИЧ, С. В. МЕРЗЛОВ

*Білоцерківський національний аграрний університет, Україна;
e-mail: tobilevich_tatjana@rambler.ru*

Екзогенні ензими, продуцентами яких є мікроскопічні гриби та бактерії, що здатні прискорювати хімічні реакції, традиційно використовуються у годівлі сільськогосподарських тварин, птиці та у кормовиробництві.

Широкого використання набули препарати β-глюканази. Важливість застосування цього ензиму обумовлена тим, що він не синтезується в організмі моногастричних тварин та птиці. Проте, висока залежність каталітичної активності β-глюканази від умов середовища вимагає створення стабілізованих біокаталізаторів, стійких до процесів інгібування та денатурації.

Імобілізація сприяє цілеспрямованій зміні властивостей каталізаторів, у тому числі їхньої специфічності, лабільності до дії рН-середовища, а також стійкості до підвищених температур та солей важких металів. Для того, щоб ефективно застосовувати іммобілізовані ензимні препарати як кормові добавки у тваринництві, вони мають бути дешевими, доступними, конкурентоспроможними порівняно з їхніми нативними формами. На собівартість стабілізованих ензимів значно впливає технологія іммобілізації та вартість носіїв.

Одним із доступних, недорогих та простих способів стабілізації ензимів є адсорбція на природних мінералах, яка дозволяє ензимам бути стійкими до інгібіторів та пролонговано проявляти свою каталітичну активність.

Зважаючи на згадане вище, в умовах НДІ екології та біотехнології Білоцерківського

національного аграрного університету нами було сконструйовано стабілізовані препарати β-глюканази. Як вихідний матеріал застосовували екзогенний нативний ензим β-глюканазу ГЗх (виробник ПП «БТУ – Центр», м. Ладижин) та природні мінерали: сапоніт Ташківського родовища, цеолітовмісний базальтовий туф родовища «Полицьке – II» Рівненської області та цеоліт Сокирницького родовища.

Оптимальність носія визначали за показником його місткості та приєднанням ензиму до нього зі збереженням ензиматичної активності. Метод визначення β-глюканазної активності одержаних препаратів базувався на кількісному визначенні продуктів гідролізу за реакцією з мідною комплексною сіллю.

Оцінку препаратів проводили за концентрацією утвореної з β-глюканів глюкози на 1 см³, за дії β-глюканази іммобілізованої на різних носіях.

Результати досліджень активності стабілізованих ензимів β-глюканази свідчать про те, що стабілізована на цеоліті β-глюканаза має вищу гідролітичну активність, ніж ензими, іммобілізовані на сапоніті та цеолітовмісному базальтовому туфі. Найменшу концентрацію глюкози виявлено у розчинах, в яких застосовували стабілізований ензим на сапоніті.

Таким чином, показано, що адсорбований на цеоліті екзогенний ензимний препарат β-глюканази виявляє стабільнішу гідролітичну активність, ніж той, що іммобілізовано на сапоніті та цеолітовмісному базальтовому туфі.

ВІДЩЕПЛЕННЯ ФІБРИНОПЕПТИДУ А ВІД ФІБРИНОГЕНУ ТРОМБІНОМ/РЕПТИЛАЗОЮ СПРИЧИНЮЄ СТРУКТУРНІ ЗМІНИ В В β 121-138 ДІЛЯНЦІ МОНОМЕРНОГО ФІБРИНУ

Л. П. УРВАНТ, Є. М. МАКОГОНЕНКО, Е. В. ЛУГОВСЬКОЇ

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: urvant@ua.fm*

Фібриноген (Fg) – мультидоменний багатофункціональний протеїн, який формує фібриновий згусток. У нормі Fg інертний і не взаємодіє з іншими протеїнами у плазмі крові. Його ділянки міжмолекулярної взаємодії приховані фібринопептидами А і В та інтрамолекулярними взаємодіями з α C-доменами. Вважалося, що відщеплення фібринопептиду А (FrA), яке призводить до появи А центру полімеризації (Gly-Pro-Arg) в N-кінці A α -ланцюга, – це основна зміна у структурі мономерного Fg. Інші структурні зміни відбуваються під час полімеризації фібрину. Однак у відділі структури і функції білка ІБХ НАНУ (Е. В. Lugovskoy et al., 2008) було знайдено неоантигенну детермінанту фібринспецифічних монАТ І-Зс, яка була локалізована в суперспіральній ділянці В β 118-138 β -ланцюга фібриногену, експонувалася на ранніх етапах полімеризації фібрину та в межах якої знаходився сайт латеральної асоціації протофібрил фібрину. Нашою метою було визначити які зміни в Fg і на якому етапі полімеризації фібрину призводять до експонування неоантигенної детермінанти і сайту латеральної асоціації протофібрил фібрину В β 121-138.

Було висловлено припущення, що неоантигенна детермінанта експонується після відходження α C домену від центральної частини Fg. Проведені кінетичні дослідження

експозиції неоантигенної детермінанти за допомогою ELISA та паралельно структурних змін у Fg та його X-фрагментах методом електрофорезу в ПААГ показали, що у разі відщеплення тромбіном (анцистрономН) FrA неоантигенна детермінанта експонується однаково як у Fg, так і в його X-фрагментах. Гідроліз фібриногену плазміном, що відщеплює α C-домени, не призводить до експозиції неоантигенної детермінанти. Це свідчить про те, що неоантигенна детермінанта і, відповідно, сайт латеральної асоціації В β 121-138 не існує у Fg, а формується внаслідок відщеплення фібринопептидів А і α C-домен не екранує неоантигенну детермінанту у Fg.

Для того, щоб встановити чи експонується неоантигенна детермінанта на мономерному чи полімерному фібрині ми дослідили методом ППР зв'язування дезАфібрину, що утворювався в системі Fg + анцистрономН *in situ*, з іммобілізованими на імуносенсорний чип монАТ І-Зс. Порівнюючи зв'язування дезАфібрину у присутності 1 mM GPRP та за його відсутності, різниця у зв'язуванні не спостерігається, тобто неоантигенна детермінанта (сайт латеральної асоціації) формується на мономерному фібрині. Отже, ми знайшли, що одночасно з появою А-центру первинної полімеризації на молекулі мономерного дезАфібрину формується сайт латеральної асоціації протофібрил.

УДК 577.218+616-006

**ВКЛАД НАДЕКСПРЕСІЇ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ
RUK/CIN85 ДО МЕХАНІЗМІВ, АСОЦІЙОВАНИХ
ІЗ ПІДТРИМАННЯМ ФЕНОТИПУ РАКОВИХ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

*А. П. ФЕДОСЕЄНКО, Н. В. БИЦЬ, О. В. КОЛЄГАЄВ,
А. А. САМОЙЛЕНКО, Л. Б. ДРОБОТ*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: a.fedoseienko@gmail.com*

Ракові стовбурові клітини (CSCs) – це пухлинні клітини, здатні до самооновлення і утворення нових гетерогенних пухлин. Відомо, що до виникнення і підтримання фенотипу CSCs залучені такі механізми як NF-κB-сигналювання, надекспресія мембранних транспортерів та експресія специфічних поверхневих маркерів. Однак на сьогодні в літературі повністю відсутні дані стосовно ролі адаптерних протеїнів у регулюванні біологічних відповідей CSCs. Відомо, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 виконує важливу роль не тільки у підтриманні гомеостазу нормальних клітин, але може бути також залученим до регуляції шляхів злоряксною трансформації клітин людини і тварин і, як наслідок, слугувати молекулярним маркером канцерогенезу та, в перспективі, представляти привабливу мішень для антипухлинної терапії. Метою роботи було з'ясувати роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у механізмах, що визначають підтримання фенотипу ракових стовбурових клітин.

Досліди проводили на клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 дикого типу та зі стабільною надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Прикріплені та суспензійні клітини аналізували на здатність виключати барвник толуїдиновий блакитний, як описано в роботі (Ciose et al., 2010). Активацію транскрипційного фактора

NF-κB у досліджуваних клітинах аналізували за допомогою репортерної конструкції з геном люциферази. Сфероїди одержували шляхом культивування клітин на низькоадгезивному пластику у детермінованому середовищі. Виділені субпопуляції CSCs-подібних клітин аналізували на наявність поверхневого маркера CD44 за допомогою імуноблот-аналізу.

Встановлено, що суспензійні, але не адгерентні клітини MCF-7 зі стабільною надекспресією Ruk₁/CIN85 містять високий процент клітин, що виключають толуїдиновий блакитний, причому їхня кількість позитивно корелює з рівнем експресії Ruk₁/CIN85. Суспензійні клітини в культурі субліній MCF-7 із надекспресією Ruk/CIN85 виявилися здатними до ефективного формування сфероїдів в умовах культивування в детермінованому середовищі на низькоадгезивному пластику. У клітинах з надекспресією Ruk/CIN85, на відміну від контрольних клітин, спостерігається активація транскрипційного фактора NF-κB, що відповідає даним, одержаним іншими авторами для CSCs. Імуноблот-аналізом показано також, що рівень експресії поверхневого маркера CD44 позитивно корелює з рівнем експресії Ruk₁/CIN85.

Таким чином, одержані дані свідчать про потенційну регуляторну роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у розвитку фенотипу клітин, характерного для CSCs.

**ПРЕДНІЗОЛОНІНДУКОВАНІ ПОРУШЕННЯ
МЕТАБОЛІЗМУ ВІТАМІНУ D₃***А. В. ХОМЕНКО**Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: annavic@ukr.net*

Глюкокортикоїдні препарати широко використовуються в сучасній медицині завдяки своїм вираженим протизапальним та імунодепресивним властивостям. Такі характеристики обумовлюють призначення глюкокортикоїдів під час лікування ревматоїдного артриту, бронхіальної астми, лейкозів, алергічних захворювань та використання їх за трансплантації органів і тканин. Але довготривале застосування глюкокортикоїдів виявляє низку побічних ефектів, найпоширенішим серед яких є розвиток індукованого глюкокортикоїдами остеопорозу. Механізм дії може полягати у пригніченні глюкокортикоїдами синтезу активних метаболітів вітаміну D₃ та процесів ремоделювання кісткової тканини.

Метою роботи було дослідити вплив різних доз преднізолону на вміст гідроксильованої форми вітаміну D₃ (25ОНD₃), а також на активність вітаміну D₃ 25-гідроксилазних ензимів гепатоцитів, що відповідають за утворення активних форм холекальциферолу; мінеральний та ліпідний обміни у тканинах щурів і дати обґрунтування методу корекції виявлених порушень.

Результати проведених досліджень свідчать, що дія преднізолону (0,5 мг і 1 мг на

100 г маси тіла) призводить до розвитку чітко вираженої гіпокальціємії, гіпофосфатемії та супроводжується зростанням активності загальної лужної фосфатази та її ізоензимів. Показано, що за цих умов у кістковій тканині вірогідно знижується вміст кальцію на 28%, а фосфору підвищується на 19 та 28% залежно від дози введеного гормону. Причиною змін мінерального обміну є зниження на 60% ступеня забезпеченості організму 25ОНD₃ – основного циркулюючого в сироватці крові метаболіту вітаміну D₃ – і маркера забезпеченості організму цим вітаміном внаслідок інгібування активності вітаміну D₃ 25-гідроксилазних ензимів у гепатоцитах. Вплив преднізолону має дозозалежний характер, у разі збільшення дози гормону у 2 рази активність вітаміну D₃ 25-гідроксилазних ензимів знижується також у 2 рази. Показано, що пригнічення активності вітаміну D₃ 25-гідроксилаз пов'язане із порушенням структурно-функціонального стану гепатоцитів.

Встановлено, що введення вітаміну D₃ в терапевтичній (40 МО) чи лікувальній (100 МО) дозах на тлі преднізолону значною мірою посилює регенерацію гепатоцитів, нормалізує мінеральний та ліпідний обміни через активацію метаболізму вітаміну D₃.

УДК 577.1:612.017.1:661.5:53.083.2

МЕТОДИ КОМПЛЕКСНОЇ ОЦІНКИ ОБМІНУ NO В ОРГАНІЗМІ

І. М. ЧУМАЧЕНКО

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: chumak_ig@yahoo.com*

Одним із найпоширеніших методів дослідження обміну NO в організмі є визначення концентрації його метаболітів – нітритів та нітратів. Однак останні у значній кількості надходять в організм з екзогенних джерел, що обумовлює похибки під час оцінки обміну NO.

Нами запропоновано принципово інший підхід для оцінки обміну оксиду азоту, що ґрунтується на використанні пастки NO (ДТК-Fe²⁺), що зв'язує NO з утворенням стабільного у фізіологічних умовах нітрозильного комплексу, який відмивається від фонові концентрації NO₂ та NO₃. Кількість NO у комплексі визначається за кількістю нітратів, що вивільнюються під час кислотної дисоціації комплексу.

На основі цього підходу розроблено низку методів для оцінки обміну NO:

1. Визначення обміну NO в організмі тварини методом, що наближений до умов *in vivo*. Тваринам за 40 хв до декапітації вводяться розчини: перитоніально – діетилдитіокарбамат натрію (ДТК) в дозі 500 мг/кг; підшкірно сульфат заліза 37,5 мг/кг та цитрат натрію 187,5 мг/кг; гомогенат тканини печінки готується на 10 мМ фосфатному буфері рН 7,4 (1 : 5); протеїни осаджуються Ba(OH)₂, ZnSO₄; осад протеїнів багаторазово відмивається до відсутності залишків нітритів та нітратів у надосадовій

рідині; до осаду протеїнів додається HCl до 1 М; після центрифугування у надосадовій рідині встановлюють концентрацію NO₃ шляхом відновлення нітратів до нітритів на кадмієвій колонці з подальшим визначенням спектрофотометричним методом за допомогою реактиву Грісса або флуоресцентним методом із 2,3-діамінонафталіном.

2. Визначення S-нітрозотіолів у сироватці крові ґрунтується на тому, що пастка NO (ДТК-Fe) здатна перехоплювати NO з S-нітрозотіолів. До 2 мл сироватки крові додається 0,5 мл 100 мкМ ДТК та 0,5 мл 75 мкМ сульфату заліза; суміш інкубується 40 хв у темряві; осаджуються протеїни; подальший аналіз проводять за схемою, представленою у вищенаведеному методі.

3. Вивчення NO-синтезуючої та нітритредуктазної активності *in vitro*.

До гомогенату печінки як субстрат додається або нітрит натрію (нітритредуктазна активність), або L-аргінін (NO-синтазна активність), а також розчини ДТК та сульфату заліза; інкубується 40 хв при температурі 37 °С; осаджуються протеїни; подальший аналіз проводять за вищенаведеною схемою.

Розроблений метод дозволяє істотно збільшити чутливість та специфічність визначення інтенсивності обміну NO в організмі.