

ISSN 2075-3810 (print)
ISSN 2075-3829 (online)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Біофізичний Вісник

Випуск 49

Заснований 1998 р.

Харків 2023

Біофізичний вісник публікує наукові статті, короткі повідомлення та огляди, які містять оригінальні результати розв'язання фізико-математичних та інженерно-технічних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами експериментальної і теоретичної фізики, математичного та комп'ютерного моделювання. Журнал виходить 2 рази на рік.

Свідоцтво про державну реєстрацію: KB № 11007 від 17.02.2006.

ISSN 2075-3829 (Online)

ISSN 2075-3810 (Print)

Біофізичний вісник є фаховим виданням України категорії «Б» у галузях наук: 10 Природничі науки за спеціальностями 104 Фізика та астрономія, 105 Прикладна фізика та наноматеріали; 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія; 16 Хімічна та біоінженерія за спеціальністю 163 Біомедична інженерія (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1643 від 28.12.2019).

Всі статті проходять внутрішнє та зовнішнє подвійне сліпе рецензування.

Номер затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 10 від 26.06.2023).

Журнал має Digital Object Identifier: **10.26565/2075-3810**.

Головний редактор

Косевич М. В., д.ф.-м.н., с.н.с., п.н.с., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна – головний редактор

Заступник головного редактора

Катрич В. О., д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Відповідальний секретар

Берест В. П., д.ф.-м.н., доцент, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Члени редколегії

Аврунін О. Г., д.т.н., професор, Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків, Україна

Andrushchenko V., PhD, Senior Scientist, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic

Bednarczyk P., Dr. hab., Assistant professor, Warsaw University of Life Sciences, Poland

Binder H., PhD, Dr. rer. nat. habil., Universität Leipzig, Germany

Burkina V., PhD, Researcher, University of South Bohemia in Czech Republic

Вашенко О. В., д.ф.-м.н., с.н.с., п.н.с., Інститут сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

Горбенко Г. П., д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна

Гордієнко О. І., д.ф.-м.н., професор, зав. відділу, Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

Гуцол Т. Д., д.т.н., професор, Поліський національний університет, Житомир, Україна

Довбешко Г. І., д.ф.-м.н., професор, Інститут фізики Національної академії наук України, Київ, Україна

Domanov Ye. A., PhD, Head of Skin Biophysics Group, L'Oréal Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France

Zamaratskaia G., PhD, Associate Professor, Senior Lecturer, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

Жолос О. В., д.б.н., професор, зав. каф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Злепко С. М., д.т.н., професор, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна

Кавок Н. С., к.б.н., с.н.с., Інститут сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

Карачевцев В. О., д.ф.-м.н., професор, член-кор. НАН України, Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна

Корнелюк О. І., д.б.н., професор, член-кор. НАН України, зав. відділу, Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна

Лисецький Л. М., д.ф.-м.н., професор, п.н.с., Інститут сцинтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

Ніколов М. О., к.т.н., с.н.с., доцент, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

Павлов С. В., д.т.н., професор, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна

Попов А. О., к.т.н., доцент, доцент, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

Reva I., PhD, Dr. Hab., Investigador Principal, Departamento de Quimica, Universidade de Coimbra, Portugal

Rutkauskas D., Ph.D., Senior Researcher, Centre for Physical Sciences and Technology, Vilnius, Lithuania

Соляник Г. І., д.ф.-м.н., професор, Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького Національної академії наук України, Київ, Україна

Степаньян С. Г., д.ф.-м.н., с.н.с., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна

Štys D., Prof. RNDr. CSc. Institute of Complex Systems FFPW, University of South Bohemia, Czech Republic

Ткачук Р. А., д.т.н., професор, Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Тернопіль, Україна

Томашевський Р. С., д.т.н., професор, директор навчально-наукового інституту, Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Харків, Україна

Трусова В. М., д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

Feldman Y., Prof., PhD (Phys. & Math.), Director Dielectric Spectroscopy LAB, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

Шестопалова Г. В., д.ф.-м.н., професор, Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова Національної академії наук України, Харків, Україна

Шуба Я. М., д. б. н., професор, академік НАН України, зав. відділу, Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна;

Yakovenko S., PhD, Associate Professor, West Virginia University, School of Medicine, USA

Горобченко О. О., к.ф.-м.н., доцент, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна – *технічний редактор*

Жигалова Н. М., інженер I кат., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна – *технічний секретар*

Біофізичний вісник індексується: Національною бібліотекою України імені В. І. Вернадського; Scopus; Directory of Open Access Journals (DOAJ); Бібліографічною базою даних WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE).

Адреса редколегії та видавництва:

Кафедра молекулярної і медичної біофізики,
Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна

Tel: +38-057-707-55-76

E-mail: biophys-visnyk@karazin.ua

Web-page: <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

© Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2023

© Н. В. Хміль, В. Г. Колесніков, рисунок комплексу

САЛ-пеніцилоєва кислота на першій сторінці обкладинки, 2023

ISSN 2075-3810 (print)
ISSN 2075-3829 (online)

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE
V. N. Karazin Kharkiv National University

Biophysical Bulletin

Issue 49

Founded in 1998

Kharkiv 2023

Biophysical Bulletin publishes original scientific articles, short communications and reviews dealing with physical, mathematical, and engineering problems pertaining to biological systems and solved by methods of experimental and theoretical physics, mathematical modeling and computer simulation. The journal is published twice a year.

Certificate of state registration: KB № 11007 of 17.02.2006.

ISSN 2075-3829 (Online)

ISSN 2075-3810 (Print)

All manuscripts are double blind peer-reviewed by at least two reviewers.

Approved for publication by the Academic Council of V. N. Karazin Kharkiv National University (June 26, 2023, Protocol No. 10).

Biophysical Bulletin has Digital Object Identifier: **10.26565/2075-3810**.

Editor-in-Chief

M. V. Kosevich, Dr. Sci. (Phys. & Math.), B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Deputy Editor-in-Chief

V. A. Katrich, Prof., Dr. Sci. (Phys. & Math.), V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Executive Secretary

V. P. Berest, Dr. Sci. (Phys. & Math.), V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Editorial Board

O. G. Avrunin, Prof., Dr. Sci. (Engin.), Kharkiv National University of Radio Electronics, Kharkiv, Ukraine

V. Andrushchenko, PhD, Senior Scientist, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic

P. Bednarczyk, Dr. hab., Assistant professor, Warsaw University of Life Sciences, Poland

H. Binder, PhD, Dr. rer. nat. habil., Universität Leipzig, Germany

V. Burkina, PhD, researcher, University of South Bohemia, Czech Republic

O. V. Vashchenko, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

G. P. Gorbenko, Prof. Dr. Sci. (Phys. & Math.), V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

O. I. Gordienko, Prof. Dr. Sci. (Phys. & Math.), head Department, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

T. D. Hutsol, Prof. Dr. Sci. (Engin.), Polissia National University, Zhytomyr, Ukraine

G. I. Dovbeshko, Prof. Dr. Sci. (Phys. & Math.), Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Ye. A. Domanov, PhD, Head of Skin Biophysics Group, L'Oréal Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France

G. Zamaratskaia, PhD, Associate Professor, Senior Lecturer, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

A. V. Zholos, Prof., Dr. Sci. (Biol.), head Chair, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

S. M. Zlepko, Dr. Sci. (Engin.), Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia, Ukraine

N. S. Kavok, PhD (Biol.), senior researcher, Institute for Scintillation Materials of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

V. A. Karachevtsev, Prof. Dr. Sci. (Phys. & Math.), Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

A. I. Kornelyuk, Prof. Dr. Sci. (Biol.), Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, Institute of Molecular Biology and Genetics of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

L. N. Lysetskyi, Prof. Dr. Sci. (Phys. & Math.), leading research fellow, Institute for Scintillation Materials of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

N. A. Nikolov, PhD (Engin.), senior researcher, associate professor, National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kiev, Ukraine

S. V. Pavlov, Dr. Sci. (Engin.), Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia, Ukraine

A. A. Popov, PhD (Engin.), Associate professor, National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute" disabled, Kyiv, Ukraine

I. Reva, PhD, Dr. Hab., Investigator Principal, Departamento de Quimica, Universidade de Coimbra, Portugal

Danielis Rutkauskas, PhD, Senior Researcher, Centre for Physical Sciences and Technology, Vilnius, Lithuania

G. I. Solyanik, Prof. Dr. Sci. (Phys. & Math.), R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, Kiev, Ukraine, Ukraine

S. G. Stepanian, Dr. Sci. (Phys. & Math.), B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

D. Štys, Prof. RNDr. CSc. Institute of Complex Systems FFPW, University of South Bohemia, Czech Republic

R. A. Tkachuk, Dr. Sci. (Engin.), Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine

R. S. Tomashevskiy, Prof. Dr. Sci. (Engin.), Director of the Educational and Scientific Institute, National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute" disabled, Kharkiv, Ukraine

V. M. Trusova, Prof. Dr. Sci. (Phys. & Math.), Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Y. Feldman, Prof., PhD (Phys. & Math.), Director Dielectric Spectroscopy LAB, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

A. V. Shestopalova, Prof. Dr. Sci. (Phys. & Math.), O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Y. M. Shuba, Prof. Dr. Sci. (Biol.), Academician of the National Academy of Sciences of Ukraine, Head of the Department, Bogomolets Institute of Physiology disabled of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

S. Yakovenko, PhD, Associate Professor, West Virginia University, School of Medicine, USA

O. A. Gorobchenko, PhD (Phys. & Math.), V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine – *Technical Editor*

N. M. Zhyhalova, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine – *Technical Secretary*

Biophysical Bulletin is indexed in: Vernadsky National Library of Ukraine; Scopus; Directory of Open Access Journals (DOAJ); WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE)

Editorial Office and Publisher:

Department of Molecular and Medical Biophysics
School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems
V. N. Karazin Kharkiv National University,
4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

Tel: +38-057-707-55-76

E-mail: biophys-visnyk@karazin.ua

Web-page: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

ЗМІСТ**МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА****N. V. Khmil, V. G. Kolesnikov**

Molecular docking of human serum albumin with penicillin G determinants 7–19

V. A. Pashynska, M. V. Kosevich, P. O. Kuzema, A. Gomory, L. Drahos

Mass spectrometry study of ascorbyl palmitate as an agent for nanosomes formation 20–33

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ**N. A. Chernobai, N. G. Kadnikova, K. D. Vozovyk, L. F. Rozanov,****I. F. Kovalenko**Effects of salt stress and cooling regimes on the pigment composition of *Dunaliella salina* cells 34–42**БІОФІЗИКА КЛІТИНИ****Н. М. Алабедацькарім, В. П. Берест, Н. М. Моїсєєва, Г. А. Божок,****Т. П. Бондаренко**

Антимікробний пептид граміцидин S впливає на проліферацію та пригнічує адгезію фібробластів лінії L929 43–60

CONTENTS**MOLECULAR BIOPHYSICS**

- N. V. Khmil, V. G. Kolesnikov**
Molecular docking of human serum albumin with penicillin G determinants 7–19
- V. A. Pashynska, M. V. Kosevich, P. O. Kuzema, A. Gomory, L. Drahos**
Mass spectrometry study of ascorbyl palmitate as an agent for nanosomes formation 20–33

ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS

- N. A. Chernobai, N. G. Kadnikova, K. D. Vozovyk, L. F. Rozanov,
I. F. Kovalenko**
Effects of salt stress and cooling regimes on the pigment composition of *Dunaliella salina* cells 34–42

CELL BIOPHYSICS

- N. M. Alabedalkarim, V. P. Berest, N. M. Moiseieva, G. A. Bozhok,
T. P. Bondarenko**
The antimicrobial peptide gramicidin S alters proliferation and inhibits adhesion of L929 cell line fibroblasts 43–60

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-01>

UDC 577.322:[577.112.82:615.33]

MOLECULAR DOCKING OF HUMAN SERUM ALBUMIN WITH PENICILLIN G DETERMINANTS

N. V. Khmil^{1,2}, V. G. Kolesnikov¹

¹ Usikov Institute for Radiophysics and Electronics, NAS of Ukraine, 12 Acad. Proskura Str., Kharkiv, 61085, Ukraine;

² Kharkiv National University of Radio Electronics, 14 Nauky Ave., Kharkiv, 61166, Ukraine
e-mail: khmilnatali@gmail.com

Submitted December 21, 2022; Revised March 23, 2023;

Accepted March 30, 2023

Background: Human serum albumin (HSA) is the main pharmacokinetic effector of many medications, including penicillin G and its metabolites. An urgent problem of practical medicine is immediate hypersensitivity reactions caused by penicillin toxicity (about 8 % compared to other medications), accompanied by skin pathology, anaphylaxis, and fatality.

Objectives: The aim of this study is to describe the structures of penicillin G determinants-HSA complexes and to identify favorable binding sites and the amino acid residues involved in the interaction.

Material and Methods: The crystal structure of HSA (ID: 1AO6 from Protein Data Bank) (www.rcsb.org) was chosen as a docking target. Molecular docking methods (AutoDock Tools 1.5.7, AutoDock Vina 1.1.2) were used to gain insight into the interaction of HSA with the major (benzyl penicilloyl G, penicillanic acid) and minor (penicillamine, penicilloic acid, penilloic acid) determinants of penicillin G. Visualization of docking results was implemented in PyMol 2.5. The Protein Plus server (<https://proteins.plus>) was used to evaluate potential binding pockets. The PLIP tool (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de>) was used to identify non-covalent interactions between HSA and its ligands.

Results: The molecular docking data indicate that the major determinants of penicillin G are involved in the formation of hydrogen bonds with such HSA residues as Trp214, Arg218, His242, and Asn295; for the minor determinants — Asp108, His146, Tyr148, Ser193, Arg197, Gln204. Both types of determinants are located in the hydrophobic cavity of subdomains IIA and IB. Hydrophobic interactions are present mainly between penicillin G determinants and amino acid residues of subdomain IIIA, such as Ala350, Asp451, Tyr452, and Gln459.

Conclusion: The study of penicillin G determinants-HSA complexes is important in the pathogenesis of antibiotic allergy. Identification of specific binding sites can be useful for the development and synthesis of new immunogenic antigens (complexes of major and minor determinants of penicillin G with HSA) that can stimulate the immune system and produce specific antibodies to prevent allergic reactions.

KEY WORDS: human serum albumin; penicillin G determinants; immediate hypersensitivity reactions; molecular docking.

Penicillins are the first-line medications for the treatment of various types of bacterial infections that can affect the throat, lungs, skin, intestines, and many other organs. In addition, surgical site infections are the most common infections in surgical patients. In this case, there is a need for pre- and postoperative antibiotic therapy for patients [1, 2]. At the same time,

In cites: Khmil NV, Kolesnikov VG. Molecular docking of human serum albumin with penicillin G determinants. *Biophysical Bulletin*. 2023;49:7–19. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-01>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

clinical trials have shown a high percentage of immediate hypersensitivity reactions to penicillins [3]. In general, medication hypersensitivity reactions include symptoms and manifestations caused by medication at a dose that is perceived by normal people. Immediate hypersensitivity reactions occur within the first hour after medication intake and are manifested by complete anaphylaxis, with damage to the skin, gastrointestinal tract, respiratory and cardiovascular systems [4]. Approximately 8 % of the population is allergic to penicillin. It has been reported that 35 % of anaphylaxis cases accompanied by angioedema, urticaria, bronchospasm, and hypotension are associated with immediate hypersensitive reactions to penicillins [5]. Penicillin G is an inactive antigen, a chemical hapten that does not exhibit immunogenic properties. The immune response can be induced by metabolically biotransformed penicillin molecules into immunologically reactive major and minor antigenic determinants [6].

Human serum albumin (HSA) is a protein present in large quantities in blood plasma that provides important physiological functions, such as the regulation of colloidal osmotic pressure, transport of many endogenous (fatty acids, hormones, amino acids, toxic metabolites) and exogenous (drugs, nutrients) compounds [7, 8]. HSA is a globular single-chain protein consisting of 585 amino acids and has three homologous domains with amino acid residues: domain I (1–195), domain II (196–383), and domain III (384–585). Each domain is divided into two subdomains: IA (1–107), IB (108–196); IIA (197–297), IIB (298–383), IIIA (384–497), IIIB (498–585). The molecular weight of HSA is 66,5 kDa [9]. 35 cysteine residues, except for one (Cys34 in domain I), are involved in 17 disulfide bonds that stabilize the structure of HSA [10].

The concentration of HSA in plasma is high, so the binding affinity of HSA to drugs is the key factor determining their pharmacokinetics and pharmacodynamics, especially when creating new dosage forms and vaccines [11, 12]. For several decades, the interaction of antibiotics with HSA has been studied by fluorescence spectroscopy, visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, and protein-ligand docking methods [13, 14]. For example, fluorescence studies show that displacement of fluorescent probes such as 1-aminonaphthalene-8-sulfonate, and dansylsarcosine piperidinium salt from the binding site on albumin leads to the fact that subdomain II is involved in the binding of isoxazolylpenicillins [15]. In addition, fluorescence spectroscopy has been used to directly determine the binding sites of other antibiotics to HSA, and the results were similar: subdomain II of HSA was responsible for ligand binding [16, 17]. However, a detailed and substantiated mechanism for the formation of the HSA complex with possible molecular metabolites of penicillins has not yet been established, although there is evidence of haptization of penicillin determinants by conjugation with HSA, which leads to the formation of IgE antibodies.

The aim of this study is to describe the structures of penicillin G determinants-HSA complexes and to identify the favorable binding sites involving certain amino acid residues.

MATERIALS AND METHODS

The 3D model of HSA was downloaded from the Protein Data Bank (www.rcsb.org) (ID: 1AO6); the 3D crystal structure is the result of X-ray diffraction at 2,5 Å resolution and was used as a docking target. The ligands — benzyl penicilloyl G, penicillanic acid (major determinants), penicillamine, penicilloic acid, penilloic acid (minor determinants) from (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) were used to identify the energetically most favorable binding sites on the HSA molecule.

Molecular docking methods (AutoDock 1.5.7, AutoDock Vina 1.1.2) were used to study the interaction of penicillin G determinants with HAS, which helps to find the space for the

most energetically favorable conformation of the protein-ligand complex and allows to estimate its geometric dimensions with the lowest binding energy [21]. The AutoDock scoring function is a subset of the Amber force field that processes molecules using the United Atom model [22]. The grid spacing, i.e., the distance between the grid points, was 0,503 Å. The search space is a 50 Å × 50 Å × 50 Å square; the exhaustiveness parameter was 8. This block covers amino acid residues of subdomain IIA and part of subdomain IB. Since the PDB files were missing hydrogen atoms, Coleman charges were added to fit the electrostatic potentials, and hydrogen atoms were added using AutoDock Tools to properly optimize the proteins. Protonation of amino acid residues at pH=7 was checked using Propka 3.1 [23].

Visualization of docking results was done in PyMol 2.5 [24]. To convert PyMol files to pdb format, the interactive converter MichelaNGLo was used (<https://michelangelo.sgc.ox.ac.uk/pymol>).

DoGSiteScorer from Proteins Plus was used to detect potential binding pockets and to compare with docking results. The surface area, the volume and depth of pockets, and chemical features were calculated using DoGSiteScorer [25, 26]. The relative hydrophobicity of amino acid residues was evaluated to know the general properties of HSA. Two-dimensional diagrams of complexes with known 3D structures, which describe the directed hydrogen bonds between the protein residues and the ligand were created for some complexes with PoseView [27, 28].

For the identification of non-covalent interactions between HSA and its ligands, the protein-ligand interaction profiler (PLIP) web tool was applied (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de>) [29].

RESULTS AND DISCUSSION

Our molecular docking study was performed on the crystal structure of HSA, which was downloaded from the Protein Data Bank (ID: 1AO6), to identify possible binding sites, which are major and minor determinants of penicillin G. The five ligands are listed in Tabl. 1. Most ligands have an open β-lactam ring and a closed thiazolidine ring. The maximum molecular weight of the ligand was 465.6 g/mol, and the lowest was – 149.21 g/mol. The range of free binding energies predicted by AutoDock Vina was from -7.9 kcal/mol to -4.7 kcal/mol. The best energy results of -7.9 kcal/mol and -7.2 kcal/mol showed that both major and minor determinants can be located within subdomain IIA.

It is known that under physiological conditions, 95 % of penicillin spontaneously degrades to major and minor antigen determinants. Immediate hypersensitivity reactions, and allergic reactions in particular, occur less to the main β-lactam part of the penicillin molecule, and mostly form IgE antibodies directed against a certain side chain R (variable side chain of penicillins) [4, 5]. The structure of the penicillin core is shown in Fig. 1.

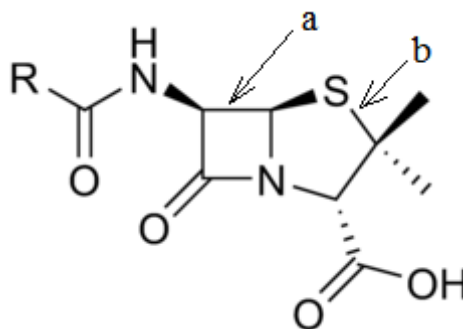
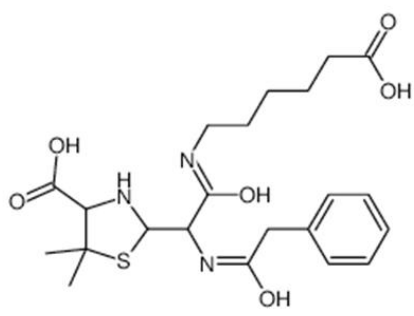
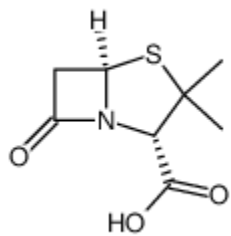
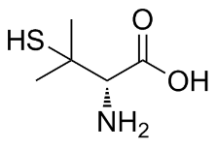
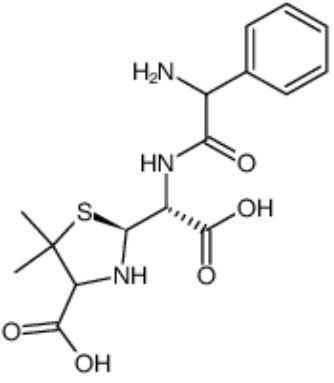
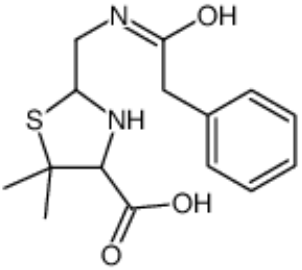


Fig. 1. The structure of penicillin: a) four-membered β-lactam ring, b) five-membered thiazolidine ring. The molecular formula is $R-C_9H_{11}N_2O_4S$, where R is a side chain, in the case of penicillin G, R is a phenyl ring.

Table 1. List of ligands

PubChem ID	ΔG , kcal/mol	Name	M, g/mol	2D structure of hapten determinants
Compound ID: 119212	-7.9	Benzyl penicilloyl G	465,6	
Compound ID: 6891	-6.0	Penicillanic acid	201.25	
Compound ID: 5852	-4.7	Penicillamine	149.21	
Compound ID: 52921568	-6.3	Penicilloic acid	262.29	
Compound ID: 255293	-7.2	Penilloic acid	308.4	

The optimal recognition of penicillin determinants by specific IgE antibodies is considered to be specific binding to a carrier molecule such as HSA. The parameters of binding of penicillin G determinants to HSA are the main factors in the ability of each complex to bind to the antigen-presenting cells to initiate subsequent hypersensitivity reactions.

Therefore, in this study we used molecular docking and a detailed analysis of its results to identify energetically favorable binding sites of penicillin G determinants-HSA complexes. The calculation of the hydrophobicity of HSA upon binding to different ligands was evaluated using Protein Plus. Our results confirmed the data of molecular dynamic modeling that the properties of HSA in the studied subdomains are more hydrophobic, but some amino acids are hydrophilic [30]. The hydrophobicity values of the binding pockets were in the range of 0.65–0.76.

The binding site volume and the binding site depth were estimated to predict the topology and geometry of the active site in complexes of HSA-penicillin G determinants to visualize the depth of penetration and placement of ligands based on their structure. Identification and characterization of the size of binding pockets based on these parameters was evaluated in Protein Plus using DoGSiteScore. This is a method based on predicting active sites in proteins based on the difference in Gaussian (DoG) approach [25]. With this approach, spatial and topological molecular descriptors help in finding the best surface area, binding site volume, and binding site depth. In the study, the volume of the ligand-binding pocket varied widely in the range of 155.65 \AA^3 – 801.28 \AA^3 , the depth of the ligand-binding pocket also varied and ranged from 13.69 \AA to 32.19 \AA . The surface area also ranged from 445.09 \AA^2 to 2151.78 \AA^2 .

The binding of the benzyl penicilloyl G molecule involves weak interactions, in particular, between the β -lactam ring and the thiazolidine ring and amino acid residues, which are capable of forming hydrogen bonds and hydrophobic interactions at the level of the hydrophobic pocket located in subdomain IIA and in subdomain IIIA (Fig. 2, Fig. 3). Lys195, Asp451, Tyr452, and Lys444 are involved in the formation of hydrophobic interactions, and Trp214, Arg218, Asn295, Pro339, and Pro447 form hydrogen bonds between the nitrogen atom of the open β -lactam ring and the thiazolidine ring and the oxygen atom of the benzyl penicilloyl G molecule.

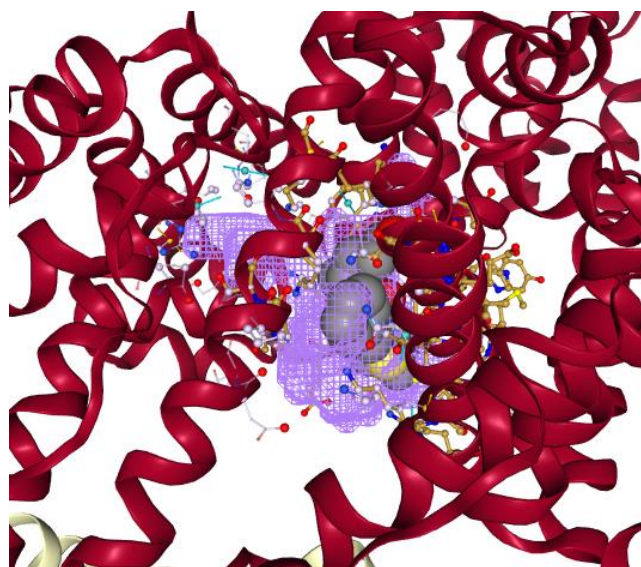


Fig. 2. The HSA-benzyl penicilloyl G complex (constructed in Protein Plus tool). The structure of HSA is represented by ribbons; the ligand benzyl penicilloyl G is represented as balls. The ligand binding pocket of HSA is marked in pale purple and has a depth of 28.74 \AA . The surface area and volume of the binding site are 1617.97 \AA^2 and 801.28 \AA^3 , correspondingly. The hydrophobicity of the binding pocket is 0.69.

Penicillanic acid is also the major determinant of penicillin allergy. Among other ligands, only penicillanic acid has closed rings both β -lactam and thiazolidine (Fig. 4). In the case of penicillanic acid, the surface area of the ligand binding pocket was 13.69 Å.

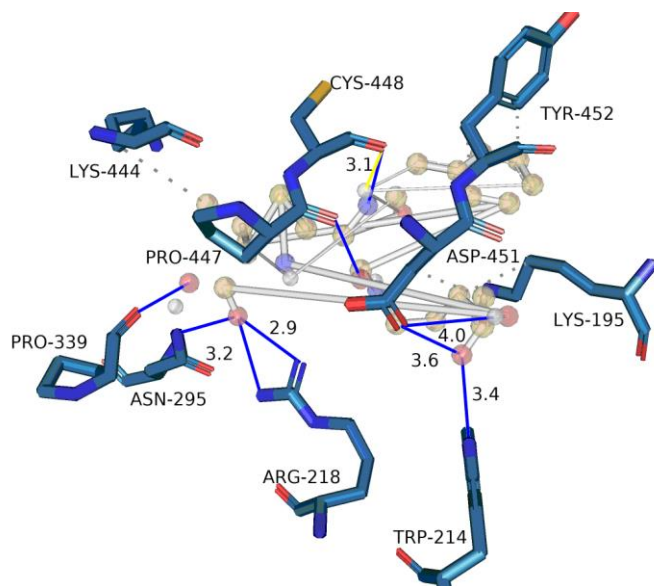


Fig. 3. The 3D contact map of benzyl penicilloyl G and HSA binding domain (constructed in PLIP tool). Hydrogen bonds are shown as thin blue solid lines, hydrophobic interactions are shown as gray dotted lines.

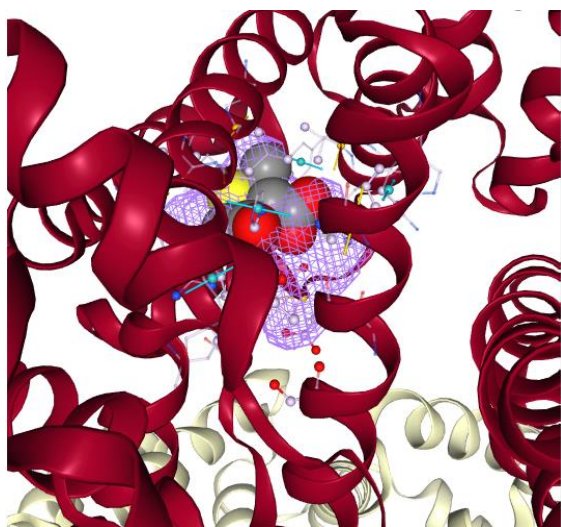


Fig. 4. The HSA-penicillanic acid complex (constructed in Protein Plus tool). The structure of HSA is represented by ribbons; the ligand penicillanic acid is represented as balls. The ligand binding pocket of HSA is marked in pale purple and has a depth of 13.69 Å. The surface area and volume of the binding site are 445.09 Å² and 155.65 Å³, correspondingly. The hydrophobicity of the binding pocket is 0.76.

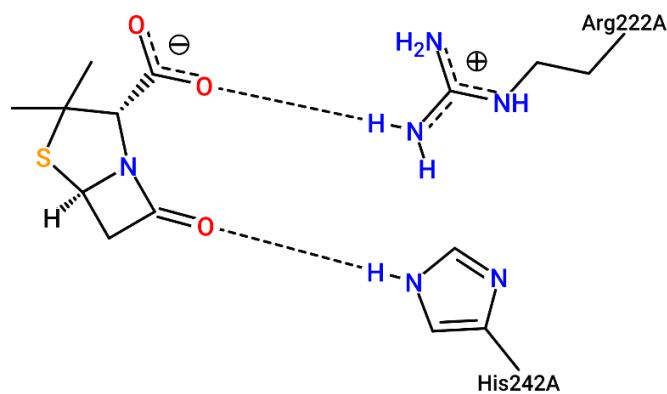


Fig. 5. Two-dimensional diagram of HSA-penicillanic acid complex with hydrogen bonds between the protein residues and the ligand; hydrogen bonds are shown as black dot lines.

As shown in Fig. 5, the oxygen atoms of the thiazolidine ring and the β -lactam ring formed hydrogen bonds with Arg222 and His242, respectively. At the same time, hydrogen bonds are not exclusively one type of interaction between HSA and penicillanic acid: the hydrophobic interactions were observed at the contact sites with Ile290, Leu219, and Leu238 (Fig. 6).

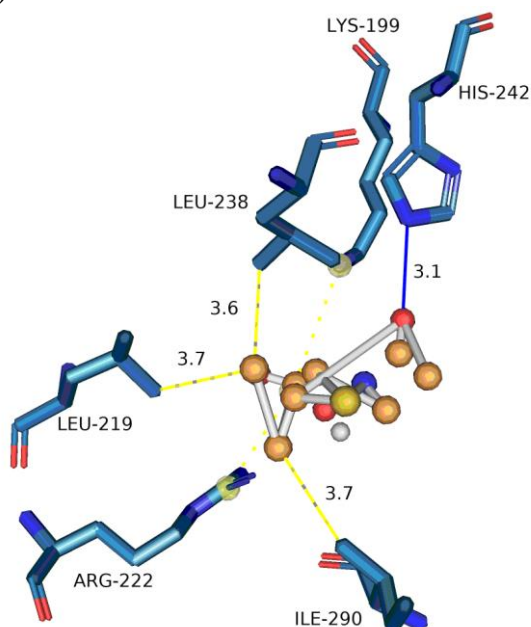


Fig. 6. The 3D contact map of penicillanic acid and HSA binding domain (constructed in PLIP tool). Hydrogen bonds are shown as thin blue solid lines, and hydrophobic interactions are shown as yellow dotted lines.

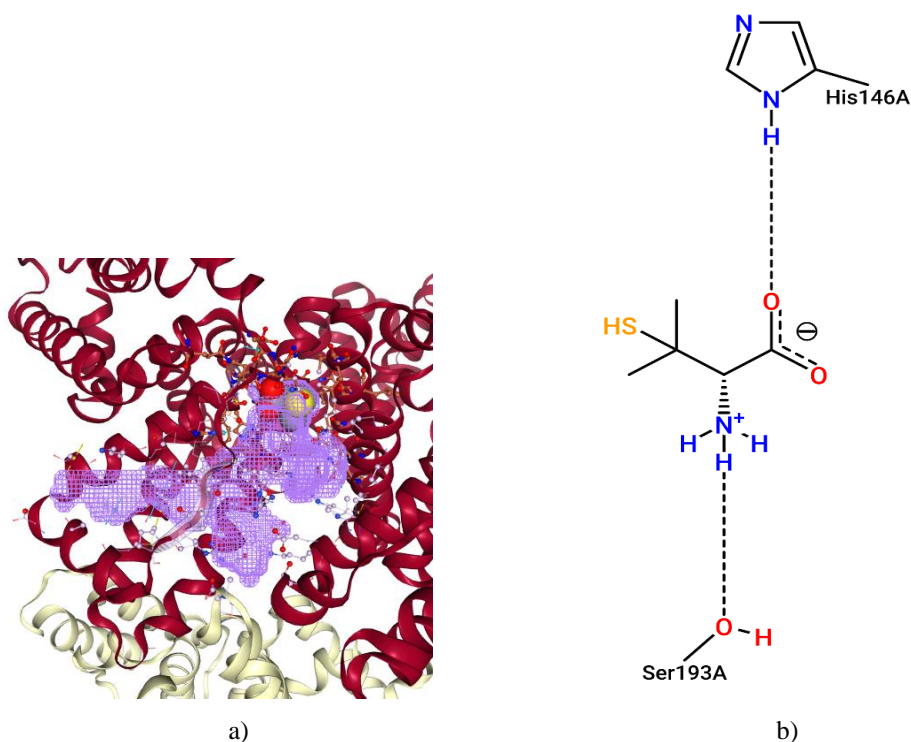


Fig. 7. The structure of HSA-penicillamine complex (constructed in Protein Plus). a) The structure of HSA is represented by ribbons; ligand penicillamine is represented as balls. The ligand binding pocket of HSA is marked in pale purple and has a depth of 32.19 Å. The surface area, and volume of the binding site are 2151.78Å² and 709.12 Å³, correspondingly. The hydrophobicity of the binding pocket is 0.71; b) The two-dimensional diagram of HSA-penicillamine complex with hydrogen bonds between the protein residues and the ligand.

As seen from Tabl. 1 the free energy change is the lowest for minor determinant with the lowest molecular weight that has both open β -lactam and thiazolidine ring (penicillamine) compared to the other determinants. The penicillamine binding site is located inside the hydrophobic pocket formed by several subdomains – IA, IIA, and IIIA. In this case, the depth of the ligand binding pocket is the largest and is 32.19 Å (Fig. 7a). Positively charged Arg197 and neutral Gln459 established hydrophobic bonds with the ligand (Fig. 8). Fig. 7b shows that polar amino acid residue Ser193 and positively charged residue His146 also form hydrogen bonds with penicillamine ligand.

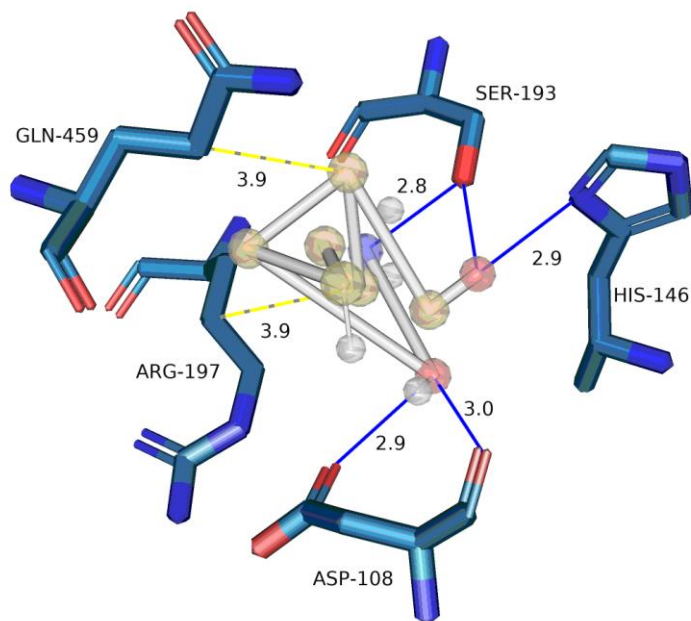


Fig. 8. The 3D contact map of penicillamine and HSA binding domain (constructed in PLIP). Hydrogen bonds are shown as thin blue solid lines, and hydrophobic interactions are shown as yellow dotted lines.

Penicilloic acid is the minor determinant that is formed from penicillins by hydrolytic opening of the β -lactam ring. In the case of penicilloic acid (Fig. 9), the ligand binding sites are located in subdomain IA (Leu103), IB (Asp108), and in the hydrophobic cavity in subdomain IIA (Tyr148).

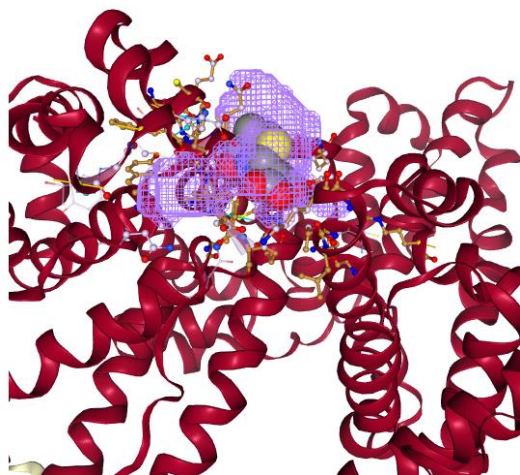


Fig. 9. The complex HSA-penicilloic acid (constructed in Protein Plus). The structure of HSA is represented by ribbons; ligand penicilloic acid is represented as balls. The ligand binding pocket of HSA is marked in pale purple and has a depth of 22.37 Å. The surface area and volume of the binding site are 1260.67 Å² and 538.11 Å³, correspondingly. The hydrophobicity of the binding pocket is 0.65.

The penicilloic acid-HSA complex is stabilized by hydrogen bonds between Tyr148 and Arg197 residues of subdomains IB and IIA and the nitrogen of the thiazolidine ring and the oxygen of the open β -lactam ring, respectively (Fig. 10). The hydrophobic interaction is also

involved in the binding through Gln204. In addition to hydrophobic and hydrogen bonds, salt bridges are involved in the ligand-protein complexation (Fig. 11).

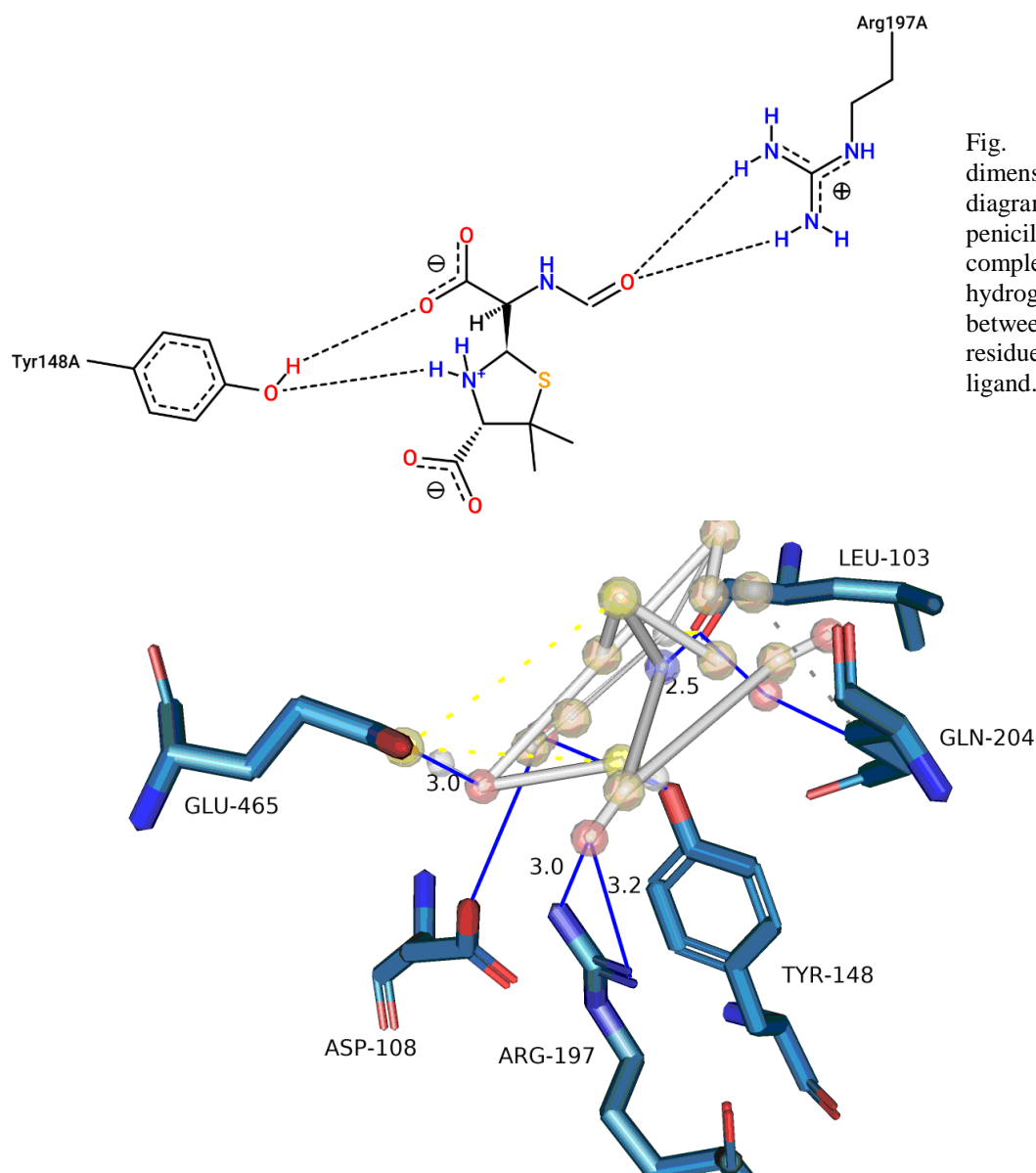


Fig. 10. Two-dimensional diagram of HSA-penicilloic acid complex with hydrogen bonds between the protein residues and the ligand.

Fig. 11. The 3D contact map of penicilloic acid and HSA binding domain (constructed in PLIP tool). Hydrogen bonds are shown as thin blue solid lines, hydrophobic interactions are shown as gray dotted lines, and salt bridges are shown as yellow dotted lines.

Residues Arg209, Lys212, Val216, and Ala350 of HSA have been implicated in the binding process with penicilloic acid and they are all located mainly in subdomain IIA, and in part in subdomain IIIA (Fig. 12, Fig. 13). In the case of penicilloic acid, hydrogen bonds and hydrophobic interactions are available. Hydrophobic interactions are involved in the binding of Lys212 and Val216 to the minor determinant. Hydrogen bond is formed between the nitrogen of Arg209 and the hydrogen of the thiazolidine ring of the ligand.

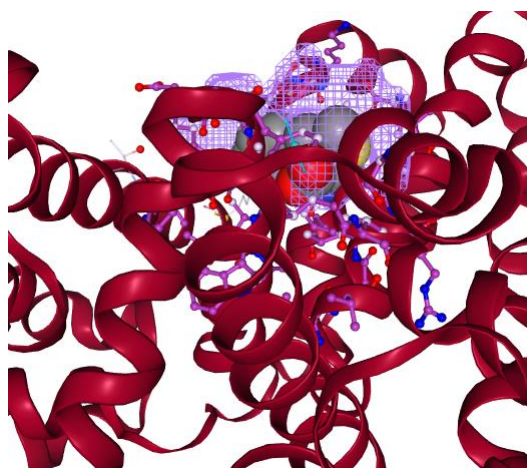


Fig. 12. The HSA-penilloic acid complex (constructed in Protein Plus). The structure of HSA is represented by ribbons; the ligand penilloic acid is represented as balls. The ligand binding pocket of HSA is marked in pale purple and has a depth of 20.46 Å. The surface area and volume of the binding site are 792.03 Å² and 357.38 Å³, correspondingly. The hydrophobicity of the binding pocket is 0.74.

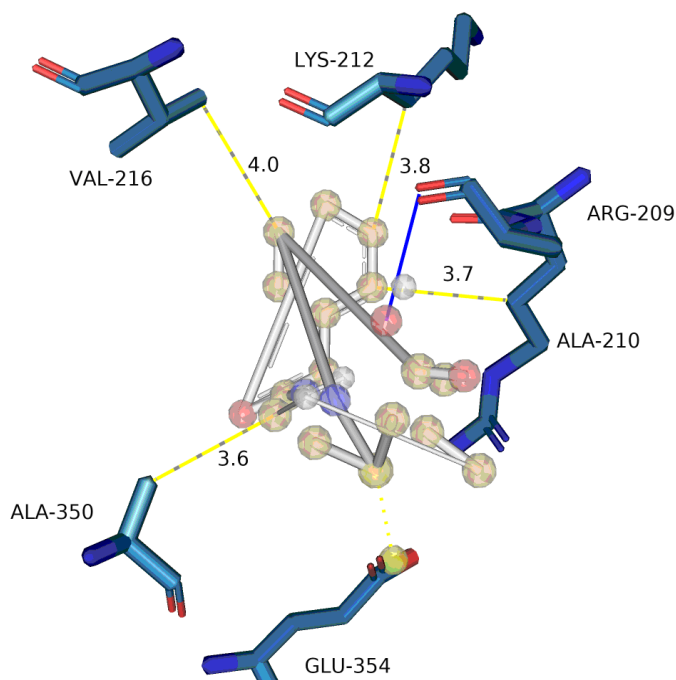


Fig. 13. The 3D contact map of penilloic acid and HSA binding domain (constructed in PLIP tool). Hydrogen bonds are shown as thin blue solid lines, and hydrophobic interactions are shown as yellow dotted lines.

HSA has structural homology (about 80 %) with bovine serum albumin (BSA) [9]. It has been reported that the β -lactam antibiotics have very similar binding properties to HSA and BSA [31]. The binding sites of the penicillin G to BSA are located in the subdomain IIA. In our study, all five penicillin G determinants were mainly inserted into the subdomain IIA by hydrogen bonds and hydrophobic interaction, while in the case of BSA, the same binding site exists but is stabilized by hydrogen bonds and Van der Waals forces. Similar to the penicillin G molecule, which binds to BSA in the subdomain IIA through hydrogen bonds (Arg194, Arg198, Arg256), benzyl penilloyl G also binds to HSA at the subdomain IIA with the participation of Arg197, and Arg218 [32].

Yvon M., et al. has reported that benzyl penilloyl G can also form stronger bonds between the carbonyl group and ϵ -amino groups of the HSA molecule, especially with Lys190, Lys195, Lys199, and Ser193, forming conjugates that have the immunogenic potential [33].

Our results have been confirmed by other studies. The fluorescence spectroscopy experiments of Seedher N., et al. [15] revealed that β -lactam antibiotics bind to HSA, and the

binding site is located in the subdomain IIA of HSA. This result confirms our molecular docking results. Similar to other studies, our results showed that hydrogen bonds and hydrophobic interaction were the driving forces for the spontaneous placement of penicillin G determinants in the HSA binding site, since the Gibbs free energy of complexes has minimal values -7.9 kcal/mol is our result of molecular docking of HSA-benzyl penicilloyl G vs. -6.4 kcal/mol is the result of molecular docking of HSA-sulfadimethoxine obtained by Zhang Y. and co-authors. [34]).

CONCLUSIONS

Today there is little published information about HSA-penicillin G determinants complexes. Therefore, in the presented study we elucidated the binding sites using molecular docking. The obtained results and their analysis allow us to make the following conclusions.

Penicillin G determinants binding to HSA occur with the participation of a few subdomains. The amino acid residues of subdomain IIA and subdomain IB, which are involved in hydrogen bonds and hydrophobic interactions have the main role in ligand binding; the amino acid residues of subdomain IIIA take part in binding partially.

The study of HSA-penicillin G determinants complexes is important in the pathogenesis of antibiotic allergy. Identification of specific binding sites can be useful for the development and synthesis of new immunogenic antigens (complexes of major and minor determinants of penicillin G with HSA) that can stimulate the immune system and produce specific antibodies to prevent allergic reactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Prof. Shestopalova A. V. and Miroshnichenko E. V. for their useful consultation and practical advice.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report that there is no conflict of interest.

AUTHORS' ORCID ID

N. V. Khmil  <https://orcid.org/0000-0001-7916-5921>

V. G. Kolesnikov  <https://orcid.org/0000-0001-7822-4774>

REFERENCES

1. Batra A, Roemhild R, Rousseau E, Franzenburg S, Niemann S, Schulenburg H. High potency of sequential therapy with only β -lactam antibiotics. *eLife*. 2021;10:e68876. <https://doi.org/10.7554/eLife.68876>
2. Turner J, Muraoka A, Bedenbaugh M, Childress B, Pernot L, Wiencek M, et al. The chemical relationship among beta-lactam antibiotics and potential impacts on reactivity and decomposition. *Front Microbiol*. 2022;13:807955. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.807955>
3. Maguire M, Hayes BD, Fuh L. Beta-lactam antibiotic test doses in the emergency department. *World Allergy Organ J*. 2020;13(1):100093. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2019.100093>
4. Brockow K. Drug Allergy: Definitions and Phenotypes. In: Khan DA, Banerji A, editors. *Drug Allergy Testing*. Elsevier; 2018. p. 19–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48551-7.00003-1>
5. Wilkerson GR. Drug Hypersensitivity Reactions. *Emerg Med Clin N Am*. 2022;40:39–55. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2021.09.001>
6. Canzani D, Aldeek F. Penicillin G's function, metabolites, allergy, and resistance. *J Nutr Hum Health*. 2017;1(1):28–40. <http://doi.org/10.35841/nutrition-human-health.1.1.28-40>
7. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med*. 2012;33(3):209–90. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>
8. Yamasaki K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5435–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.005>
9. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 1992;358(6383):209–15. <https://doi.org/10.1038/358209a0>

10. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* 1999;12: 439–46. <https://doi.org/10.1093/protein/12.6.439>
11. Vallianatou T, Lambrinidis G, Tsantili-Kakoulidou A. In silico prediction of human serum albumin binding for drug leads. *Expert Opin. Drug. Discov.* 2013;8(5):583–95. <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.777424>
12. Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):3580–95. <http://doi.org/10.3390/ijms15033580>
13. Calderaro A, Maugeri A, Magazù S, Laganà G, Navarra M, Barreca D. Molecular basis of interactions between the antibiotic nitrofurantoin and human serum albumin: a mechanism for the rapid drug blood transportation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8740. <https://doi.org/10.3390/ijms22168740>
14. Abou-Zied OK, Al-Shihi OI. Characterization of subdomain IIA binding site of human serum albumin in its native, unfolded, and refolded states using small molecular probes. *J Am Chem Soc.* 2008;130:10793–801. <https://doi.org/10.1021/ja8031289>
15. Seedher N, Agarwal P. Interaction of some isoxazolyl penicillins with human serum albumin. *J Biol Sci.* 2006;6(1):167–72. <http://doi.org/10.3923/jbs.2006.167.172>
16. Ahmad B, Parveen S, Khan RH. Effect of albumin conformation on the binding of ciprofloxacin to human serum albumin: a novel approach directly assigning binding site. *Biomacromolecules.* 2006;7:1350–56. <http://doi.org/10.1021/bm050996b>
17. Barabosa S, Taboada P, Attwood D, Mosquera V. Thermodynamic properties of the complex formed by interaction of two anionic amphiphilic penicillins with human serum albumin. *Langmuir.* 2003;19:10200–204. <https://doi.org/10.1021/la035106x>
18. DiPiro JT, Adkinson NF, Hamilton RG. Facilitation of penicillin haptentation to serum proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(7):1463–67. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.7.1463>
19. Blanca M, Mayorga C, Perez E, Suau R, Juarez C, Vega JM, et al. Determination of IgE antibodies to the benzyl penicilloyl determinant. A comparison between poly-L-lysine and human serum albumin as carriers. *J Immunol Methods.* 1992;153(1-2):99–105. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90311-g](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90311-g)
20. Zhao Z, Batley M, D'Ambrosio C, Baldo BA. In vitro reactivity of penicilloyl and penicillanyl albumin and polylysine conjugates with IgE-antibody. *J Immunol Methods.* 2000;242(1–2):43–51. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00213-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00213-1)
21. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comp chem.* 2010;31(2):455–61. <http://doi.org/10.1002/jcc.21334>
22. Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Current Protocols in Bioinformatics.* 2008;24(1):8141–440. <http://doi.org/10.1002/0471250953.bio0814s24>
23. Søndergaard CR, Olsson MH, Rostkowski M, Jensen JH. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pKa values. *J Chem Theory Comput.* 2011;7(7):2284–95. <https://doi.org/10.1021/ct200133y>
24. Schrödinger L, DeLano W. PyMOL [Internet]. [cited 2020]. Available from: <http://www.pymol.org/pymol>
25. Volkamer A, Griewel A, Grombacher T, Rarey M. Analyzing the topology of active sites: on the prediction of pockets and subpockets. *J Chem Inf Model.* 2010;50(11):2041–52. <https://doi.org/10.1021/ci100241y>
26. Volkamer A, Kuhn D, Grombacher T, Rippmann F, Rarey M. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J Chem Inf Model.* 2012;52(2):360–72. <https://doi.org/10.1021/ci200454v>
27. Stierand K, Maass PC, Rarey M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. *Bioinformatics.* 2006;22(14):1710–16. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl1150>
28. Fricker PC, Gastreich M, Rarey M. Automated drawing of structural molecular formulas under constraints. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004;44(3): 1065–78. <https://doi.org/10.1021/ci049958u>
29. Adasme MF. PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucl Acids Res.* 2021;49(1): 530–34. <http://doi.org/10.1093/nar/gkab294>
30. Retnaningtyas E, Sumitro SB, Soeatmadji DW, Widjayanto E. Molecular dynamics simulation for revealing the role of water molecules on conformational change of human serum albumin. *Int J Pharm Clin Res.* 2016;8(3):158–61. <http://impactfactor.org/PDF/IJPCR/8/IJPCR,Vol8,Issue3,Article1.pdf>
31. Keswani N, Choudhary S, Kishore N. Interaction of weakly bound antibiotics neomycin and lincomycin with bovine and human serum albumin: biophysical approach. *J Biochem.* 2010;148(1):71–84. <http://doi.org/10.1093/jb/mvq035>
32. Li Q, Zhang T, Bian L. Recognition and binding of β-lactam antibiotics to bovine serum albumin by frontal affinity chromatography in combination with spectroscopy and molecular docking. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1014:90–101. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.005>

33. Yvon M, Anglade P, Wal JM. Binding of benzyl penicilloyl to human serum albumin. Evidence for a highly reactive region at the junction of domains 1 and 2 of the albumin molecule. FEBS Lett. 1989;247(2):273–78. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81351-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81351-1)
34. Zhang Y, Cao Y, Li Y, Zhang X. Interactions between human serum albumin and sulfadimethoxine determined using spectroscopy and molecular docking. Molecules. 2022;27:1526. <https://doi.org/10.3390/molecules27051526>

МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ СІРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ ЛЮДИНИ З ДЕТЕРМІНАНТАМИ ПЕНІЦИЛІНУ G

Н. В. Хміль^{1,2}, В. Г. Колесніков¹

¹ Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна;

² Харківський національний університет радіоелектроніки, пр. Науки, 14, Харків, 61166, Україна

Надійшла до редакції 21 грудня 2022 р. Переглянута 23 березня 2023 р.

Прийнята до друку 30 березня 2023 р.

Актуальність. Сироватковий альбумін людини (САЛ) є основним фармакокінетичним ефектором багатьох ліків, в тому числі пеніциліну G та його метаболітів. Гострою проблемою практичної медицини є реакції гіперчутливості негайного типу, які зумовлені токсичністю пеніцилінів (близько 8% проти інших препаратів), що супроводжуються патологією шкіри, анафілаксією та летальністю.

Мета роботи. Метою цього дослідження є опис структур комплексів САЛ-детермінанти пеніциліну G і виявлення сприятливих сайтів зв'язування та амінокислотних залишків, які залучені до взаємодії.

Матеріали та методи. Кристалічна структура САЛ (ID:1AO6 з Protein Data Bank) (www.rcsb.org) була вибрана як мішень для докінгу. Для отримання уявлення про взаємодію САЛ з основними (бензил пеніцилоїл G, пеніциланова кислота) і другорядними (пеніциламін, пеніцилоєва кислота, пенілоєва кислота) детермінантами пеніциліну G були застосовані методи молекулярного докінгу (AutoDock Tools 1.5.7, AutoDock Vina 1.1.2). Візуалізація результатів докінгу була реалізована в PyMol 2.5. Для оцінки потенційних сайтів зв'язування був використаний Protein Plus сервер (<https://proteins.plus>). Для ідентифікації нековалентних взаємодій між САЛ та його лігандами був застосований засіб PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de>).

Результати. Дані молекулярного моделювання свідчать, що основні детермінанти пеніциліну G беруть участь в утворенні водневих зв'язків з такими залишками САЛ, як Trp214, Arg218, His242 та Asn295; для другорядних детермінант — Asp108, His146, Tyr148, Ser193, Arg197, Gln204. Обидва типи детермінант розташовуються в гідрофобній порожнині субдоменів ІА та ІВ. Гідрофобні взаємодії присутні переважно між детермінантами пеніциліну G і амінокислотними залишками субдомену ІІА, такими як Ala350, Asp451, Tyr452 і Gln459.

Висновки. Вивчення комплексів САЛ-детермінанти пеніциліну G має важливе значення в патогенезі алергії на антибіотики. Виявлення специфічних сайтів зв'язування може бути корисним для розробки та синтезу нових імуногенних антигенів (комплексів основних і другорядних детермінант пеніциліну G із САЛ), які зможуть стимулювати імунну систему та виробляти специфічні антитіла для запобігання алергічної реакції.






КЛЮЧОВІ СЛОВА: сироватковий альбумін людини; детермінанти пеніциліну G; реакції гіперчутливості негайного типу; молекулярний докінг.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-02>

UDC 577.32:543.51

MASS SPECTROMETRY STUDY OF ASCORBYL PALMITATE AS AN AGENT FOR NANOSOMES FORMATION

V. A. Pashynska¹, M. V. Kosevich¹, P. O. Kuzema², A. Gomory³, L. Drahos³

¹ B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky Avenue, Kharkiv, 61103, Ukraine;

² Chuiko Institute of Surface Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, 17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine;

³ Institute of Organic Chemistry, Research Centre for Natural Sciences, Magyar tudosok korutja 2, Budapest, H-1117, Hungary

e-mail: vlada.pashynska@gmail.com

Submitted May 22, 2023; Revised June 24, 2023;

Accepted June 26, 2023

Background: Study of properties and intermolecular interactions of biologically active compounds which can be used for the purposes of transmembrane drug delivery is a topical task of modern molecular biophysics. Ascorbyl palmitate (AP) as a fat-soluble form of vitamin C has recently attracted attention as a promising agent for the formation of nanosomes for the “fat insoluble” drug molecules transfer through membranes. However, AP is not sufficiently characterized by up-to-date soft ionization mass spectrometric techniques.

Objectives: The aim of the present work is to characterize AP and its intermolecular interactions by a number of mass spectrometric techniques: Electrospray Ionization (ESI), Laser Desorption/Ionization (LDI) and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI). The comparison of these techniques applicability to the study of AP intermolecular interactions as a drug delivery assisting agent is scheduled.

Methods: ESI mass spectra are obtained with triple quadrupole Micromass Quattro mass spectrometer. LDI and MALDI experiments are performed by Autoflex II mass spectrometer.

Results: In the ESI experiments in the positive ion mode abundant peaks of protonated and cationized AP molecules as well as the peaks of AP clusters $n\text{AP}\cdot\text{H}^+$ and $n\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ ($n=2\div 4$) are revealed in the mass spectra. This result testifies to the formation of stable noncovalent complexes of the AP molecules in the polar media and confirms the AP ability of formation nanosomes for drug delivery. Analysis of LDI and MALDI mass spectra of AP in positive and negative ion modes shows that in the presence of molecular ions of AP, the peaks of AP dimers or larger AP clusters are not recorded. The ESI probing of the model system containing AP and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) reveals stable $\text{AP}\cdot\text{DPPC}\cdot\text{H}^+$ complex which models the AP intermolecular interactions with the phospholipid components of biomembranes and/or liposomes under AP functioning as a drug delivery assisting agent.

Conclusions: The current study demonstrates the applicability of all tested mass spectrometric techniques for AP identification in solutions and solid phase, while for the purpose of examining of the AP noncovalent complexes formation and study of AP interactions with biomolecules the ESI is defined as the most effective technique.

KEYWORDS: ascorbyl palmitate; nanosomes for drug delivery; dipalmitoylphosphatidylcholine; noncovalent complexes; mass spectrometry; electrospray ionization; laser desorption/ionization; matrix-assisted laser desorption/ionization.

In cites: Pashynska VA, Kosevich MV, Kuzema PO, Gomory A, Drahos L. Mass spectrometry study of ascorbyl palmitate as an agent for nanosomes formation. Biophysical Bulletin. 2023;49:20–33. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-02>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Ascorbyl palmitate (AP) is a biologically active compound known as “fat-soluble vitamin C” which demonstrates a number of therapeutic activities [1]. Attachment of a moiety of palmitic fatty acid to ascorbic acid aimed at creating its fat-soluble form [2] resulted in the synthesis of AP whose biological activity appeared to be more extended than the expected antioxidant effect inherent to vitamin C [3]. The pathways of AP biological action involve, along with biochemical reactions, noncovalent intermolecular interactions, the latter being of interest to molecular biophysics. Due to these biologically significant intermolecular interactions AP is considered and studied as a promising agent in drug delivery area. Amphiphilic nature and presence of the hydrophobic tail in the structure of AP as a surfactant [4] favour its incorporation into phospholipid membranes [5]. This property of AP molecules is exploited in tailoring of liposomes for drug delivery [6-8], which can be used as vehicles for the “fat insoluble” drug molecules transfer through membrane structures [9, 10]. A group of AP-based and AP-containing vesicles and liposomes termed as “aspasomes” [11, 12] was designed as nanocarriers for dermal and transdermal drugs transfer [13-15]. While an important application of liposomes is delivery of anticancer drugs [16, 17], it was shown that AP itself can exhibit antitumour activity [18, 19]. At the same time, it was reported that AP can protect DNA from X-ray induced damage [20]. Thus, in accordance with the PubChem database [1] AP is classified as an antioxidant, antineoplastic, and antimutagenic agent. A noticeable share of AP applications is associated with cosmetics and dermatology [21], basing on its antioxidant, anti-aging and whitening effects. Promising developments are related to inclusion of AP into various medicinal forms, such as hydrogels [22] or electrospun nanofibers [23]. Taking into account the described above wide spectrum of AP biological activity and biomedical applications, the relevance of AP intermolecular interactions examining is beyond doubt.

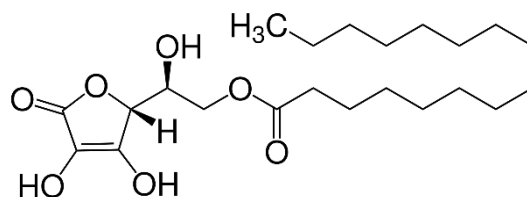
A method of choice for biophysical studies of noncovalent interactions at molecular and supramolecular levels is soft ionization mass spectrometry [24–27]. It permits evaluation not only of pair interactions, but modeling of supramolecular assemblies, such as aggregates of surfactants, micelles [28–32], and fragments of phospholipid membranes [33]. Browsing of the relevant literature has shown that the mass spectrometric data on AP are limited and relate mainly to its identification under synthesis [34]; the data reported for standard electron ionization technique [35] are not informative for biophysics.

Thus, the aim of the present work was to establish mass spectrometric characteristics of AP under Electrospray Ionization (ESI), Laser Desorption/Ionization (LDI) and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) [36] conditions and to investigate intermolecular interactions of AP related to its functioning as a biologically active compound for the drug delivery applications. Combination of several mass spectrometric techniques provides evaluation of different aspects of AP properties, since ESI technique involves spaying of liquid solutions of biomolecules, while LDI and MALDI ones are based on sputtering of the analytes from the solid state. It was expected that the current study provides information about the different mass spectrometry techniques’ applicability to the following study of AP intermolecular interactions as a drug delivery assisting agent, including interactions of AP molecules with phospholipid components of biological membranes.

MATERIALS AND METHODS

Materials

In our experiments we used ascorbyl palmitate (AP), other names 6-O-palmitoylascorbic acid, ascorbic acid-6-O-palmitate, vitamin C-palmitate [1], whose chemical structure is presented in Scheme 1. Molecular formula of AP is $C_{22}H_{38}O_7$, molecular mass $M_r=414.5$ g/mol, monoisotopic mass is 414.3 Da.



Scheme 1. Structural formula of ascorbyl palmitate (C₂₂H₃₈O₇).

AP was purchased from “Soap4Life” company (Ukraine). Dipalmitoylphosphatidylcholine and solvent methanol were provided by “Sigma-Aldrich” international company. Chemicals for MALDI matrices preparation — α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) ($M_r = 189.9$) and 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (THAP) ($M_r = 168.2$) - were purchased from Fluka and Sigma companies, respectively.

Electrospray ionization mass spectrometry

ESI mass spectra of the model systems under study were obtained in the positive and negative ion modes using a triple quadrupole (QqQ) Micromass Quattro Micro mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with the electrospray ion source. This source was operated in the standard ESI mode. The ESI source temperature was set to 120°C and the desolvation temperature was 200°C. The spraying capillary was operated at 3.5 kV. The cone voltage value of 10 V was applied. The analyzed solutions were injected into the mass spectrometer at a constant flow rate of 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The spectra were recorded in the mass range of 100–2000 Da. Data acquisition and processing were performed using MassLynx 4.1 software (Waters, Manchester, UK).

AP samples and a model binary system containing AP and DPPC (with 1:1 molar ratio) were prepared as 5mM stock solutions in polar solvent methanol. For spraying procedure in the ESI experiments the primary AP and AP:DPPC solutions to be examined were diluted to the final concentrations of 250 μM .

Note that methanol as the most appropriate solvent is recommended for standard ESI probing of biomolecules and biologically active compounds, according to a number of authoritative studies [24, 25, 29, 36, 37].

As to noncovalent intermolecular complexes of bioactive molecules, the correspondence of the composition of the complexes transferred to the gas phase under ESI conditions with those formed in liquid solutions was addressed in the targeted investigations [29, 37].

LDI and MALDI mass spectrometry

LDI/MALDI mass spectra were recorded in positive- and negative-ion extraction modes, using an Autoflex II mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) equipped with a nitrogen laser (337 nm).

The samples were ionized in the pulse mode: pulse length 3 ns, frequency 20 Hz. Spectra were recorded in the linear mode using a delayed extraction of 10 ns and an accelerating voltage of 20 keV. The resulting mass spectra were the sum of 20 individual spectra obtained as a result of irradiation with 25 laser pulses in each separate point on the target with the deposited sample. The mass spectra acquired were analyzed using the FlexAnalysis 2.2 software (Bruker Daltonics, Germany).

The sample preparation was as follows. For the matrix-free LDI mode 1 μL of the AP solution in methanol was pipetted on the steel target and dried. In the MALDI mode, this step was preceded by pipetting 1 μL of the matrix solution. For matrix preparation, saturated

solution of either HCCA in acetonitrile-water-trifluoroacetic acid in ratio (70:30:0.1) or THAP in acetone was used.

Photographic images of the samples inside the analyzing system of the mass spectrometer were obtained using the inbuilt video CCD camera and the FlexControl 2.2 software (Bruker Daltonics, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Electrospray mass spectrometry probing of ascorbyl palmitate solution

Since ESI mass spectra of AP were not properly described in the literature by now, at the initial stage of our experimental study the solution of AP in methanol was investigated by ESI. The positive ions mode of ESI experiments was applied first.

The ESI mass spectrum of AP solution in methanol probed just after preparation is presented in Fig. 1. In the spectrum the characteristic molecular and cluster ions of AP in the protonated and cationized forms can be noted: $\text{AP}\cdot\text{H}^+$ (m/z 415.3, relative abundance (RA) 100%), $\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 437.3, RA 50%), $2\text{AP}\cdot\text{H}^+$ (m/z 829.5, RA 53%), $2\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 851.5, RA 23%), $3\text{AP}\cdot\text{H}^+$ (m/z 1243.8, RA 6%), $3\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 1265.8, RA %10), $4\text{AP}\cdot\text{H}^+$ (m/z 1658.1, RA 3%), $4\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 1680.1, RA 7%). Other peaks in the mass spectrum (such as peaks with m/z 316.3 and m/z 1067), can be considered as peaks of the AP preparation side products. The most abundant peaks in the spectrum are signals of protonated AP molecule (RA=100%) and protonated AP dimer (RA=53%). The peaks related to Na^+ cationized molecule of AP and its cationized dimer are about two times less intensive in comparison with the corresponding protonated peaks (see Fig. 1). It should be noted that cationization as a way of ion formation is characteristic of the electrospray method of ionization [36] and sodium cations for such ions formation could originate from the trace sodium chloride admixture of solvent or can be solubilized from glassware used. Revealed high intensity of the protonation and cationization processes of AP molecules in the polar solvent is obviously conditioned on the peculiarities of AP molecule structure (see Scheme 1). In particular, the presence of proton-accepting oxygen atoms of carbonyl or hydroxyl groups in the molecular structure provides the centers of protons and sodium cations attachment to the AP molecule.

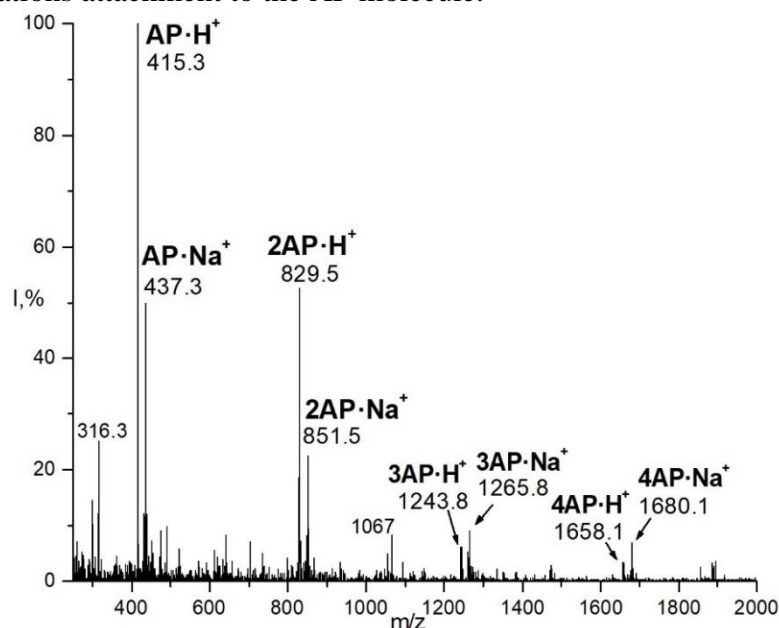


Fig. 1. Positive ion ESI mass spectrum of freshly prepared AP solution in methanol. The m/z value of the first monoisotopic peak is indicated for each group of peaks.

One of the most important results, from the biophysical point of view, is recording the abundant AP clusters of $n\text{AP}\cdot\text{H}^+$ and $n\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ type ($n=2-4$) in the ESI mass spectrum. This result testifies to the formation of stable noncovalent complexes of the AP molecules in the polar media and confirms the AP prospective in regard to formation of liposomes for different biomedical applications including drugs delivery. From the spectrum analysis it can be also seen that the RA of cationized peaks of AP trimer and tetramer are higher than RA of the appropriate protonated peaks. This fact can point to the higher stability of the big AP clusters stabilized by the sodium cation in comparison with the similar protonated clusters $n\text{AP}\cdot\text{H}^+$ ($n=3, 4$).

Following the purpose of selecting the optimal experimental conditions for the AP intermolecular interactions study by mass spectrometry we also probed the AP solution in methanol after 10 minutes (and more time) keeping at room temperature. Such time delay can be a necessary step in the forthcoming studies of intermolecular interactions of AP with other drug molecules or in the technological processes of formation of AP liposomes carrying the drug molecules for drug delivery purposes. The ESI mass spectrum of AP solution recorded 10 minutes after its preparation is shown in Fig. 2. As we can see in Fig. 2, for the aged solution we have a clearer spectrum (better signal to noise ratio) with less intensive peaks related to the AP preparation admixtures. The following characteristic ions of AP are recorded in the spectrum: $\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 437.3, RA 100%), $2\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 851.5, RA 52%), $3\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 1265.8, RA %14), $4\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 1680.1, RA 6%). It is interesting that the protonated species of AP are not registered after the solution time keeping, that can be explained by the ion-molecular processes going in time, which results in more active replacement of protons by Na^+ ions near the partially negatively charged atoms of AP molecule in the solution studied. The spectrum analysis also demonstrates that the AP solution keeping in time can be even useful for the AP clusters registering in the ESI measurements, since the RA for peaks of AP trimers and tetramers (Fig. 2) is even a little bit higher in comparison with that for the spectrum of freshly prepared AP solution (Fig. 1). The longer time keeping did not effect significantly on the ESI mass spectrum characteristics.

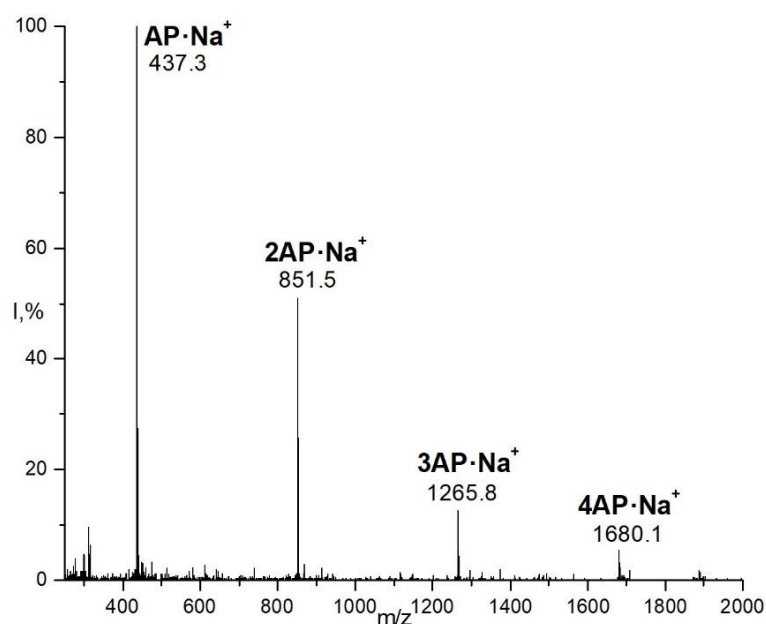


Fig. 2. Positive ion ESI mass spectrum of AP in methanol, recorded after 10 minutes of the sample keeping at room temperature. The m/z value of the first monoisotopic peak is indicated for each peaks group.

So, based on the measurements described above, we can summarize that ESI mass spectrometry in positive ion mode is effective for the revealing of the AP noncovalent complexes formation processes in polar solutions. Moreover, the solution time keeping does not affect the ability to register the ions of big AP clusters in the spectrum, that testifies to the high AP clusters' stability during the solution aging.

The next step of the current ESI mass spectrometry study was related to the AP solution probing in ESI negative ion mode. The obtained spectrum is presented in Fig. 3. The spectrum analysis shows that it can be characterized by the presence of abundant molecular and quasimolecular ions of AP, that is similar to the spectrum recorded in the positive ion mode, but these ions have different composition: $[\text{AP-H}]^-$ (m/z 413.3, RA 78%), $\text{AP}\cdot\text{Cl}^-$ (m/z 449.3, RA 46%), $[\text{2AP-H}]^-$ (m/z 827.5, RA 100%). The spectrum in negative ion mode is more clear and free from the peaks of admixtures. Interestingly, the peak of AP dimer is prevailed in the negative ion mass spectrum, but the peaks of bigger AP clusters such as trimers and tetramers are not recorded. At the same time, the peak of complex of the AP molecule with Cl^- anion can be noted in the spectrum that proves the possibility of AP complexation not just with positive but also with negative ions from solvate surrounding.

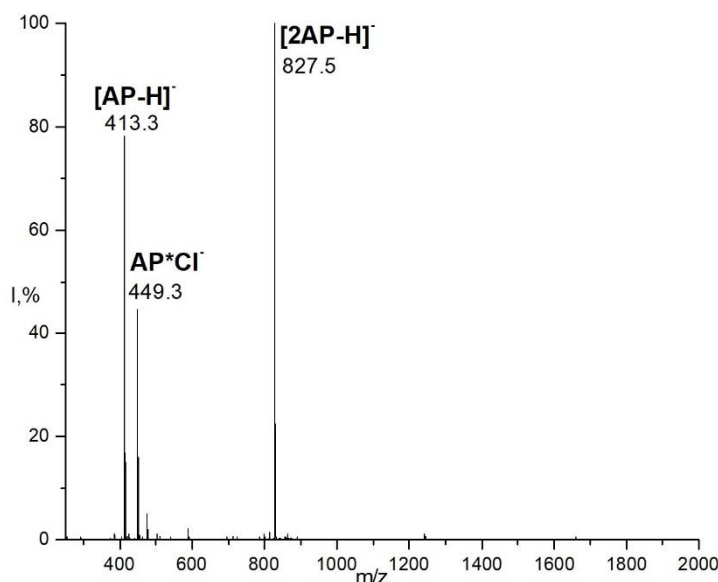


Fig. 3. Negative ion ESI mass spectrum of AP in methanol. The m/z value of the first monoisotopic peak is indicated for each peaks group.

Analysis of the ESI spectrum of AP solution in negative ion mode (Fig. 3) confirms the usefulness of this mode for recording the AP molecules ions and their dimers, while the ESI positive ion mode technique demonstrates the higher effectiveness in registering the bigger AP molecular clusters (such as trimers and tetramers), see Fig. 1 and Fig. 2. So, ESI positive ion mode can be more effective in the study of AP as an agent for liposomes formation for drug delivery purposes.

LDI mass spectrometric study of ascorbyl palmitate

The next stage of our systematic mass spectrometry characterization of AP and its intermolecular interactions was devoted to the examination of AP by LDI mass spectrometry method. As described in the Materials and Methods section of the paper, a drop of AP solution in methanol was deposited on the steel target substrate and dried on air. The photo of the crystallized sample on the steel substrate is presented in Fig. 4. The target was placed in the mass spectrometer and the sample spotted was subjected to the LDI in positive and negative

ion registration modes. It is noticeable that AP was producing abundant peaks in the mass spectra under matrix-free LDI conditions.

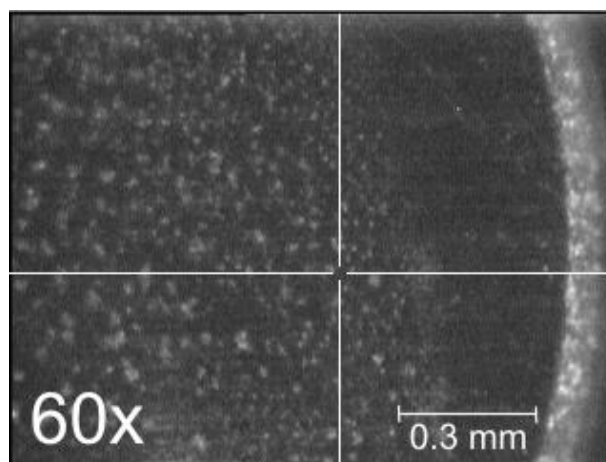


Fig. 4. The photo of AP crystallized from methanol solution deposited onto the steel target for LDI studies.

LDI mass spectrum of AP solution in methanol in positive ion mode is shown in Fig. 5a. As we can see in the figure, the mass spectrum can be characterized by good signal to noise ratio and the most abundant peaks in the spectrum are those of cationized AP molecule: $\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 437.3, RA 100%) and $\text{AP}\cdot\text{K}^+$ (m/z 453.3, RA 72%). In this mass spectrum along with the AP ion cationized by sodium cation we recorded the AP molecular ion cationized by potassium cation (which we did not note in the ESI mass spectra). It can be explained by the presence of traced amounts of potassium salts on the surface of steel metal substrate. The most significant result obtained is that in the contrast to situation in the ESI mass spectra (see Fig. 1 and Fig. 2) in the LDI mass spectrum of AP there are no peaks of cationized AP dimers ($2\text{AP}\cdot\text{Na}^+$, m/z 851.5) and no peaks of other noncovalent AP complexes ($3\text{AP}\cdot\text{Na}^+$, m/z 1265.8; $4\text{AP}\cdot\text{Na}^+$, m/z 1680.1). Such a fact indicates that the LDI conditions of ionization are less "soft" in comparison with the ESI conditions. Desorption/ionization of the crystallized AP sample by laser beam irradiation does not provide survival of the noncovalent clusters of AP like those we can observe in the ESI mass spectrometry experiment.

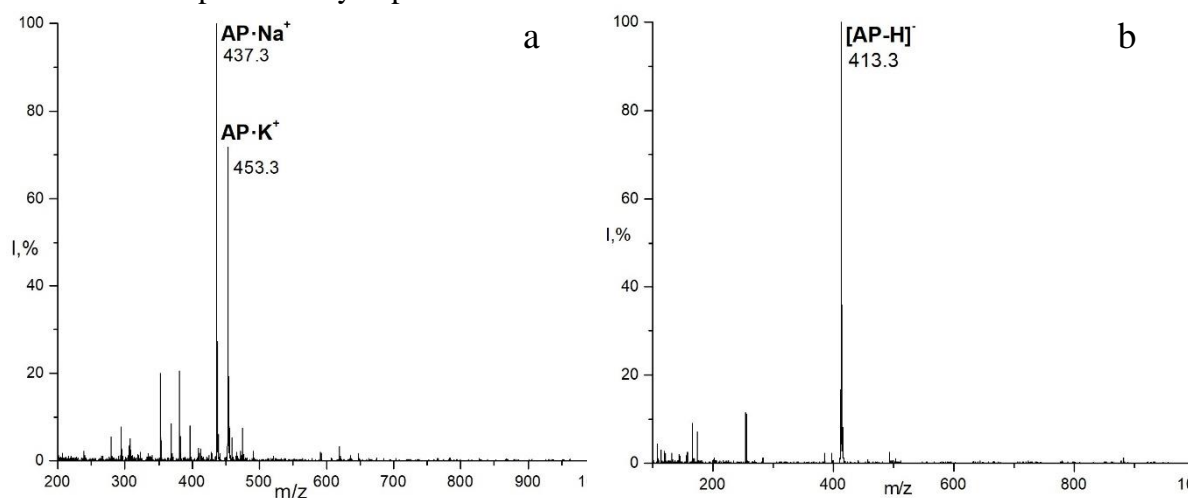


Fig. 5. LDI mass spectra of AP deposited from solution in methanol: a) positive ion mode; b) negative ion mode.

The AP sample was also probed by the LDI method in the negative ion mode; the appropriate mass spectrum is presented in Fig. 5b. Expectedly, in the mass spectrum we can find the peak of deprotonated AP molecule — $[\text{AP} - \text{H}]^-$ (m/z 413.3, RA 100%) similarly to the ESI mass spectrum in negative ion mode. However, in contrast to the case with ESI mass spectrum, we did not record any signals of AP intermolecular complexes, such as $\text{AP}\cdot\text{Cl}^-$ or $[\text{2AP} - \text{H}]^-$.

Based on the LDI mass spectral data obtained and comparison of the results of AP probing by ESI and LDI mass spectrometry we can conclude that ESI conditions (in positive as well as in negative ion modes) are softer and more suitable for the studies on the AP noncovalent complexation in the solution.

MALDI mass spectrometric study of ascorbyl palmitate

Based on the classical mass spectrometry knowledge [36] that in matrix-assisted LDI mass spectrometry experiments (MALDI) the matrix usually provides softer conditions for the samples ionization [38], at the next stage of our systematic study we examined the AP by MALDI mass spectrometry. Firstly, we used HCCA matrix and prepared the samples as described in the methodical section of the paper. Photo of the crystals formed after drying of methanol AP solution and HCCA matrix solution deposited onto the steel target is presented in the insert in Fig. 6. Comparison of the photos in Fig. 4 (dried AP solution in methanol without matrix) and in Fig. 6 (dried AP solution in methanol + HCCA matrix) shows that the matrix addition to the system results in the formation of larger crystals (probably due to AP-HCCA co-crystallization). Moreover, the amount of the crystals increased significantly, that obviously related to the presence of HCCA matrix in the system.

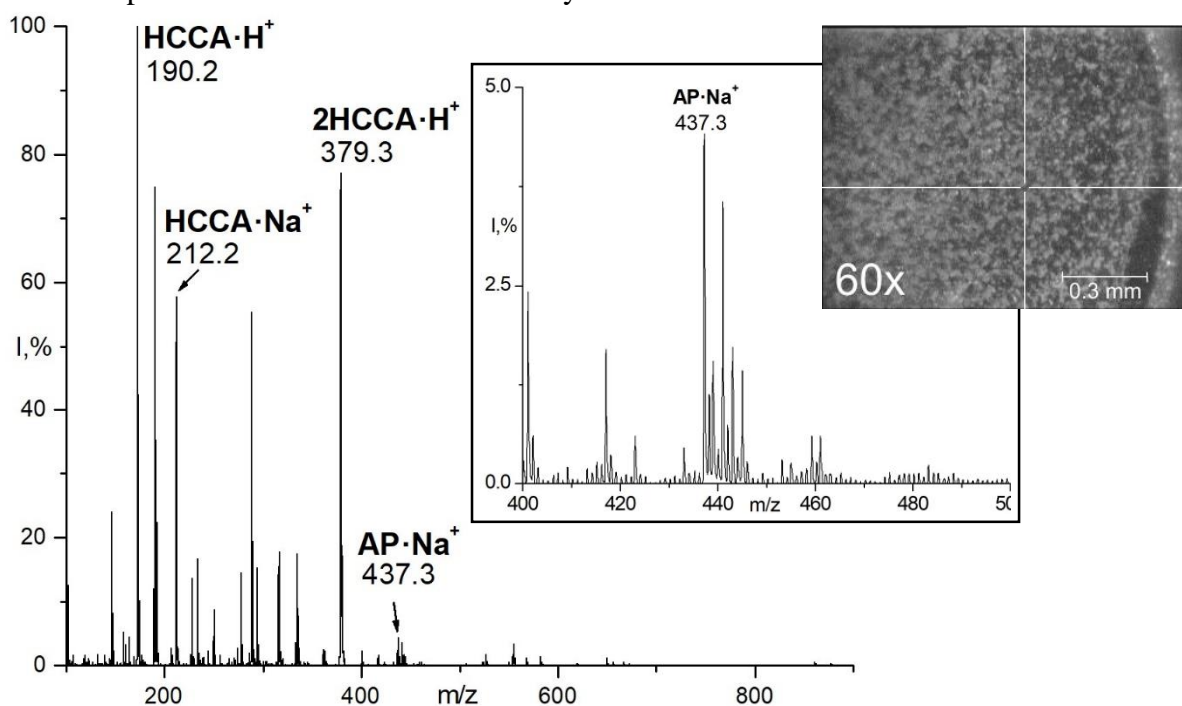


Fig. 6. Positive ion MALDI mass spectrum of AP with HCCA matrix.

Insert: Photo of the dried (crystallized) mixture of AP solution in methanol and HCCA matrix deposited onto the steel target.

In the spectrum of AP solution in HCCA matrix obtained in the positive ion mode (Fig. 6) the domination of the peaks of matrix can be noted. The most abundant peaks in the spectrum

can be attributed to the matrix: $\text{HCCA}\cdot\text{H}^+$ (m/z 190.2, RA 100%), $\text{HCCA}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 212.2, RA 57%), $2\text{HCCA}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 379.3, RA 76 %). At the same time, the nonabundant peak of cationized AP molecule $\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 437.3, RA 4%) is also recorded in the spectrum (Fig. 6). The peaks of any intermolecular complexes of AP are not registered.

At the last stage of the MALDI experiment we decided to try another conventional MALDI matrix to probe AP solution. THAP matrix solution in acetone was chosen as less "aggressive" matrix in comparison to highly acidic solution of HCCA in water-acetonitrile-TFA, although higher laser power was necessary to be applied to generate MALDI mass spectra with acceptable analyte signal-to-noise ratio. Photo of dried AP sample in THAP matrix is shown in the insert of Fig. 7. This photo demonstrates relatively large light crystals formed (compare with the samples photos in Fig. 4 and insert of Fig. 6) that is related to the presence of THAP matrix in the sample.

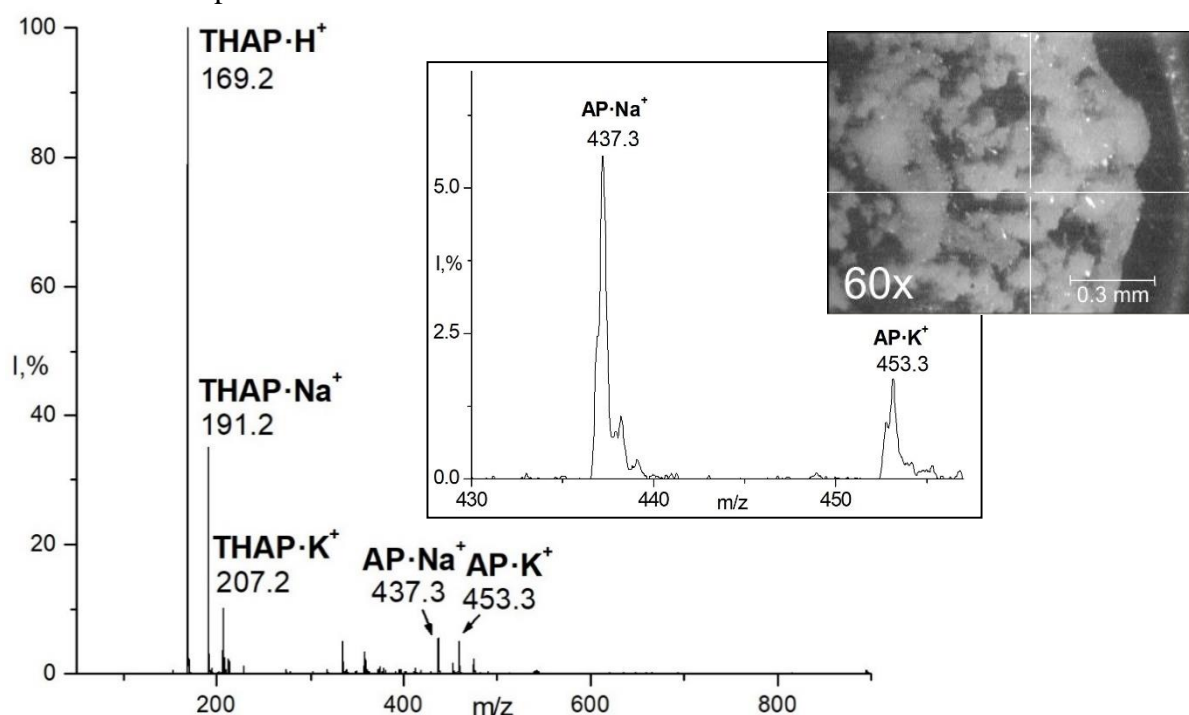


Fig. 7. Positive ion MALDI mass spectrum of AP with THAP matrix.

Insert: Photo of the dried (crystallized) mixture of AP solution in methanol and THAP matrix deposited onto the steel target.

In the MALDI mass spectrum of the studied system in the positive ion mode (Fig. 7) we can see the peaks of THAP matrix domination similar to the situation with the experiment using HCCA matrix. We can note the following peaks in the spectrum: $\text{THAP}\cdot\text{H}^+$ (m/z 169.15, RA 100%), $\text{THAP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 191.15, RA 36%), $\text{THAP}\cdot\text{K}^+$ (m/z 207.15, RA 10%), $\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 437.5, RA 5%), $\text{AP}\cdot\text{K}^+$ (m/z 453.5, RA 3%). As we can see, the abundance of the molecular ions of AP is also relatively low in the spectrum with THAP matrix similar to the experimental results with HCCA matrix (Fig. 6), no peaks of AP noncovalent complexes being recorded, as well.

Taking into account the THAP matrix's good applicability to the MALDI measurements in negative ion mode, we also examined the AP with THAP matrix in this mode. The spectrum obtained is presented in Fig. 8. It is characterized by the presence of signals of ions of the matrix as well as AP molecular ions: $[\text{THAP} - \text{H}]^-$ (m/z 167.15, RA 100%), $[2\text{THAP} - \text{H}]^-$ (m/z 335.15, RA 24%), $[\text{AP} - \text{H}]^-$ (m/z 423.15, RA 10%). In contrast to the spectrum of AP with the same matrix in the positive ion mode, in the current spectrum we can note the peak of the dimer

$[2\text{THAP} - \text{H}]^-$ (m/z 335.15), however it is a dimer of just matrix molecules, and again we did not record any peaks of noncovalent complexes of AP molecules.

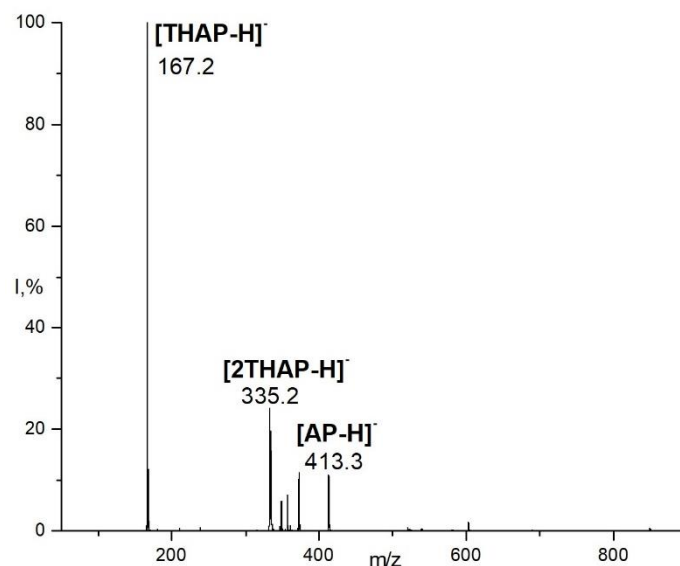


Fig. 8. Negative ion MALDI mass spectrum of AP with THAP matrix.

Electrospray study of ascorbyl palmitate – dipalmitoylphosphatidylcholine system

To check a possibility of interaction of AP with biomolecules including phospholipid components of biomembranes and liposomes, a binary system composed of AP and DPPC (1:1 molar ratio) was tested by ESI technique optimized in AP solutions measurements described above. Mass spectrum of the system presented in Fig. 9 contains sets of peaks characteristic of AP, which were attributed in Fig. 1 and Fig. 2 above: $n\text{AP}\cdot\text{H}^+$ ($n = 1, 2$), $n\text{AP}\cdot\text{Na}^+$ ($n = 1-4$), and the peak of DPPC in the protonated form $\text{DPPC}\cdot\text{H}^+$ (m/z 734.6). The main object of search which fits the available mass range is the cluster of AP with DPPC in the protonated form: $\text{AP}\cdot\text{DPPC}\cdot\text{H}^+$ (m/z 1148.9) (Fig. 9).

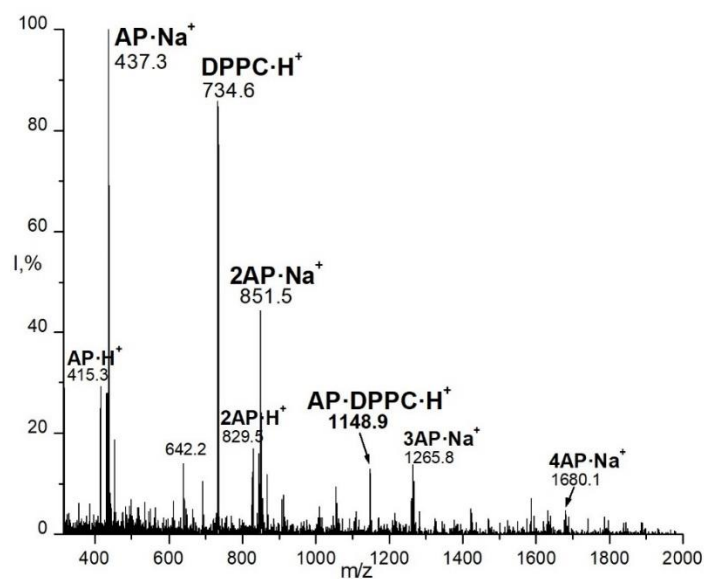


Fig. 9. Positive ion ESI mass spectrum of (AP + DPPC) binary system in methanol.

Registering of this associate proves intermolecular interactions of AP with DPPC which is a component of natural biological membranes and artificial liposomes. Formation of such stable noncovalent complexes of AP with DPPC in the conditions of the polar solvent models similar possible noncovalent interactions of the AP molecules with the phospholipids of biomembranes and liposomes when AP is functioning as a drug delivery assisting agent.

CONCLUSIONS

The current mass spectrometry study of AP solutions demonstrated the applicability of soft ionization mass spectrometry method in the research of AP noncovalent complexes formation as well as in the AP identification in different forms including solutions and crystal phase samples. While the both used soft ionization techniques — ESI and MALDI — were useful in determination of AP presence in the samples studied, the ESI mass spectrometry examining of AP solutions in polar solvent confirmed the ESI technique effectiveness in the revealing of the AP molecules clusterization and noncovalent complexes formation in the polar surrounding. ESI study of model system contained AP and DPPC confirmed the formation of stable noncovalent complexes between AP molecules and molecules of the membrane phospholipid that models the intermolecular interactions of AP as an agent assisting in drug transmembrane delivery. Based on the current study results we can recommend the ESI mass spectrometry technique to be used in AP nanosomes formation examination. Moreover, the ESI mass spectrometry might be useful in the following studies of AP intermolecular interactions with the molecules of medications and biomolecules when the AP is used as an agent enhancing the drug molecules transmembrane transfer.

ACKNOWLEDGEMENTS

LDI/MALDI mass spectrometric studies have been carried out using the equipment of the Center for collective use of scientific instruments / equipment "Mass spectrometric complex with laser desorption/ionization MALDI-TOF Autoflex II LRF20" of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Authors also acknowledge the Program of cooperation between Ukrainian and Hungarian Academies of Sciences for the financial support of the visits of the scientists from B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine to the Research Centre for Natural Sciences of the Hungarian Academy of Sciences, where electrospray mass spectrometry experiments were carried out.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

V. A. Pashynska  <https://orcid.org/0000-0001-9786-6828>

M. V. Kosevich  <http://orcid.org/0000-0003-0257-4588>

P. O. Kuzema  <https://orcid.org/0000-0003-4028-4784>

A. Gomory  <http://orcid.org/0000-0001-5216-0135>

L. Drahos  <http://orcid.org/0000-0001-9589-6652>

REFERENCES

1. Ascorbyl palmitate [Internet]. [cited 2022 Dec 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54680660>
2. Karmee SK. Biocatalytic synthesis of ascorbyl esters and their biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;**81**(6):1013–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1781-y>
3. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Antioxidative and anti-inflammatory activity of ascorbic acid. *Antioxidants.* 2022;**11**(10):1993. <https://doi.org/10.3390/antiox11101993>

4. Benedini L, Fanani ML, Maggio B, Wilke N, Messina P, Palma S, Schulz P. Surface phase behavior and domain topography of ascorbyl palmitate monolayers. *Langmuir*. 2011;**27**(17):10914–19. <https://doi.org/10.1021/la201847j>
5. Mottola M, Wilke N, Benedini L, Oliveira RG, Fanani ML. Ascorbyl palmitate interaction with phospholipid monolayers: electrostatic and rheological preponderancy. *Biochim Biophys Acta*. 2013;**1828**(11):2496–505. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.016>
6. Junhua Li, Cuihua Chang, Jiali Zhai, Yanjun Yang, Haitao Yu. Ascorbyl palmitate effects on the stability of curcumin-loaded soybean phosphatidylcholine liposomes. *Food Bioscience*. 2021;**41**(8):100923. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100923>
7. Giudice F, Ambroggio EE, Mottola M, Fanani ML. The amphiphilic alkyl ester derivatives of l-ascorbic acid induce reorganization of phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 2016;**1858**(9):2132–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.015>
8. Chen M, Li R, Lu X, Dai Y, Chen T, Xing Y, Xue L, Duan Z, Zhou W, Li J. Fabrication and characterization of l-ascorbyl palmitate and phospholipid-based hybrid liposomes and their impacts on the stability of loaded hydrophobic polyphenols. *Food Chem*. 2023;**398**:133953. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133953>
9. Nocelli NE, Zulueta Díaz YLM, Millot M, Colazo ML, Vico RV, Fanani ML. Self-assembled nanostructures of L-ascorbic acid alkyl esters support monomeric amphotericin B. *Heliyon*. 2021;**7**(1):e06056. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06056>
10. Moribe K, Maruyama S, Inoue Y, Suzuki T, Fukami T, Tomono K, Higashi K, Tozuka Y, Yamamoto K. Ascorbyl dipalmitate/PEG-lipid nanoparticles as a novel carrier for hydrophobic drugs. *Int J Pharm*. 2010;**387**(1-2):236–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.12.007>
11. Gopinath D, Ravi D, Rao BR, Apte SS, Renuka D, Rambhau D. Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and applications. *Int J Pharm*. 2004;**271**(1-2):95–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.032>
12. Han S. Structure of ascorbyl palmitate bilayers (aspasomes) from molecular dynamics simulation. *Bull Korean Chem Soc*. 2018;**39**(7): 887–90. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11475>
13. Ghosh S, Mukherjee B, Chaudhuri S, Roy T, Mukherjee A, Sengupta S. Methotrexate aspasomes against rheumatoid arthritis: optimized hydrogel loaded liposomal formulation with in vivo evaluation in wistar rats. *AAPS PharmSciTech*. 2018;**19**(3):1320–36. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0939-2>
14. Aboul-Einien MH, Kandil SM, Abdou EM, Diab HM, Zaki MSE. Ascorbic acid derivative-loaded modified aspasomes: formulation, *in vitro*, *ex vivo* and clinical evaluation for melasma treatment. *J Liposome Res*. 2020;**30**(1):54–67. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1585448>
15. d'Avanzo N, Cristiano MC, Di Marzio L, Bruno MC, Paolino D, Celia C, Fresta M. Multidrug idebenone/naproxen co-loaded aspasomes for significant in vivo anti-inflammatory activity. *ChemMedChem*. 2022;**17**(9):e202200067. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200067>
16. Lamie C, Elmowafy E, Attia DA, Elmazar MM, Mortada ND. Diversifying the skin cancer-fighting worthwhile frontiers: How relevant are the itraconazole/ascorbyl palmitate nanovectors? *Nanomedicine*. 2022;**43**:102561. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102561>
17. Li L, Wang H, Ye J, Chen Y, Wang R, Jin D, Liu Y. Mechanism study on nanoparticle negative surface charge modification by ascorbyl palmitate and its improvement of tumor targeting ability. *Molecules*. 2022;**27**(14):4408. <https://doi.org/10.3390/molecules27144408>
18. Chen H, Yang X, Sun P, Zhi Y, Yao Q, Liu B. L-ascorbyl 6-palmitate as lead compound targeting SphK1: an in silico and in vitro investigation. *J Chem Res*. 2021;**45**(7–8):781–7. <https://doi.org/10.1177/17475198211001819>
19. Ledinski M, Marić I, Peharec Štefanić P, Ladan I, Caput Mihalić K, Jurkin T, Gotić M, Urlić I. Synthesis and in vitro characterization of ascorbyl palmitate-loaded solid lipid nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2022 Apr 26;**14**(9):1751. <https://doi.org/10.3390/polym14091751>
20. Xiao L, Tsutsui T, Miwa N. The lipophilic vitamin C derivative, 6-o-palmitoylascorbate, protects human lymphocytes, preferentially over ascorbate, against X-ray-induced DNA damage, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *Mol Cell Biochem*. 2014;**394**(1–2):247–59. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2101-8>
21. Elmore AR. Final report of the safety assessment of L-Ascorbic Acid, Calcium Ascorbate, Magnesium Ascorbate, Magnesium Ascorbyl Phosphate, Sodium Ascorbate, and Sodium Ascorbyl Phosphate as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2005;**24**(Suppl 2):51–111. <https://doi.org/10.1080/10915810590953851>
22. Zhai J, Mantaj J, Vllasaliu D. Ascorbyl palmitate hydrogel for local, intestinal delivery of macromolecules. *Pharmaceutics*. 2018;**10**(4):188. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040188>
23. Paneva D, Manolova N, Argirova M, Rashkov I. Antibacterial electrospun poly(ϵ -caprolactone)/ascorbyl palmitate nanofibrous materials. *Int J Pharm*. 2011;**416**(1):346–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.06.032>

24. Loo JA. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying non-covalent macromolecular complexes. *Int J Mass Spectrom.* 2000;200 (1–3):175–86. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(00\)00298-0](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(00)00298-0)
25. Wytenbach Th, Bowers MT. Intermolecular interactions in biomolecular systems examined by mass spectrometry. *Annl Rev Phys Chem.* 2007;58:511–33. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104515>
26. Hilton GR, Benesch JLP. Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry. *J R Soc Interface.* 2012;9(70):801–16. <http://doi.org/10.1098/rsif.2011.0823>
27. van der Spoel D., Marklund EG., Larsson DSD, Caleman C. Proteins, lipids, and water in the gas phase. *Macromol Biosci.* 2011;11:50–5. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000291>
28. Ceraulo L, Giorgi G, Turco Liveri V, Bongiorno D, Indelicato S, Di Gaudio F, Indelicato S. Mass spectrometry of surfactant aggregates. *Eur J Mass Spectrom.* 2011;17(6):525–41. <https://doi.org/10.1255/ejms.11>
29. Bongiorno D, Ceraulo L, Giorgi G, Indelicato S, Turco Liveri V. Do electrospray mass spectra of surfactants mirror their aggregation state in solution? *J Mass Spectrom.* 2011;46(12): 1263–8. <https://doi.org/10.1002/jms.2013>
30. Sharon M, Ilag LL, Robinson CV. Evidence for micellar structure in the gas phase. *J Am Chem Soc.* 2007;129(28):8740–6. <https://doi.org/10.1021/ja067820h>
31. Nohara D, Kajiura T, Takeda K. Determination of micelle mass by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2005;40(4):489–93. <https://doi.org/10.1002/jms.818>
32. Pascale R, Acquavia MA, Onzo A, Cataldi TRI, Calvano CD, Bianco, G. Analysis of surfactants by mass spectrometry: Coming to grips with their diversity. *Mass Spectrom Rev.* 2021; 1–32. <https://doi.org/10.1002/mas.21735>
33. Pashynska VA, Kosevich MV, Van den Heuvel H, Cuyckens F, Claeys M. Study of non-covalent complexes formation between the bisquaternary ammonium antimicrobial agent decamethoxinum and membrane phospholipids by electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. *Biophys Bull.* 2004;1-2(14):123–30.
34. Yadav MG, Kavadia MR, Vadgama RN, Odaneth AA, Lali AM. Production of 6-O-l-ascorbyl palmitate by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Appl Biochem Biotechnol.* 2018;184(2):1168–86. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2610-5>
35. L-Ascorbyl palmitate. *Mass Spectrometry* [Internet]. [cited 2022 Dec 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-O-Palmitoylascorbic-acid#section=Mass-Spectrometry&fullscreen=true>
36. Cole R, editor. *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications.* 2nd edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. 1008 p.
37. Guevremont R, Siu KWM., Le Blanc JCY, Berman SS. Are the electrospray mass spectra of proteins related to their aqueous solution chemistry? *J Am Soc Mass Spectrom. Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 1992;3(3):216–24. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(92\)87005-J](https://doi.org/10.1016/1044-0305(92)87005-J)
38. Leopold J, Prabutzki P, Engel KM, Schiller J. A five-year update on matrix compounds for MALDI-MS analysis of lipids. *Biomolecules.* 2023;13(3):546. <https://doi.org/10.3390/biom13030546>

МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АСКОРЫЛПАЛЬМІТАТУ ЯК АГЕНТУ, ЩО ЗДАТНИЙ ФОРМУВАТИ НАНОСОМИ

В. А. Паши́нська¹, М. В. Косевич¹, П. О. Кузема², А. Гоморі³, Л. Драхо́с³

¹ Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна Національної академії наук України, пр. Науки, 47, Харків, 61103, Україна;

² Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка Національної академії наук України, вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна;

³ Інститут органічної хімії Наукового центру природничих наук, Мадьяр тудосок корутья 2, Будапешт, Н-1117, Угорщина

Надійшла до редакції 22 травня 2023 р. Переглянута 24 червня 2023 р.

Прийнята до друку 26 червня 2023 р.

Актуальність. Вивчення властивостей і міжмолекулярних взаємодій біологічно активних речовин, які можуть бути використані для поліпшення трансмембранного транспорту лікарських сполук, є одним із актуальних завдань сучасної молекулярної біофізики. Аскорбылпальмітат (АП), як жиророзчинна форма вітаміну С, нещодавно привернув увагу дослідників як агент, перспективний для створення наносом, що здатні сприяти переміщенню через клітинну мембрану молекул «нерозчинних у жирах» лікарських сполук. Однак, АП та його супрамолекулярні комплекси досі не були охарактеризовані сучасними м'якоіонізаційними методами мас-спектрометрії.

Мета роботи. Мета даної роботи — охарактеризувати АП та його міжмолекулярні взаємодії за допомогою низки мас-спектрометричних методів: з іонізацією електророзпиленням (ІЕР), лазерною десорбцією/іонізацією (ЛДІ) та матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією (МАЛДІ). Заплановано порівняння застосовності зазначених методик для вивчення міжмолекулярних взаємодій АП як агента, що сприяє доставці ліків.

Матеріали і методи. Спектри ІЕР одержано за допомогою квадрупольного мас-спектрометра Micromass Quattro. Експерименти ЛДІ та МАЛДІ виконувались за допомогою мас-спектрометра Autoflex II.

Результати. ІЕР експерименти в режимі позитивних іонів виявили наявність у мас-спектрах піків протонованих і катіонізованих молекул АП, а також кластерів АП типу $n\text{АП}\cdot\text{H}^+$ і $n\text{АП}\cdot\text{Na}^+$ ($n=2\div 4$). Цей результат свідчить про утворення стабільних нековалентних комплексів молекул АП у полярних середовищах і підтверджує здатність АП формувати наноструктури для доставки ліків. Аналіз ЛДІ та МАЛДІ мас-спектрів АП, зареєстрованих у режимах позитивних та негативних іонів, показав, що за присутності сигналів від молекулярних іонів АП, піки димерів чи більших кластерів АП відсутні. Вивчення методом ІЕР модельної системи, що містила АП та дипальмітоїлфосфатидилхолін (ДПФХ), виявило утворення в розчині стабільного комплексу $\text{АП}\cdot\text{ДПФХ}\cdot\text{H}^+$, який моделює міжмолекулярні взаємодії АП з фосфоліпідними компонентами біомембран та/або ліпосом в умовах функціонування АП як агенту, який сприяє доставці ліків.

Висновки. Проведене дослідження демонструє застосовність усіх протестованих методів мас-спектрометрії для ідентифікації АП у розчинах та твердій фазі, тоді як для вивчення утворення міжмолекулярних нековалентних комплексів АП та взаємодій АП з біомолекулами найбільш ефективним методом є мас-спектрометрія з ІЕР.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: аскорбілпальмітат; наносоми для доставки ліків; дипальмітоїлфосфатидилхолін; нековалентні комплекси; мас-спектрометрія; іонізація електророзпиленням; лазерна десорбція/іонізація; матрично-активована лазерна десорбція/іонізація.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-03>

UDC 58.02:582.263:577.161.1:581.151

EFFECTS OF SALT STRESS AND COOLING REGIMES ON THE PIGMENT COMPOSITION OF *DUNALIELLA SALINA* CELLS

N. A. Chernobai , N. G. Kadnikova , K. D. Vozovyk , L. F. Rozanov ,
I. F. Kovalenko 

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
23 Pereyaslavska Str., Kharkiv, 61016, Ukraine*

e-mail: nadiiachernobai@gmail.com

Submitted May 12, 2023; Revised May 28, 2023;

Accepted June 26, 2023

Background: Microalgae are able to produce a significant amount of biologically significant substances. In connection with the growing popularity of microalgae, it is important to develop effective methods for storing cultures and creating strain banks. This will not only meet the needs of science and biotechnology for viable and sustainable crops, but will also solve the problem of biodiversity conservation.

Objectives: study the effect of salt stress and cooling regimes on the pigment composition of microalgae *Dunaliella salina* cells in order to increase their safety after freezing-thawing.

Materials and methods: The objects of the study were the unicellular green microalgae *D. salina*. Cultivation was carried out according to the standard method on nutrient media with different amounts of NaCl and trace elements. Adaptation to low temperatures was carried out by exposure of samples in the dark at temperature 4°C for 24 hours. Freezing was performed by placing 1 ml of the cell suspension in a 1.8 ml polypropylene cryogenic vial (Nunc, Sigma-Aldrich), cooled at a rate of 1 deg/min using a Mr. Frosty with following regimes: to -10°C, -40°C, -40°C followed by immersion to liquid nitrogen or direct immersion to liquid nitrogen (-196°C). Thawing was carried out in a water bath (37°C) with continuous shaking for 1–2 min. Microscopic examinations were carried out on an LSM-510 Meta laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany) upon excitation by a diode laser with a wavelength of 405 nm and 573 nm using a Nile Red stain.

Results: It has been established that the formation of intracellular lipid globules and the synthesis of carotenoids in *D. salina* cells contribute to an increase in the concentration and number of motile cells after freezing-thawing. It has been shown that during rapid cooling, adaptive mechanisms do not have time to turn on in cells, and complete destruction of carotene-containing lipid globules occurs.

Conclusions: Cryopreservation of *D. salina* cells should be carried out at a rate of 1 deg/min to -40°C, followed by immersion in liquid nitrogen and a mandatory stage of precultivation at 4°C for 24 hours. This approach allows the cells to adapt to a decrease in temperature, which contributes to the best result after freezing-thawing.

KEY WORDS: microalga; salt stress; temperature stress; *Dunaliella salina*; cryopreservation; cryoresistance.

Microalgae are important for the development of modern biotechnology, as they are able to accumulate a significant amount of biologically important compounds. One of the promising strains is the unicellular halophilic green microalgae *Dunaliella salina*. Under certain conditions, it is capable of hypersynthesis of lipids, glycerol, proline, beta-carotene

In cites: Chernobai NA, Kadnikova NG, Vozovyk KD, Rozanov LF, Kovalenko IF. Effects of salt stress and cooling regimes on the pigment composition of *Dunaliella salina* cells. Biophysical Bulletin. 2023;49:34–42. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-03>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

and stress proteins [1–7]. Accumulation usually occurs under conditions of stressful growth. Therefore, the content of valuable metabolites in the biomass of microalgae can be increased by programmed variation of their growing conditions, for example, changing the composition of the cultivation medium, increasing salinity, or decreasing temperature [8–10].

The increasing popularity of microalgae for biotechnology [11, 12] increases the relevance of finding effective ways to preserve them for a long time. The development of low-temperature storage methods aims to minimize the time and cost involved, prevent contamination, and maintain genetic stability that is compromised by conventional serial transfers.

It is known that glycerol is widely used as a cryoprotectant to increase the safety of cells after cryopreservation [13–15]. Therefore, it can be assumed that *Dunaliella salina* cells containing an increased amount of glycerol may be more resistant to low temperatures.

It was also shown [16, 17] that preliminary cold hardening of plant cells can increase the percentage of preservation after cryopreservation due to the launch of adaptive cellular mechanisms.

In a previous work, we have shown that a decrease of cultivation temperature [18], microelement deficiency in the growth medium, and preliminary hardening [19] of *Dunaliella salina* increase the content of lipid globules in cells. In this work, we investigated how temperature and salt stress together, the concentration of sodium chloride in the culture medium, and the choice of cooling mode affect the ability of cells to produce lipid globules and resistance of microalgae to low temperatures.

Therefore, the aim of the work was to study the effect of salt stress and cooling regimes on the pigment composition of *Dunaliella salina* cells in order to increase their safety after freezing-thawing.

MATERIALS AND METHODS

Microalga *D. salina* Teod. obtained from the collection of the Department of Botany and Plant Ecology, V. N. Karazin Kharkiv National University.

D. salina cultures were grown without aeration until the stationary phase of growth (21 days). Microalgae were cultivated at $25\pm 2^\circ\text{C}$ (normothermia). The accumulation of biomass was carried out in culture flasks (TPP, Switzerland) with a volume of 40 ml under round-the-clock illumination with white fluorescent light of $52.84 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ [20, 21]. *D. salina* was grown on different media: Ramaraj [22] 1.5 M (Rm) and 4 M (Rm_{NaCl}) sodium chloride, Artari (Ar) [23] without trace elements.

Nile Red (NR) (Sigma-Aldrich) stain was used to visualize the accumulation of intracellular lipid globules according to the method described in [9].

Precultivation to low temperatures was carried out by exposure of samples in the dark at temperature 4°C for 24 hours.

Freezing was performed by placing 1 ml of the cell suspension in a 1.8 ml cryogenic vial (Nunc, Sigma-Aldrich), cooled at a rate of 1 deg/min using a Mr. Frosty freezing container with following regimes: to -10°C , -40°C , -40°C followed by immersion to liquid nitrogen or direct immersion to liquid nitrogen (-196°C). Thawing was carried out in a water bath (37°C).

Microscopic studies were performed using an LSM-510 Meta laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany) when excited by a diode laser with a wavelength of 405 nm and 573 nm.

The Aim Image Examiner computer program (Carl Zeiss Micro Imaging) was used for a comprehensive assessment of the safety of cells of the microalgae *D. salina*.

All data were processed by Statistica 6.0 package for Windows (Tulsa, OK, USA), and the results were expressed as means and standard deviation. Comparisons were tested using

Student's t-test with Bonferroni correction. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Features of changes in the pigment composition of cells depending on the stage of culture growth

We found that in the process of cell growth, the ratio between carotenoids and chlorophylls changes, towards an increase in carotenoids and a decrease in the number of chlorophylls, Fig. 1. Changes in the pigment composition of cells are associated with the fact that as the culture grows, the amount of nutrients in the growth media decreases, metabolic products accumulate, and therefore the cells begin to function in a new mode, which contributes to the formation of adaptive reactions.

At the same time, the maximum increase in the number of lipid globules containing carotenoids was in the culture in the stationary phase of growth, grown under conditions of salt and nutrient (without trace elements) stress. This fact explains the greater resistance of microalgae cells to stress factors in the stationary phase of growth [24].

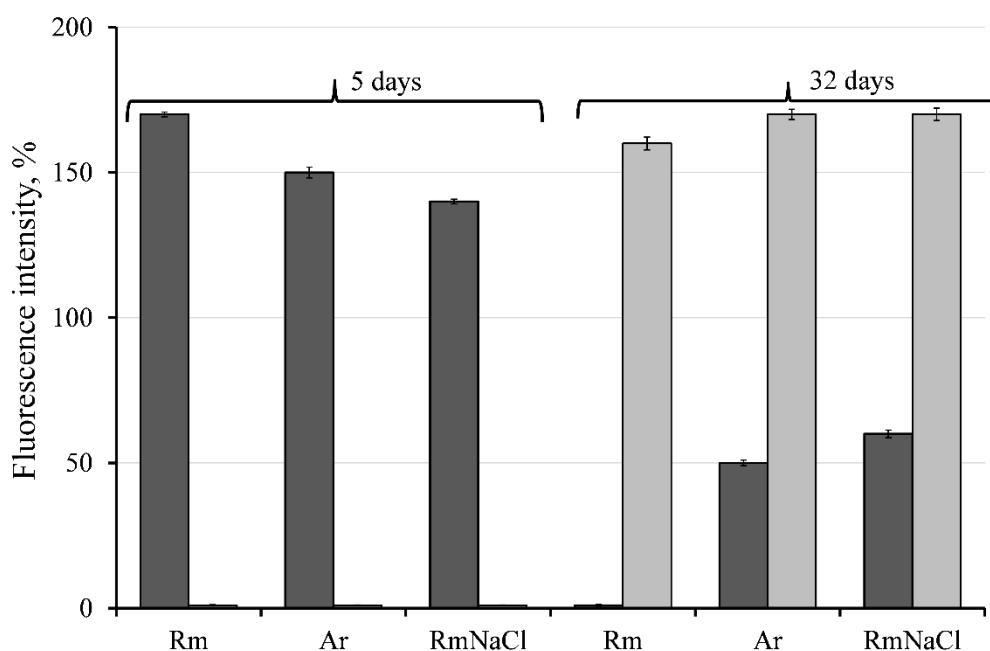


Fig. 1. Fluorescence intensity of *D. salina* cells depending on the growth stage and growth media at normothermia: ■ — chlorophyll, ■ — β -carotene.

Microphotographs also prove the fact that the pigment composition changes during the transition of cells from the exponential to the stationary phase of growth, Fig. 2. In the stationary phase of growth (21 day) the morphological state of the *D. salina* cells changes: increases size and the number of specific inclusions.

Effect of different freezing regimes on the change in the pigment composition of D. salina cells

We have previously shown that microalgae cells are capable of synthesizing glycerol and accumulating carotenoids not only under conditions of salt and nutrient stress, but also under

the influence of low temperatures [18]. It is known that carotenoids have an antioxidant effect, protect the membrane from damage by free radicals, and therefore can have a protective effect, increasing cell survival after freezing and thawing [25, 26]. Therefore, we studied the effect of different freezing regimes on the change in the pigment composition of *D. salina* cells after freezing-thawing, depending on the composition of the growth media.

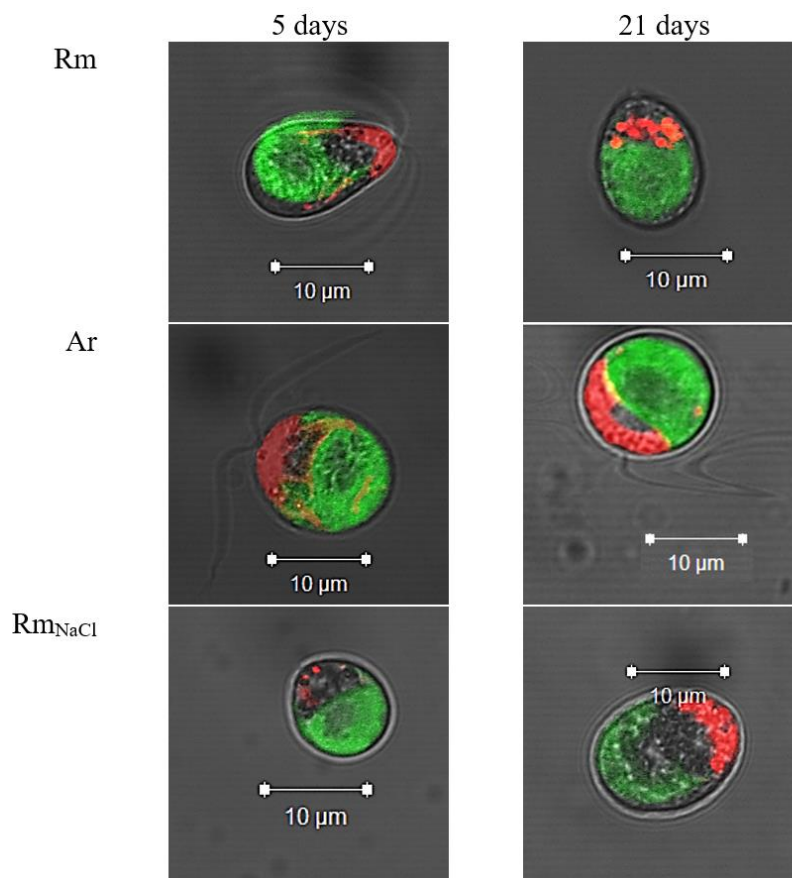


Fig. 2. Micrographs of *D. salina* cells in exponential (5 days) and stationary (21 days) growth phases. Green color — chlorophyll autofluorescence, red — Nile Red stain fluorescence.

It was found that 24-hour incubation of cells at 4°C leads to a significant increase in the intensity of NR fluorescence in cells, regardless of the growth media, Fig. 3 (2). At the same time, the intensity of chlorophyll autofluorescence did not change compared to the control when cultivated on the Rm and significantly decreased when cultivated on the Ar and Rm_{NaCl}, Fig. 3 (1). This may indicate that cells initially grown under stress conditions adapt more quickly to a decrease in temperature, while the change in the ratio between carotenoids and chlorophylls occurs more slowly in a culture grown under optimal conditions.

Slow freezing of cells to -40°C followed by immersion of samples in liquid nitrogen after thawing led to a decrease in the intensity of chlorophyll autofluorescence by 40% in a sample with Rm media, Fig. 3 (1). In the culture on the Ar, the decrease in autofluorescence was at the level of about 20%; no significant changes were recorded on the Rm_{NaCl}. At the same time, a significant increase in NR fluorescence by 10% compared with the control was recorded only in cells on the Rm_{NaCl}, Fig. 3 (2). The absence of obvious changes in the pigment composition during slow controlled freezing to -40°C followed by immersion in

liquid nitrogen indicates that the cells do not have time to undergo structural changes that would allow them to adapt to temperature stress.

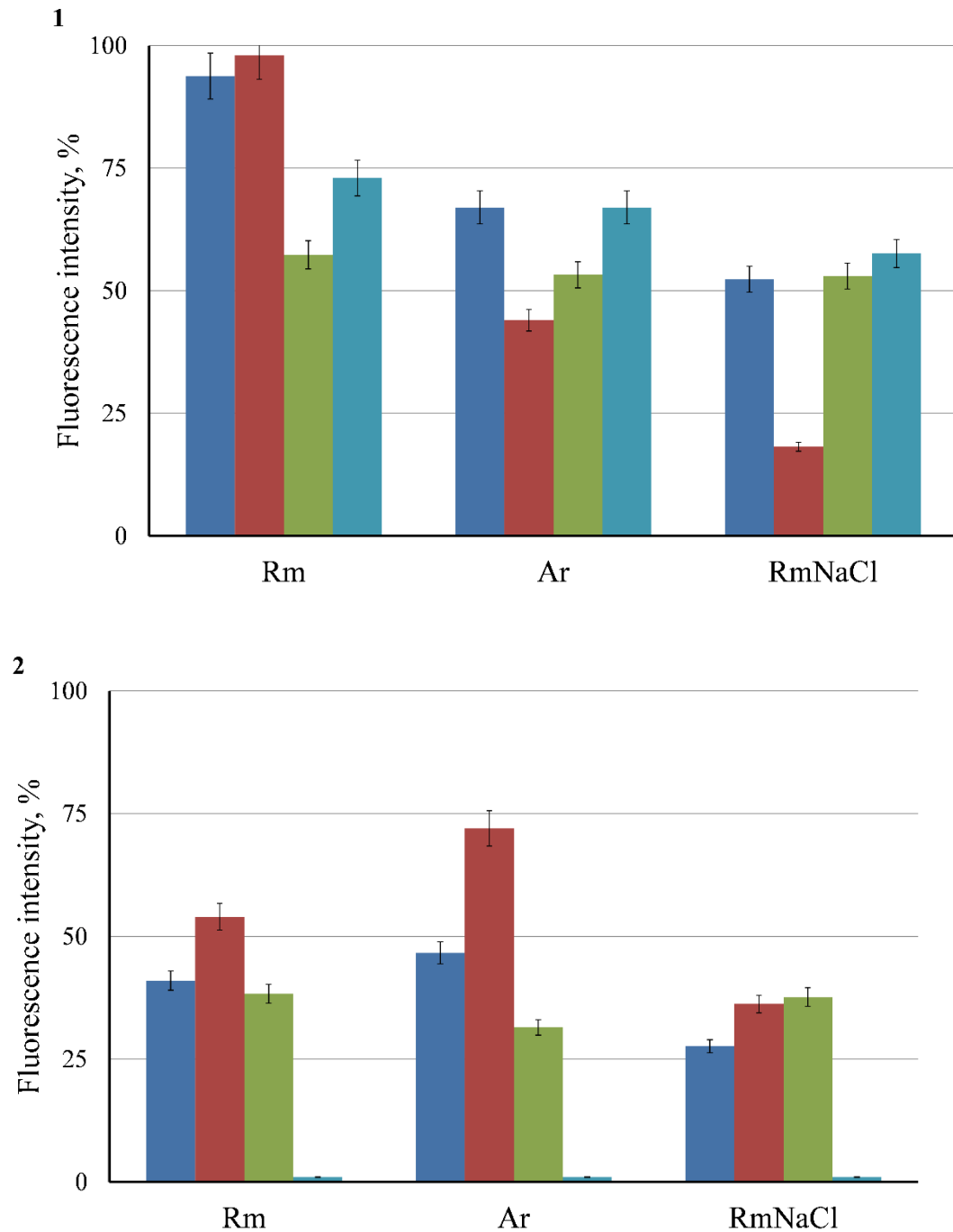


Fig. 3. Fluorescence intensity of chlorophyll (1) and Nile Red stain (2) in *D. salina* cells, depending on the cooling regimes and growth medium: ■ — control, ■ — precultivation at 4°C for 24 hours, ■ — freezing 1 deg/min, ■ — freezing by immersion in liquid nitrogen.

Rapid freezing by immersing samples in liquid nitrogen after thawing did not lead to a significant decrease in chlorophyll autofluorescence in cells, a significant decrease by 20% was only when microalgae were cultivated on Rm, Fig. 3 (1). Regarding NR fluorescence,

rapid cooling resulted in complete degradation of carotene-containing lipid globules in all samples examined, Fig. 3 (2).

Concentration of *D. salina* cells and their motility after freezing-thawing

It was found that the survival of microalgae depends on the final cooling temperature and the composition of the growth media. It was shown that cooling to -10°C at a rate of 1 deg/min did not reduce the concentration of cells after heating in comparison with the control. Cooling to -40°C at a rate of 1 deg/min led to a significant decrease in cell concentration, and the cells grown on the Rm_{NaCl} turned out to be more resistant, Fig. 4 (1).

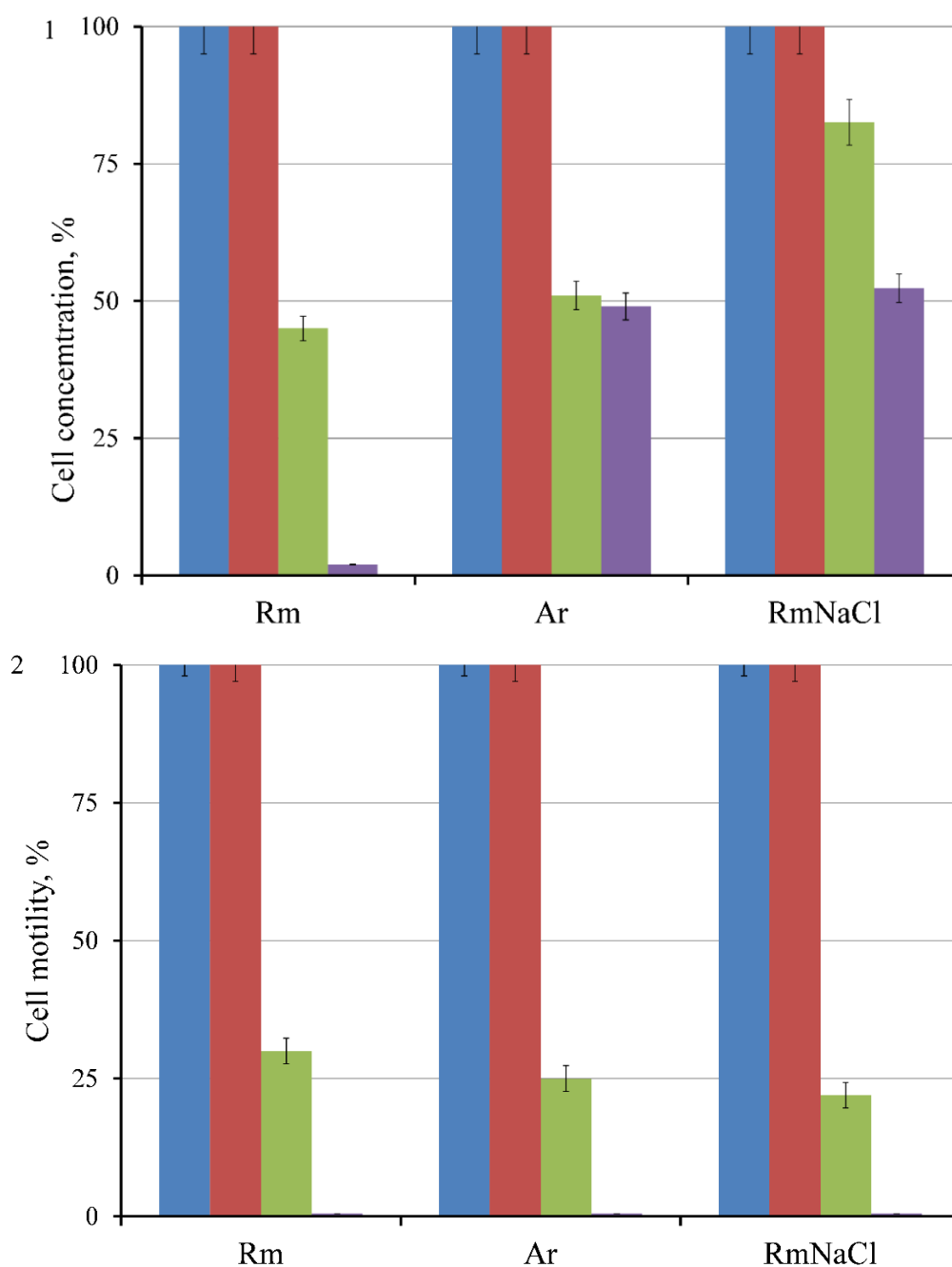


Fig. 4. Concentration (1) and motility (2) of *D. salina* cells after freezing/thawing depending on the cooling regimes: ■ — control; ■ — -10°C ; ■ — -40°C ; ■ — -40°C followed by immersion in liquid nitrogen.

Slow freezing to -40°C followed by immersion in liquid nitrogen showed that cells grown on a media with the optimal composition for growth (Rm) are the least resistant to cryopreservation. The concentration in cultures on the Ar and Rm_{NaCl} after heating decreased by 50% compared to the control, while in the Rm the cell concentration approached zero, Fig. 4 (1). It can be assumed that there is a direct correlation between the number of carotene-containing lipid globules in microalgae cells and their resistance to low temperatures.

The study of cell motility showed that freezing to -10°C does not reduce this indicator in comparison with the control in all studied samples. Upon cooling to -40°C , motility decreased by an average of 75% compared with the control; after freezing to -40°C followed by immersion in liquid nitrogen, no motile cells were found, Fig. 4 (2). It is likely that when cooled to temperatures below -40°C , the functional activity of contractile proteins decreases, which makes *D. salina* cells immobile.

CONCLUSION

It was shown that the pigment composition of *D. salina* cells changes in the stationary growth phase: the number of lipid globules containing carotenoids increases. It has been established that the accumulation of carotene in microalgae is induced by an increase in the concentration of sodium chloride in the growth media up to 4 M.

It has been established that the formation of intracellular lipid globules and the synthesis of carotenoids in *D. salina* cells contribute to an increase in the concentration and number of motile cells after freezing-thawing.

It has been shown that during rapid cooling, adaptive mechanisms do not have time to turn on in cells, and complete destruction of carotene-containing lipid globules occurs.

Therefore, cryopreservation of *D. salina* cells should be carried out at a rate of 1 deg/min to -40°C , followed by immersion in liquid nitrogen and a mandatory stage of precultivation at 4°C for 24 hours.

This approach allows the cells to adapt to a decrease in temperature, as well as to get the best result after freezing-thawing.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors of this study would like to express thanks to the Faculty of Biology and Department of Botany and Plant Ecology of the V. N. Karazin Kharkiv National University (Ukraine) for providing the microalgae culture.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflicts of interest to declare. All co-authors have seen and agree with the contents of the manuscript and there is no financial interest to report. We certify that the submission is original work and is not under review at any other publication.

Authors' ORCID ID

N. A. Chernobai  <https://orcid.org/0000-0002-5736-9277>

N. G. Kadnikova  <https://orcid.org/0000-0002-5728-6498>

K. D. Vozovyk  <https://orcid.org/0000-0002-9743-001X>

L. F. Rozanov  <https://orcid.org/0000-0002-2191-9230>

I. F. Kovalenko  <https://orcid.org/0000-0002-7063-6712>

REFERENCES

1. El-Baz FK, Aboul-Enein AM, El-Baroty GS, Youssef AM, Abd El-Baky HH. Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. J Biol Sci. 2002;2:220–3. <https://doi.org/10.3923/jbs.2002.220.223>
2. Jahnke LS, White AL. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. J Plant Physiol. 2003;160(10):1193–202. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01068>

3. Goyal A. Osmoregulation in *Dunaliella*, Part II: Photosynthesis and starch contribute carbon for glycerol synthesis during a salt stress in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol Biochem.* 2007;45(9):705–10. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.05.008>
4. Kaewkannetra P, Enmak P, Chiu T. The effect of CO₂ and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2012;17(3):591–7. <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0533-5>
5. Lu N, Wei D, Chen F., Yang ST. Lipidomic profiling and discovery of lipid biomarkers in snow alga *Chlamydomonas nivalis* under salt stress. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2012;114(3):253–65. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100248>
6. Vo T, Mai T, Vu H, Van D, Dao H, Tran P, Nguyen N, Nguyen P, Nguyen NC. Effect of osmotic stress and nutrient starvation on the growth, carotenoid and lipid accumulation in *Dunaliella salina* A9. *Research in Plant Sciences.* 2017;5(1):1–8. <https://doi.org/10.12691/plant-5-1-1>
7. Montazeri-Najafabady N, Negahdaripour M, Salehi MH, Morowvat MH, Shaker S, Ghasemi Y. Effects of osmotic shock on production of β -carotene and glycerol in a naturally isolated strain of *Dunaliella salina*. *J Appl Pharm Sci.* 2016;8:160–3. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60825>
8. Chen H, Jiang JG. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J Cell Physiol.* 2009;219(2):251–8. <https://doi.org/10.1002/jcp.21715>
9. Halim R, Webley PA. Nile Red Staining for oil determination in microalgal cells: a new insight through statistical modelling. *Int J Chem Eng.* 2015:695061. <https://doi.org/10.1155/2015/695061>
10. Xia BB, Wang SH, Duan JB, Bai LH. The relationship of glycerol and glycolysis metabolism pathway under hyperosmotic stress in *Dunaliella salina*. *Cent Eur J Biol.* 2014;9(9):901–8. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0323-0>
11. Schilipaulis, L. The extensive commercial cultivation of *Dunaliella salina*. *Bioresour Technol.* 1991;38(2–3):241–3. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90162-D](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90162-D)
12. Tafreshi, H.A. & Shariati, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol.* 2009;107(1):14–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>
13. Gao D, Liu J, Liu C, McGann L, Watson P, Kleinhans F, Mazur P, Critser E, Critser J. Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod.* 1995;10:1109–22. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103>
14. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 2003;46:205–29. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
15. Golan M, Jelinkova S, Kratochvilova I, Skládal P, Pešl M, Rotrekl V, Pribyl J. AFM Monitoring the influence of selected cryoprotectants on regeneration of cryopreserved cells mechanical properties. *Front Physiol.* 2018;9:804. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00804>
16. Panta A, Panis B, Ynouye C, Swennen R, Roca W, Tay D, Ellis D. Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015;120:117–25. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0585-2>
17. Chen XL, Li JH, Xin X, Zhang ZE, Xin PP, Lu XX. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. *S Afr J Bot.* 2011;77(2):397–403. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.10.005>
18. Chernobai NA, Kadnikova NG, Vozovyy KD, Rozanov LF, Kovalenko IF, Kot YG. Temperature-salt stress increases yield of valuable metabolites and shelf life of microalgae. *Biophysical Bulletin.* 2022;48:7–17. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2022-48-01>
19. Chernobai N, Kadnikova N, Kovalenko I. The role of cold adaptation in cryopreservation of *Dunaliella salina* Teod. microalgae. *Advances in Biology & Earth Sciences.* 2019;4(2):119–27. Available from: <http://cryo.net.ua/xmlui/handle/123456789/640>
20. Tafreshi A, Shariati M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol.* 2009;107: 14–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>
21. Aravantinou AF, Manariotis ID. Effect of operating conditions on *Chlorococcum sp.* growth and lipid production. *J Environ Chem Eng.* 2016;1(4):1217–23. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.01.028>
22. Sathasivan R, Juntawong N. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *Int J Curr Sci.* 2013;5:67–73. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/322635532>
23. Masyuk NP. Morphology, systematics, ecology, geographical distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and the prospects for its practical use. Kyiv, Naukova Dumka; 1973. 244 p.
24. Spain O, Funk C. Detailed Characterization of the cell wall structure and composition of Nordic green microalgae. *J Agric Food Chem.* 2022;70(31):9711–21. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02783>
25. Khoo HE, Prasad KN, Kong KW, Jiang Y, Ismail A. Carotenoids and their isomers: Color pigments in fruits and vegetables. *Molecules.* 2011;16:1710–38. <https://doi.org/10.3390/molecules16021710>
26. Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. Microalgae as sources of carotenoids. *Mar Drugs.* 2011;9(4):625–44. <https://doi.org/10.3390/md9040625>

ВПЛИВ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ ТА РЕЖИМІВ ОХОЛОДЖЕННЯ НА ПІГМЕНТНИЙ СКЛАД КЛІТИН *DUNALIELLA SALINA***Н. А. Чернобай, Н. Г. Каднікова, К. Д. Возовик, Л. Ф. Розанов, І. Ф. Коваленко***Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,**вул. Переяславська, 23, Харків, 61016, Україна**e-mail: nadiiachernobai@gmail.com*

Надійшла до редакції 12 травня 2023 р. Переглянута 28 травня 2023 р.

Прийнята до друку 26 червня 2023 р.

Актуальність. Мікродорості здатні виробляти значну кількість біологічно значущих речовин. У зв'язку зі зростанням популярності мікродоростей актуальна розробка ефективних методів зберігання культур та створення банків штамів. Це не тільки задовольнить потреби науки та біотехнології у життєздатних і стійких культурах, але й вирішить проблему збереження біорізноманіття.

Мета роботи. дослідити вплив сольового стресу та режимів охолодження на пігментний склад клітин мікродорості *Dunaliella salina* з метою підвищення їх збереження після заморожування-відігрівання.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були одноклітинні зелені мікродорості *D. salina*. Культивування проводили за стандартною методикою на поживних середовищах з різною кількістю NaCl та мікроелементів. Адаптацію до низьких температур здійснювали витримкою зразків при температурі 4°C протягом 24 годин без освітлення. Заморожування проводили шляхом додавання 1 мл суспензії клітин у поліпропіленову кріогенну пробірку об'ємом 1,8 мл (Nunc, Sigma-Aldrich), охолоджували зі швидкістю 1 град/хв за допомогою Mr. Frosty з використання наступних режимів: до -10°C, -40°C, -40°C з наступним зануренням у рідкий азот або прямим зануренням у рідкий азот (-196°C). Відігрівання здійснювали на водяній бані (37°C) при безперервному струшуванні протягом 1–2 хв. Мікроскопічні дослідження проводили на лазерному скануючому мікроскопі LSM-510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина) при збудженні діодним лазером з довжиною хвилі 405 нм і 573 нм з використанням барвника Nile Red.

Результати. Встановлено, що утворення внутрішньоклітинних ліпідних глобул і синтез каротиноїдів у клітинах *D. salina* сприяють збільшенню концентрації та кількості рухомих клітин після заморожування-відтавання. Показано, що при швидкому охолодженні в клітинах не встигають включатися пристосувальні механізми і відбувається повне руйнування каротиновмісних ліпідних глобул.

Висновки. Кріоконсервацію клітин *D. salina* слід здійснювати зі швидкістю 1 град/хв до -40°C з подальшим зануренням у рідкий азот та обов'язковим етапом прекультивування при 4°C протягом 24 годин. Такий підхід дозволяє клітинам адаптуватися до зниження температури, що сприяє найкращому результату після заморожування-відігрівання.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мікродорості; сольовий стрес; температурний стрес; *Dunaliella salina*; кріоконсервування; кріорезистентність.

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-04>

УДК 577.352+ 577.182.26+576.52

АНТИМІКРОБНИЙ ПЕПТИД ГРАМІЦИДИН S ВПЛИВАЄ НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ ТА ПРИГНІЧУЄ АДГЕЗІЮ ФІБРОБЛАСТІВ ЛІНІЇ L929

Н. М. Алабедалькарім¹, В. П. Берест², Н. М. Моїсєєва¹, Г. А. Божок^{1,2},
Т. П. Бондаренко^{1,2}

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016, Україна;

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна

e-mail: berest@karazin.ua

Надійшла до редакції 28 грудня 2022 р. Переглянута 20 червня 2023 р.

Прийнята до друку 26 червня 2023 р.

Актуальність: Антимікробні пептиди мають перспективи у боротьбі з резистентністю збудників інфекційних захворювань до наявних антибіотиків. Неспецифічний механізм цитостатичної дії антимікробних пептидів, зокрема граміцидину S, щодо бактерій виявляється ефективним і для ушкодження клітин новотворів.

Мета роботи полягає у з'ясуванні можливого протипухлинного ефекту антимікробного пептиду граміцидину S.

Матеріали та методи. Методами конфокальної лазерної та світлової мікроскопії вивчено морфо-функціональні особливості клітин сполучної тканини — фібробластів лінії L929 — під впливом граміцидину S в діапазоні концентрацій 0,5–50 мкг/мл.

Результати: Встановлено літичний вплив граміцидину S в концентрації 50 мкг/мл на клітини культури L929, у концентраціях 0,5 мкг/мл і 5,0 мкг/мл антибіотик підвищує синтетичну активність клітин та стимулює проліферацію фібробластів в моношарі. Анізоморфія клітин є більш вираженою в присутності 5,0 мкг/мл граміцидину S, доданого у поживне середовище під час формування моношару, при цьому третина клітин у зразку формує популяцію, що морфологічно відрізняється від інших клітин у культурі. Додавання 0,5 та 5,0 мкг/мл граміцидину S до неприкріплених фібробластів достовірно пригнічує формування моношару. Під впливом 5,0 мкг/мл граміцидину S швидкість формування моношару є низькою, навіть незважаючи на значний вміст клітин з високим показником ядерно-цитоплазматичного відношення. Кінетика заповнення дефекту клітинного моношару свідчить, що граміцидин S у концентраціях 0,5 та 5,0 мкг/мл здатен керувати мігрантно-проліферативними властивостями клітин лінії L929.

Висновки: Вплив граміцидину S на морфометричні параметри клітин залежить від концентрації пептиду та вихідного стану культури. Граміцидин S пригнічує адгезивні властивості фібробластів у моношаровій культурі клітин та швидкість формування моношару клітинами лінії L929. Найбільш чутливими до нелітичних концентрацій граміцидину S є клітини на стадії прикріплення та формування моношару. Пригнічення адгезивних властивостей клітин сполучної тканини граміцидином S є новим «неканонічним» ефектом відомого антимікробного препарату, який може свідчити про можливість застосування граміцидину S у якості антинеоплатичного засобу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: граміцидин S; фібробласти лінії L929; проліферація; адгезія; міграція.

Як цитувати: Алабедалькарім НМ, Берест ВП, Моїсєєва НМ, Божок ГА, Бондаренко ТП. Антимікробний пептид граміцидин S впливає на проліферацію та пригнічує адгезію фібробластів лінії L929. Біофізичний вісник. 2023;49:43–60. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-04>

In cites: Alabedalkarim NM, Berest VP, Moiseieva NM, Bozhok GA, Bondarenko TP. The antimicrobial peptide gramicidin S alters proliferation and inhibits adhesion of L929 cell line fibroblasts. Biophysical Bulletin. 2023;49:43–60. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-49-04>

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Антимікробні пептиди завдяки амфіфільності та наявності позитивного заряду молекул ефективно адсорбуються у поверхневому шарі та на плазматичній мембрані бактерій та клітин, обумовлюючи цитотоксичний ефект. Мішенню даних пептидів є переважно клітинні мембрани, резистентність до них розвивається рідко, проте недоліком є низька специфічність. Вивчення впливу протимікробних пептидів на клітини різних типів дозволяє розширити сферу їх застосування та з'ясувати нові терапевтичні можливості. Граміцидин S (GS) — циклічний катіонний антимікробний пептид з широким спектром антибактеріальної дії щодо грампозитивних бактерій, грибів та найпростіших [1]. Однак широке використання GS у клінічній практиці обмежено місцевим застосуванням антибіотика через його літичну дію на еритроцити [2, 3] та тромбоцити [4] людини. Спостережуване зростання резистентності мікрофлори до сучасних антибіотиків знов привернуло увагу до антимікробного пептиду GS завдяки відсутності в природі стійких до нього мікроорганізмів [5–7]. Було створено ряд його синтетичних аналогів, які зберігають високу антимікробну активність та мають більш низьку гемолітичну дію [8, 9]. Зміна електростатичних властивостей мембрани при зв'язуванні з антимікробним пептидом граміцидином S має впливати на спроможність клітин до адгезії, розпластування і проліферації. Дія GS як антибіотика полягає в порушенні структури та функції цитоплазматичної мембрани. У модельних мембранах GS краще зв'язується із негативно зарядженими ліпідами, ніж з цвіттеріонними або незарядженими фосфо- і гліколіпідами, взаємодія GS з якими зменшується у присутності холестеролу. Вбудовування в бішар супроводжується витонченням мембрани, GS переважно локалізується в бішарі поблизу залишків гліцерину, взаємодіючи з полярними головними групами та верхніми областями вуглеводневих ланцюгів ліпідів. GS розупорядковує рідкокристалічні бішари, підвищує неспецифічну проникність модельних і біологічних мембран [1, 16, 24, 32], при цьому пептид не утворює дискретних каналів у структурі фосфоліпідного бішару, а індукує перехідні дефекти різного розміру, які змінюють бар'єрні властивості мембрани.

Нещодавно встановлено, що деякі антибіотики з групи граміцидинів, у тому числі GS, здатні до пригнічення проліферації ліній канцерогенних клітин [10–12], що відкрило нові перспективи застосування GS в клінічній практиці. Припускають, що протиракова дія граміцидинів, так само як і їх антибактеріальний ефект, пов'язана з порушенням проникності мембрани клітин, а зрештою і з порушенням клітинного та іонного гомеостазу [13–17]. Але механізми обох ефектів та молекулярні деталі взаємодій залишаються не з'ясованими. У нашому дослідженні ми вивчили певні аспекти взаємодії GS з культурами клітин. У якості моделі обрано не канцерогенні клітини фібробластів лінії L929 — потенційно здатної трансформуватися у пухлиноподібні утворення. На додачу до цього фібробласти лінії L929 є клітинами сполучної тканини, яка може зазнавати впливу антибіотика граміцидину S за умов його рекомендованого місцевого застосування. L929 — це перещеплювана клітинна лінія фібробластів миші, які зазвичай використовуються для досліджень цитотоксичності *in vitro* завдяки відтворюваним біологічним реакціям і швидкості росту, відповідно до міжнародного стандарту ISO 10993-5.

Метою нашої роботи було з'ясувати перспективу застосування граміцидину S як протипухлинного терапевтичного агента, вивчивши його антиадгезивну, антиміграторну активність та здатність впливати на морфологічні та проліферативні властивості фібробластів лінії L929 в культурі клітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на перещеплюваній лінії клітин фібробластів L929, яку

отримували після 4 пасажів з культури, що зберігалася у парах рідкого азоту при температурі -196°C . Культивування здійснювали при 37°C в атмосфері з 5% CO_2 в живильному середовищі DMEM/F12 (“Biowest”, Франція) з додаванням 10% фетальної телячої сироватки та антибіотиків: бензилпеніциліну (200 Од/мл (“Arterium”, Україна) стрептоміцину (40 мкг/мл “Arterium”, Україна) та амфотерицину (5 мкг/мл “Arterium”, Україна).

Для отримання моношарової культури суспензію клітин з концентрацією $1,7 \times 10^5$ кл/мл висівали в пластикові флакони для культивування (“SPL Life Sciences”, Південна Корея). На 7 добу моношарову культуру обробляли 1:1 сумішшю 0,5% трипсину (“Sigma”, США) та розчину Версену (“PAA”, США) впродовж 5 хвилин, відмивали від ферментного розчину середовищем DMEM/F12, та висівали в лунки планшетів (24-лунковий планшет “SPL Lifesciences”, Південна Корея) в концентрації $1,7 \times 10^4$ кл/мл. Життєздатність висівної суспензії клітин, яку оцінювали методом суправітального фарбування трипановим синім, складала $92,33 \pm 5,3\%$.

GS (“Renewal”), розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) вносили в лунки планшетів у фінальній концентрації 0,5, 5 та 50 мкг/мл. Середовище культивування контрольних груп клітин містило відповідну кількість живильного середовища (групи контролю – К), або 1% розчин ДМСО (група ДМСО – Д).

Дослідження проводили на стадії прикріплення та формування моношару (варіант 1) або на сформованому моношарі клітин (варіант 2, варіант 3).

У варіанті 1 суспензію клітини L929 з концентрацією $1,7 \times 10^4$ кл/мл висівали в середовище, які містило відповідно 0,5, 5 і 50 мкг/мл GS, 1% розчин ДМСО, або виключно живильне середовище (контроль К1). На третю добу культивування проводили морфометричні дослідження, оцінювали швидкість формування моношару.

Згідно варіанту 2 суспензію клітини L929 з концентрацією $1,7 \times 10^4$ кл/мл висівали в лунки планшетів, культивували три доби, після заміни середовища культивування додавали 0,5, 5 або 50 мкг/мл GS, або 1% розчин ДМСО та продовжували культивування ще 3 доби. Клітини контрольної група (контроль К2) культивували весь час у живильному середовищі без добавок.

Для варіанту 3 суспензію клітини L929 з концентрацією $1,7 \times 10^4$ кл/мл висівали в лунки планшетів, культивували три доби. Після чого інкубували моношар з 0,5, 5 або 50 мкг/мл GS, або 1% розчином ДМСО годину в стандартних умовах культивування, відмивали GS та ДМСО і продовжували культивування ще три доби. Клітини контрольної група (контроль К3) культивували впродовж всього експерименту в живильному середовищі без добавок.

Морфометричні дослідження

Морфологію клітин оцінювали в незабарвлених культурах та в препаратах, пофарбованих гематоксиліном-еозином за допомогою конфокального лазерного мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 META (Німеччина) і світлооптичного мікроскопа AmScore IN300T-FL (США) з цифровою камерою. Ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ) визначали за допомогою програми AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Німеччина) і розраховували за формулою:

$$\text{ЯЦВ} = \frac{S_{\text{я}}}{S_{\text{ц}}},$$

де ЯЦВ — ядерно-цитоплазматичне відношення, $S_{\text{я}}$ — площа ядра, $S_{\text{ц}}$ — площа цитоплазми.

Фарбування гематоксиліном-еозином

На відповідну добу культивування згідно плану експерименту (варіант 1, варіант 2, варіант 3) фібробласти фіксували 4% параформальдегідом протягом 30 хвилин, відмивали фосфатно-сольовим буфером (PBS, pH=7,4) і витримували послідовно по 1 хвилині в розчинах спирту зростаючих концентрацій (70%, 80%, 96%) та спадаючих концентрацій (96%, 80%, 70%). Після видалення спирту моношар клітин фарбували в гематоксиліні 5 хвилин, відмивали проточною водою і забарвлювали розчином еозину 1 хвилину, відмивали клітини дистильованою водою, покривали смужкою гліцерину та зберігали для подальших досліджень.

Визначення конфлюентності моношару

Конфлюентність моношару клітин, забарвлених гематоксиліном-еозином, оцінювали за допомогою сканування дна планшета на сканері Epson Perfection V10 (Японія). Підрахунки відносної площі моношару клітин проводили за допомогою програми AxioVision Rel 4.8, виражали у відсотках і розраховували за формулою

$$S = \frac{\sum S_M}{S_L \cdot 100\%},$$

де $\sum S_M$ — сума площ ділянки із зафарбованими клітинами у межах лунки, S_L — площа лунки.

Оцінка міграційної активності клітин в 2D культурі при пошкодженні моношару (тест загоєння «подряпини»)

Для оцінки міграційної і проліферативної активності моношарової культури використовували модель ушкодження моношару у вигляді подряпини (scratch assay) [18]. Подряпину на моношарі робили пластиковим наконечником для піпет-дозатору об'ємом 200 мкл та діаметром 0,8 мм. Для оцінки площі загоєння робили серію фотознімків безпосередньо після нанесення подряпини та через 24, 48 та 72 години за допомогою світлооптичного мікроскопу AmScore IN300T-FL з цифровою камерою із використанням програмного забезпечення ImageJ. Площу «загоєння» подряпини виражали у відсотках і розраховували за формулою

$$S = \frac{100 \cdot (S_s - S_t)}{S_s},$$

де S_s — площа подряпини безпосередньо після нанесення дефекту; S_t — площа подряпини через певний час після нанесення дефекту.

Аплікацію GS проводили на сформований моношар 3 добової клітинної культури з нанесеною подряпиною в двох варіантах. У варіанті 2 термін культивування з GS в відповідних концентраціях та з димексидом складав 3 доби. У варіанті 3 після 1 години інкубації з GS або димексидом, їх видаляли шляхом 2-кратного змінення середовища, та додавали свіже поживне середовище для подальшого культивування впродовж 3дб.

Статистичний аналіз

Дані представлені у вигляді медіани з першим і третім кватилем. Визначення значущості відмінностей отриманих даних в порівнюваних вибірках проведено за критеріями Манна-Уїтні (U). Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що мембранотропні властивості GS полягають зокрема в зміні щільності пакування ліпідів бішару мембрани в залежності від концентрації GS – від потоншення до повного порушення цілісності ліпідного бішару [16], і це може обумовлювати формування літичних пор в мембранах та гемолітичний ефект GS [4]. В субмікромольних концентраціях (3–11 мкМ) GS здатен змінювати клітинний трансмембранний потенціал, що впливає на ріст і життєздатність ліній клітин [10, 19, 20].

Нами було зроблено припущення, що в нелітичних концентраціях GS може також впливати на здатність клітин до прикріплення, проліферації та міграції. На першому етапі роботи, ми вивчили дію GS на клітини лінії L929 у таких варіантах: на стадії прикріплення та формування моношару (варіант 1) або на сформований моношар (варіант 2).

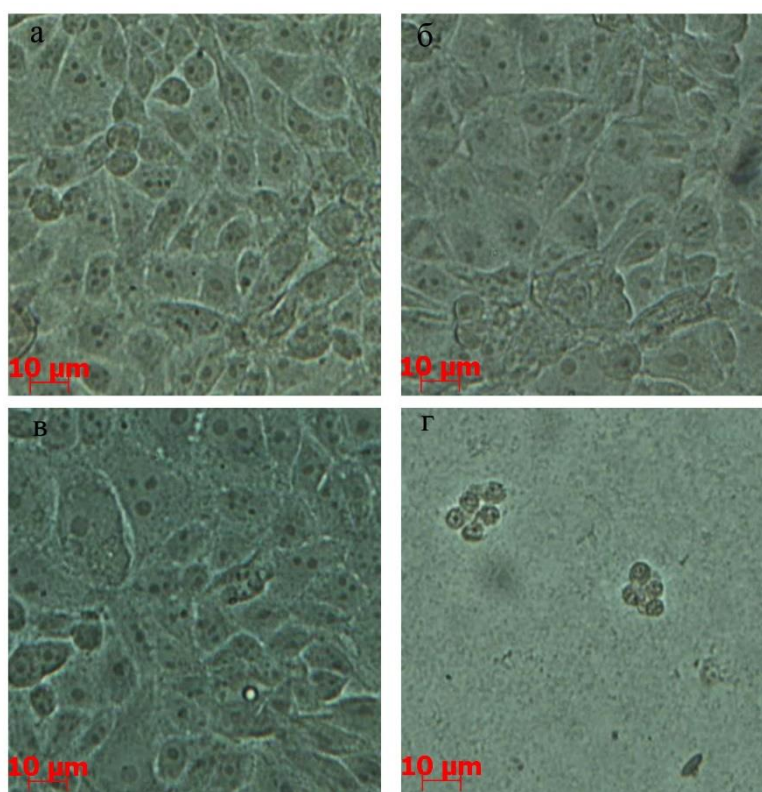


Рис. 1. Морфологія клітин лінії L929 (варіант 1) на 3-тю добу формування моношару в присутності відповідних концентрацій GS: а — контроль K1; б — GS 0,5 мкг/мл; в — GS 5 мкг/мл; г — GS 50мкг/мл. Мікрофото.

Fig. 1. Microscopy micrographs showing morphology of L929 cells (scenario 1) on the 3rd day of monolayer formation in the presence of corresponding concentrations of gramicidin S: а — control K1; б — in the presence of 0.5 µg/ml gramicidin S; в — in the presence of 5.0 µg/ml gramicidin S; г — in the presence of 50 µg/ml gramicidin S.

У варіанті 1 візуальний контроль через три доби показав, що у лунках з контролем (K1, Рис. 1а) та експериментальними концентраціями GS 0,5, 5 мкг/мл (Рис. 1б та Рис. 1в відповідно) спостерігається моношар полігональних клітин з добре помітними ядрами. Більшість клітин мали по 2–3 ядра, що свідчить про високу синтетичну активність клітин. Зразки, що культивували в присутності 0,5 та 5 мкг/мл GS, містили клітини різні за розміром: маленькі та великі. Причому анізоморфія клітин була більш вираженою в присутності 5 мкг/мл GS (Рис. 1б та Рис. 1в відповідно). При додаванні до

поживного середовища GS в концентрації 50 мкг/мл моношар фібробластів не розвивався: в лунках на третю добу спостерігався лише клітинний дебрис та поодинокі нерозпластані клітини (Рис. 1г). Клітини, що культивували з 1% розчином ДМСО, за морфологічними ознаками не відрізнялись від відповідного контролю (К1) (дані не представлено).

У варіанті 2 GS у відповідних концентраціях 0,5, 5 і 50 мкг/мл додавали до моношару клітин лінії L929 і культивували впродовж трьох діб. Ми встановили, що культивування в присутності 50 мкг/мл GS призводило до повного руйнування моношару (Рис. 2г). Тоді як GS в концентрації 0,5 та 5 мкг/мл (Рис. 2б) візуально не впливав на конфлюентність моношару культури клітин (Рис. 2б, 2в), але змінював морфологічні ознаки клітин. В присутності 0,5 мкг/мл GS культивовані клітини були значно більше за розміром та мали велике світле ядро з 1–2 ядерцями (Рис. 2б). При культивуванні з 5 мкг/мл GS культура клітин містила полігональні клітини різні за розміром з більш темним, щільним ядром з 1–3 ядерцями, та світлою цитоплазмою (Рис. 2в).

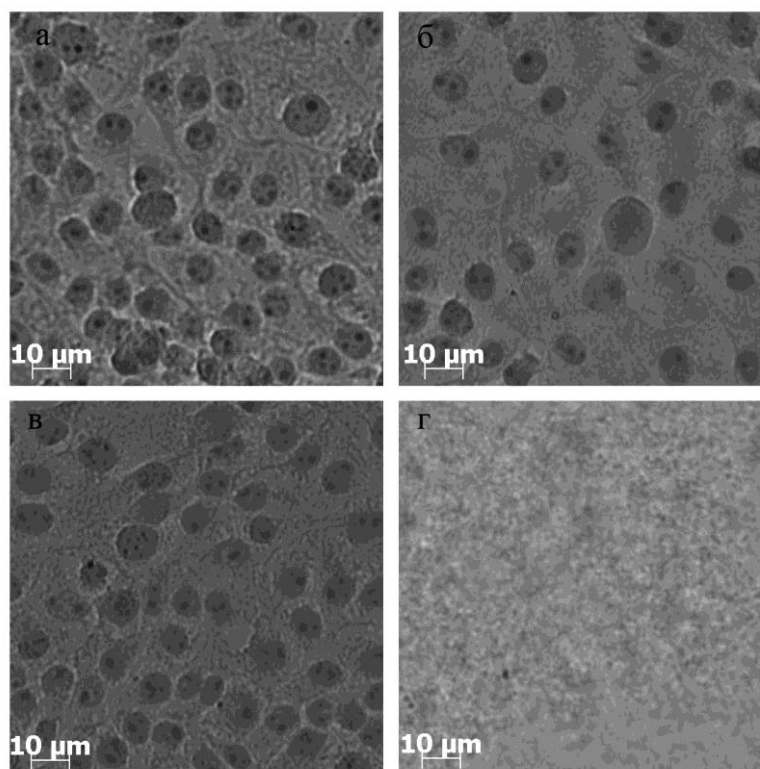


Рис. 2. Морфологія клітин лінії L929 (варіант 2) через 3 доби після додавання до моношару клітин GS в концентрації: а — контроль К1; б — GS 0,5 мкг/мл; в — GS 5 мкг/мл; г — GS 50 мкг/мл. Мікрофото $\times 400$.

Fig. 2. Microscopy micrographs showing morphology of L929 cells (scenario 2) 3 days after the addition of different concentrations of gramicidin S to the monolayer of cells: а — control K1; б — 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gramicidin S; в — 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gramicidin S; г — 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gramicidin S. Magnification $\times 400$.

Для подальшої оцінки впливу GS на морфологічні характеристики клітин L929 після забарвлення гематоксилином та еозином визначали площу клітин (загальна площа), площу ядра та ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ) (Таблиця 1). В присутності GS в максимальній концентрації 50 мкг/мл ці показники не визначали,

тому що нечисленні клітини лінії L929, що збереглися при застосуванні такої концентрації пептиду, були не розпластані та мали пікнотичне ядро.

Таблиця 1. Морфометричні показники (площа ядра, площа клітини та ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ)) клітин лінії L929, які були культивовані з різними концентраціями GS згідно експериментальним умовам варіант 1, варіант 2.

Table 1. Morphometric indicators (nucleus area, cell area, nucleus-to-cytoplasm ratio) of L 929 cells cultured with different concentrations of gramicidin S according to the experimental conditions of scenario 1 and scenario 2.

Умови експерименту		Контроль К1 для варіанту 1; К2 для варіанту 2	ДМСО	Концентрація GS	
				0,5 мкг/мл	5 мкг/мл
Варіант 1	Площа клітини (Загальна площа), мкм ²	72,33 (58,55–92,80)	85,28 (75,71– 116,11)	83,94 (71,57–107,53)	145,77* (101,27– 178,83)
	Площа ядра, мкм ²	26,19 (22,43–32,67)	28,99 (21,58–36,88)	24,92 (21,69–29,15)	49,23* 27,72–66,89)
	ЯЦВ	0,35 (0,297–0,47)	0,33 (0,25–0,37)	0,29* (0,24–0,36)	0,36 (0,26–0,41)
Варіант 2	Площа клітини, (Загальна площа), мкм ²	73,67 (69,69–90,69)	79,06 (65,38–109,55)	84,23 (67,76–106,73)	77,49 (65,14–91,21)
	Площа ядра мкм ²	24,88 (21,69–29,63)	23,90 (20,19–26,89)	25,80 (22,20–33,05)	27,79 (23,02 – 32,41)
	ЯЦВ	0,32 (0,29–0,38)	0,29 (0,25–0,36)	0,335 (0,25–0,39)	0,37* (0,31–0,43)

Примітка: * — відмінності достовірні відносно інтактного контролю К1 та К2 відповідно, $p < 0,05$; дані наведено як: медіана (квартиль 1 – квартиль 3)

Note: * — differences are significant compared to intact control K1 and K2, respectively; $p < 0.05$; data are presented as: median (quartile 1 – quartile 3)

З Таблиці 1 видно, що ДМСО, який був використаний як розчинник GS, значуще не впливав на морфометричні показники культури клітин лінії L929 як на стадії прикріплення та формування моношару (варіант 1), так і на сформований моношар (варіант 2). Проте вплив GS на морфометричні параметри клітин залежав від його концентрації та вихідного стану культури.

При додаванні 0,5 мкг/мл GS на етапі формування моношару (варіант 1) площа клітин дещо збільшувалась на тлі зменшення площі ядра, що призвело до достовірного зниження ЯЦВ клітин.

Додавання 5 мкг/мл GS на етапі формування моношару (варіант 1) призводило до значущого збільшення площі ядра та клітин в цілому, причому ЯЦВ не відрізнялося від відповідного контролю.

Аплікація 0,5 мкг/мл GS до сформованого моношару клітин (варіант 2) достовірно не змінювала морфометричні показники клітин. Проте в присутності 5 мкг/мл GS відмічено тенденцію до зростання площі ядра та загальної площі клітини, що призводило до достовірного зростання ЯЦВ.

Таким чином, статистично значущий ефект GS на морфометричні показники фібробластів (площу ядра та клітин) було встановлено лише при дії пептиду в концентрації 5 мкг/мл на неприкріплені клітини (варіант 1).

В зв'язку з цим ми дослідили розподіл клітин за загальною площею та площею ядра після обробки GS за схемами варіанту 1 та варіанту 2.

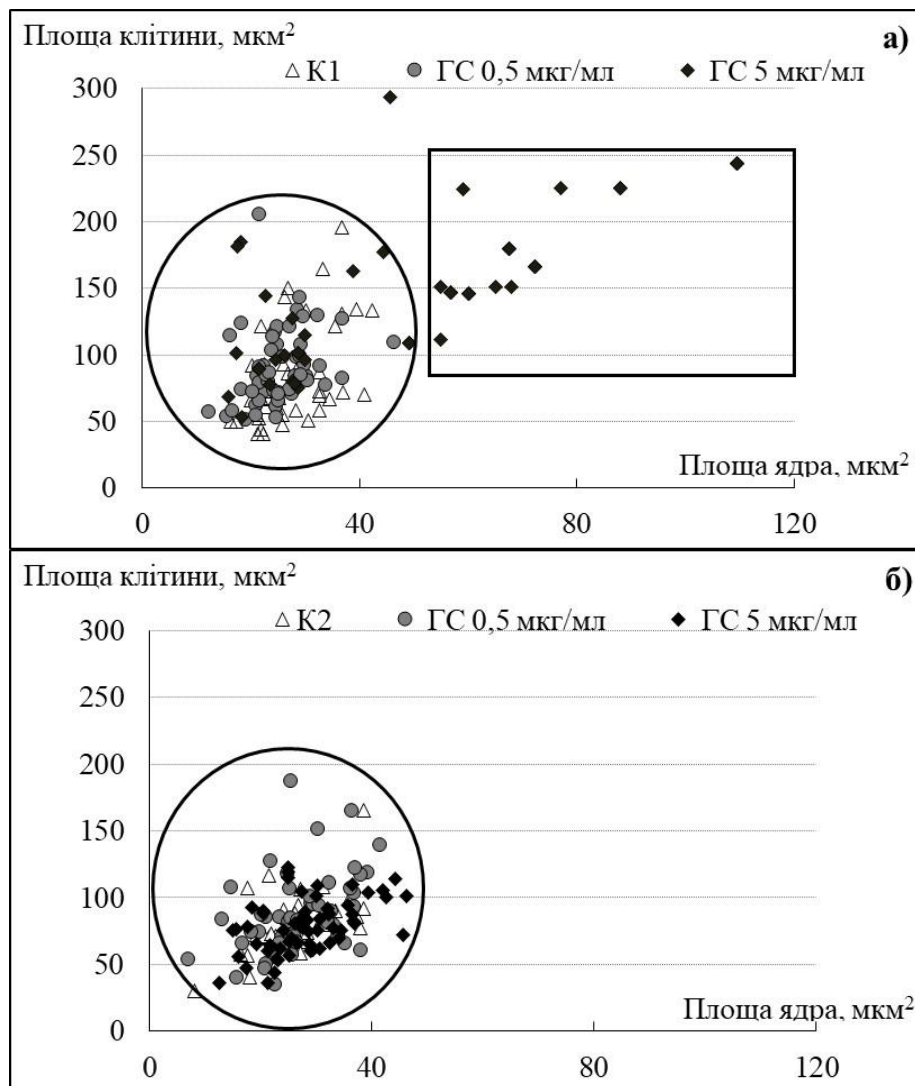


Рис. 3. Розподіл за загальною площею та площею ядра клітин фібробластів L929, що були оброблені GS згідно умовам експерименту: а — варіант 1; б — варіант 2.

Колом виділено популяцію клітин, характерну для усіх досліджених зразків культур — т.зв. популяція 1, та прямокутником — популяцію 2.

Fig. 3. Distribution of L929 fibroblast cells by total area and nucleus area. Cells were treated with gramicidin S according to experimental conditions: a — scenario 1; б — scenario 2.

Oval encircles the population of cells presented in all samples studied — the so-called population 1; rectangle encompass cells of population 2.

З Рис. 3 видно, що контрольні клітини та зразки, які культивували з 0,5 мкг/мл та 5 мкг/мл GS (варіант 2, Рис. 3б) та з GS 0,5 мкг/мл (варіант 1, Рис. 3а) розподіляються у межах однієї досить щільної популяції клітин (популяція 1, Рис. 3).

Проте 5 мкг/мл GS, доданий у поживне середовище під час формування моношару (варіант 1, Рис. 3а), індукує в культурі клітин формування двох популяцій клітин: популяції 1, яка характерна для усіх досліджених зразків, та популяції 2, яка включає $34,7 \pm 0,3\%$ клітин, що морфологічно відрізняються від клітин популяції 1 завдяки великому ядру та збільшеній площі клітини. Це співпадає з нашими візуальними спостереженнями анізоморфії культури клітин, що формувалася в присутності 5 мкг/мл GS.

Таблиця 2. Морфометричні показники (площа ядра, площа клітини та ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ)) різних популяцій клітин лінії L929, що культивували з 5 мкг/мл GS згідно експериментальним умовам варіант 1.

Table 2. Morphometric indicators (nucleus area, cell area, nucleus-to-cytoplasm ratio) of different populations of L 929 cells cultured with 5.0 µg/ml of gramicidin S according to the experimental conditions of scenario 1.

	Площа клітини (загальна площа), мкм ²	Площа ядра, мкм ²	ЯЦВ
Популяція 1	109,05* (89,55–146,67)	28,68 (22,73–49,23)	0,28* (0,24–0,38)
Популяція 2	179,34* (151,38–225,20)	68,00* (65,00–77,00)	0,41* (0,38–0,43)

Примітка: * — відмінності достовірні відносно відповідного інтактного контролю K1, $p < 0,05$. Дані наведено як: медіана (квартиль 1 – квартиль 3).

Note: * — differences are significant compared to intact control K1; $p < 0.05$; data are presented as: median (quartile 1 – quartile 3)

Подальший порівняльний аналіз клітин у складі обох популяцій (Таблиця 2) показав, що популяція 1 та популяція 2 відрізняються за морфометричними параметрами: популяція 1 має знижений показник ЯЦВ, аналогічно зразкам, культивованим з 0,5 мкг/мл GS (варіант 1, Таблиця 1). Проте клітини популяції 2 мають достовірно високий показник ЯЦВ на тлі збільшення розміру клітин та зростання площі ядра у більш ніж 2,5 рази.

Як відомо, ЯЦВ є непрямим показником проліферації та функціональної активності клітин: зниження ЯЦВ може свідчити про пригнічення відповідних функцій, а зростання ЯЦВ — про підвищення функціональної активності клітин, або бути ознакою проліферації [22]. Згідно нашим даним (Таблиця 1), ЯЦВ інтактного контролю дорівнює 0,349 для K1 та 0,32 для K2. Відмінності між ЯЦВ контрольних культур є статистично незначущими. Найнижчий показник ЯЦВ є притаманним культурі клітин з 0,5 мкг/мл GS в поживному середовищі (варіант 1, Таблиця 1) та клітинній популяції 1, що була культивована з 5 мкг/мл GS (варіант 1, Таблиця 2). Найвищі значення ЯЦВ встановлено для культури з 5 мкг/мл GS в поживному середовищі (варіант 2) та популяції 2 культури з 5 мкг/мл GS в поживному середовищі (варіант 1). Високе ЯЦВ характерне для мало диференційованих клітин, які швидко діляться, та їх попередників. Великі зрілі клітини зазвичай мають низьке ядерно-цитоплазматичне відношення. Ймовірно зменшення ЯЦВ при невеликих концентраціях GS є наслідком стимулюючого впливу антибіотика на клітинну проліферацію. Відомо, що фактори, які змінюють проникність плазматичної мембрани, впливають на регуляцію об'єму клітин під час ділення, послідовність клітинного циклу та допомагають підтримувати баланс між проліферацією, апоптозом, перехресними перешкодами з іншими білками клітинної мембрани або факторами транскрипції, які, в свою чергу, модулюють прогресію клітинного циклу або регулюють шляхи біосинтезу структурних компонентів клітини.

Показник конфлюентності моношару також є показником клітинної проліферації. В зв'язку з цим ми дослідили вплив GS на формування конфлюентного моношару (варіант 1) та його збереженість (варіант 2).

З Таблиці 3 видно, що площі моношарів контрольних зразків K1 та K2 достовірно не відрізняються. Враховуючи, що тривалість культивування контролів K1 та K2 складає 3 та 6 діб відповідно, можна припустити, що активне формування моношару відбувається в перші три доби культивування. Ймовірно, що подовження

культивування збільшує щільність клітинних культур, що призводить до контактного інгібування проліферації [22]. Таке «контактне» пригнічення могло проявлятися також у зменшенні ЯЦВ відповідного інтактного контролю (К2, варіант2). Димексид, доданий у поживне середовище, достовірно не впливає на формування моношару. Додавання GS в обох нелітичних концентраціях 0,5 та 5 мкг/мл до неприкріплених фібробластів достовірно пригнічує формування моношару (варіант 1). Аплікація GS у таких концентраціях до прикріплених клітин (варіант 2) призводить до незначного збільшення площі моношару для зразків з 5 мкг/мл GS (варіант 2), що корелює з підвищенням значення ЯЦВ.

Таблиця 3. Відносна площа моношару на різних термінах культивування клітин лінії L929 у присутності GS згідно схем експерименту варіант 1 та варіант 2.

Table 3. The relative area of the monolayer at different times of cultivation of L929 cells in the presence of gramicidin S according to the scenario 1 and scenario 2 experimental schemes.

Умови експерименту	Контроль (К)	Димексид (Д)	Концентрація GS	
			0,5 мкг/мл	5 мкг/мл
Варіант 1	79,24 (77,31–81,17)	75,87 (67,00–74,74)	73,15* (72,37–5,120)	70,99* (66,93–71,71)
Варіант 2	83,28 (83,27–87,63)	85,44 (82,10–90,72)	86,24 (82,10–90,73)	91,90 (87,24–97,14)

Примітка: * — відмінності достовірні відносно відповідного інтактного контролю, $p < 0,05$. Дані представлено як: медіана (квартиль 1 – квартиль 3).

Note: * — differences are significant compared to corresponding intact control; $p < 0.05$. Data given as: median (quartile 1 – quartile 3)

Таким чином, найбільш чутливими до нелітичних концентрації GS виявилися клітини на стадії прикріплення та формування моношару. Пригнічення швидкості формування моношару у варіанті 1 співпадало зі зниженням ЯЦВ культур клітин в присутності 0,5 мкг/мл GS. Під впливом 5 мкг/мл GS активність формування моношару була також низькою, хоча культура містила значний відсоток клітин з високим показником ЯЦВ. Ймовірно, що інгібуючий ефект GS обумовлений пригніченням адгезивних властивостей клітин.

Для подальшого з'ясування впливу GS на міграційно-проліферативні властивості клітин ми використали тест «подряпина», який є загально прийнятним простим й інформативним методом вивчення активності клітин *in vitro*. Він заснований на тому явищі, що клітини у культурі здатні до міграції в зону з меншою клітинною щільністю [18, 23]. Цей процес триває поки клітинна щільність культури не досягне фази зливного росту (контактне інгібування) [22].

Візуальне спостереження за площею подряпини дозволило встановити, що клітини у інтактних контролях (К2 та К3) практично повністю закривають дефект моношару через 72 години (Рис. 4).

Короткотривала (1 год) аплікація димексиду (Д3), 0,5 та 5 мкг/мл GS до культури клітин (варіант 3) не впливає достовірно на динаміку «загоєння» подряпини в порівнянні з контролями К3 (Таблиця 4). Повне закриття дефекту спостерігається через 72 години. При додаванні літичної концентрації GS (50 мкг/мл) спостерігається уповільнене заповнення дефекту поверхні клітинами, приблизно 50% від контролю через 24 години. При подальшому культивуванні клітини втрачають міграційно-проліферативні та адгезивні здібності, оскільки відносна площа подряпини збільшується до вихідного розміру. Таким чином, короткотривала інкубація (1 година) з 50 мкг/мл GS призводить до розвитку незворотних пошкоджень клітин.

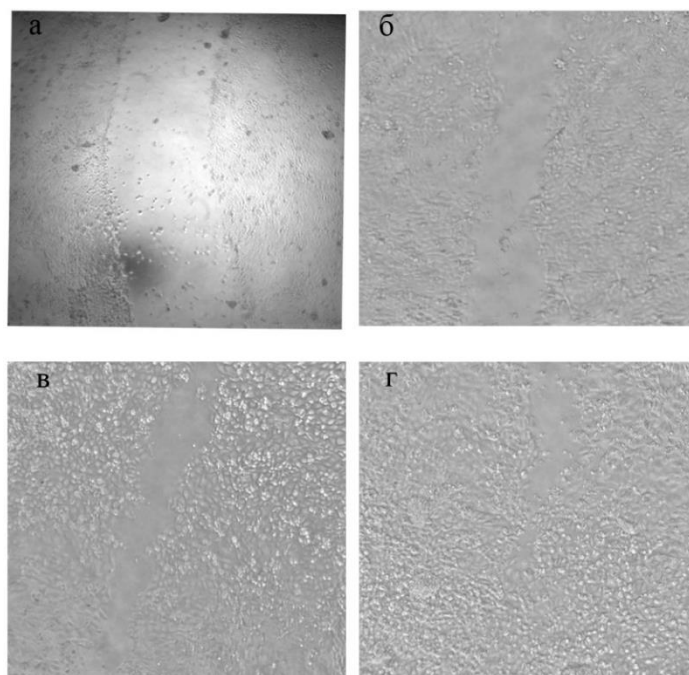


Рис. 4. Загоєння подряпини в моношарі інтактних клітин лінії L929 з часом культивування: а — дефект моношару, б — через 24 години, в — через 48 год, г — через 96 годин.

Fig. 4. Scratch recovery in a monolayer of intact L929 cells after different duration of cultivation: а — monolayer defect, б — after 24 hours, в — after 48 hours, г — after 96 hours.

Таблиця 4. Відносна площа подряпини (%) на різних термінах культивування клітин лінії L929, які було оброблено різними концентраціями GS протягом 1 години (варіант 3) Дані представлено як медіана (квартиль 1 – квартиль 3)

Table 4. Relative scratch area (%) after different durations of culturing of L929 cells treated with various concentrations of gramicidin S for 1 hour (scenario 3). Data presented as: median (quartile 1 – quartile 3)

Умови експерименту	Термін культивування, години			
	12 год	24 год	48 год	72 год
Інтактний контроль (К3)	40,37 (37,08–46,74)	12,04 (11,08–12,99)	13,32 (6,85–19,78)	0
Контроль з обробкою ДМСО (Д3)	48,63 (44,47–62,82)	29,48 (28,48–44,89)	4,30 (4,03–4,58)	0
GS 0,5 мкг/мл	30,90 (29,90–36,84)	15,58 (14,78–31,77)	5,86 (5,51–6,22)	5,55 (2,78–10,24)
GS 5 мкг/мл	41,30 (39,37–51,24)	29,22 (22,19–41,06)	17,30 (11,61–17,30)	8,73 (7,99–10,08)
GS 50 мкг/мл	87,21* (83,45–93,95)	64,43* (64,24–72,74)	85,67* (85,29–90,77)	98,00* (97,5–98,50)

Примітка: * — відмінності достовірні відносно К3, $p < 0,05$

Note: * — significant differences compared to K3, $p < 0,05$

При довгостроковому культивуванні клітин (варіант 2) димексид та обидва розчини GS 0,5 та 5 мкг/мл гальмують репарацію подряпини перші 24 години (Таблиця 5) [41–43]. Проте гальмівний ефект 5 мкг/мл GS був більш пролонгований і значуще блокував закриття подряпини протягом 48 годин. Культивування з літичною концентрацією GS

50 мкг/мл призводить до деструкції клітинного моношару не тільки в зоні подряпини, але й на інших ділянках.

Таким чином, на 72 годину культивування відбувалося закриття подряпини у всіх зразках, крім тих, що культивували з GS 50 мкг/мл. Це ще раз підтверджує спостереження про те, що ця концентрація є літичною для клітин при її довготривалій аплікації.

В останні роки з'явилися нові дані, що пептиди граміцидини мають не тільки антибактеріальний ефект, але й здатні пригнічувати проліферацію і міграцію ракових клітин [10, 11, 20]. Ці дані, з одного боку, стимулювали розробку похідних граміцидинів, які на фоні більш низької токсичності для клітин зберігали значну антибактеріальну і протипухлинну активність [8, 9, 24], а з іншого боку, загостило інтерес до розуміння механізмів взаємодії граміцидину з клітинами, які на сьогоднішній день залишаються не повністю з'ясованими. Цитолітичний ефект граміцидину переважно пов'язують зі збуренням ліпідних шарів бактеріальної мембрани [25] і, в наслідок цього, порушенням клітинного та іонного гомеостазу [13, 20]. Інші автори наполягають, що насамперед, GS порушує синтез АТФ, блокуючи деякі ферменти респіраторного шляху [26], або впливає на локалізацію периферичних мембранних білків, що беруть участь у клітинному поділі та синтезі клітинної оболонки [27]. Нові данні також свідчать, що пригнічування міграції клітин під впливом антибіотиків з групи граміцидинів супроводжується зниженням експресії та перерозподілом на поверхні клітин трансмембранних протеїнів, які відповідають за адгезію та міграцію клітин [11]. Але загальної картини взаємодії граміцидину S з клітинами не має, завдяки тому що його вплив на різні типи клітин не є однаковим [3, 11, 28]. З огляду на вивчення можливості системного застосування аналогів або інкапсульованих наноносіями форм антимікробних пептидів [29] цікавим було вивчення впливу GS на клітин сполучної тканини на додачу до робіт з вивчення впливу цього циклічного пептиду на клітини крові [3, 4, 28, 30].

Таблиця 5. Відносна площа подряпини на різних термінах культивування клітин лінії L929 з різними концентраціями GS протягом 3 діб (варіант 2). Дані представлено як: медіана (квартиль 1 – квартиль 3)

Table 5. Relative scratch area (%) after different durations of culturing of L929 cells treated with various concentrations of gramicidin S for 3 days (scenario 2). Data presented as: median (quartile 1 – quartile 3)

Умови експерименту	Термін культивування, години			
	12 год	24 год	48 год	72 год
Інтактний контроль (K2)	42,62 (37,61–57,25)	12,04 (11,08–12,99)	13,32 (6,85–19,78)	0
Контроль з обробкою ДМСО протягом 3 діб (Д2)	48,63 (44,47–62,82)	23,99 21,50–35,97	4,31 (4,03–4,58)	0
GS 0,5 мкг/мл	32,16 (29,01–33,35)	31,58* (28,29–44,87)	0,86 (0,54–2,37)	0
GS 5 мкг/мл	42,93 (38,59–46,69)	46,86* (35,92–48,76)	30,87* (28,06–34,40)	4,24 (2,61–11,30)
GS 50 мкг/мл	77,78* (60,92–94,64)	97,75* (96,45–99,06)	82,46* (79,75–85,16)	100

Примітка: * — відмінності достовірні відносно інтактного контролю, $p < 0,05$

Note: * — significant differences compared to intact control, $p < 0,05$

Наше дослідження присвячене вивченню впливу GS на ряд функціональних характеристик фібробластів лінії L929, що проявляються на різних етапах культивування: адгезія, міграційно-проліферативний потенціал, формування моношару.

Граміцидин S у концентраціях 0,5, 5,0 та 50 мкг/мл додавали до клітин лінії L929 на різних етапах культивування: до суспензії клітин — для дослідження впливу на прикріплення та швидкість формування моношару (варіант 1), до моношару клітин — для виявлення можливого токсичного ефекту (варіант 2 та варіант 3) та у тесті «подряпина» (варіант 2, варіант 3) — для оцінки міграційно-проліферативного потенціалу клітин в присутності GS.

Відомо, що антибактеріальний ефект GS проявляється в діапазоні концентрацій 3–12,5 мкг/мл [31], в той час як 50% цитотоксична дія на культурі клітин — при концентрації 18,7 мкг/мл, а 50% гемоліз еритроцитів спостерігається при концентрації 35,2 мкг/мл [32, 33].

За нашими даними GS в концентрації 50 мкг/мл проявляв виражений цитотоксичний ефект. Навіть короткотривала, протягом 1 години, аплікація GS у концентрації 50 мкг/мл на моношар клітин в тесті «подряпина» призводила до незворотного гальмування міграційної активності фібробластів при «репарації» моношару. Довготривала інкубація (протягом трьох діб) неприкріплених клітин до сформованого моношару з GS в концентрації 50 мкг/мл призводила до руйнування цілісного моношару та цитолітичного ефекту на усі клітини.

У нелітичних концентраціях 0,5 та 5 мкг/мл вплив GS на досліджені клітини залежав від терміну аплікації та вихідного стану клітин. Додавання GS до клітин під час інокуляції призводило до зменшення площі сформованого моношару та погіршення показників ЯЦВ на третю добу, особливо для зразків, культивованих з 0,5 мкг/мл GS, в порівнянні з відповідним контролем. Для клітин, культивованих з 5 мкг/мл GS, показник ЯЦВ не зазнав значних змін, завдяки формуванню популяції клітин, що мали збільшену загальну площу клітини та ядра. Ця популяція не була залучена до активної проліферації, тому що клітини, інкубовані з GS (варіант 1), не сформували конфлюентний моношар незалежно від наявності або відсутності популяції великих клітин.

В той же час при аплікації нелітичних концентрацій GS на прикріплені клітини (варіант 2) конфлюентний моношар зберігався, а кількісні значення ЯЦВ значуще не відрізнялись від відповідного контролю, або перевищували їх (аплікація 5 мкг/мл GS). Таким чином, неприкріплені фібробласти були більш чутливими до впливу GS у нелітичних концентраціях.

Відомо, що адгезія фібробластів до позаклітинного матриксу здійснюється завдяки фокальній адгезії — специфічному контакту, що формується за участю актинових волокон цитоскелету, мембранних периферичних та інтегральних білків з волокнами позаклітинного матриксу. Показано, що інтегрин-опосередкована адгезія залежить від стану ліпідного бішару мембрани. Так, зміна товщини бішару та поділу ліпідної фази мембран клітин під впливом амфіфільної сполуки бензилового спирту знижує швидкість міграції ендотеліоцитів внаслідок погіршення зв'язку інтегральних білків з субстратом [34, 40]. GS, як відомо, також може призводити до кластеризації мембранних білків, що відповідають за поділ клітин [6, 16] та їх здатність до міграції [11], а також циклопептид здатен викликати формування неламелярних ліпідних фаз у модельних мембранах та стоншувати бішар [1, 24].

Для більшості клітин прикріплення їх до субстрату в сукупності зі стимуляцією ростовими факторами регулюють клітинний цикл, стимулюють клітини до входу в мітоз [35]. Стійка клітинна адгезія необхідна для ініціювання синтезу ДНК і

придушення апоптозу [36]. Натяг клітин при адгезії до позаклітинного субстрату є ключовою точкою, що ініціює перехід клітин до G₁/S фази [37]. Вважають, що фокальна адгезія має вирішальне значення для нормальної роботи клітини, а також здатності клітини реагувати на навколишнє середовище [38].

Це пояснює значно вищу чутливість неприкріплених клітин лінії L929 до GS, який впливав на кількісні значення ЯЦВ, на формування моношару, в порівнянні з їх впливом на прикріплені клітини.

Використовуючи тест «подряпина», ми дослідили вплив терміну аплікації GS на здатність культури клітин до репарації пошкодженого моношару. Найвища, літична, концентрація GS (50 мкг/мл) навіть під час короткотривалої аплікації незворотно пригнічувала закриття дефекту моношару. GS з нелітичними концентраціями 0,5 та 5 мкг/мл зворотно гальмував репарацію дефекту моношару при триденній аплікації. Проте гальмівний ефект залежав від концентрації GS: 0,5 мкг/мл затримував закриття дефекту протягом 24 години, а 5 мкг/мл GS протягом 48 годин.

Нещодавно було показано, що GS здатний до арешту клітинного циклу на стадії G₂/M, завдяки чому подавляє міграцію та індукує апоптоз в клітинах рака шлунку людини [10]. Для клітин лінії L929 індукований арешт на стадії G₂/M призводить до зростання середнього фазового об'єму [39]. Ми показали, що додавання 5 мкг/мл GS до фібробластів під час інокуляції призводить до виділення групи великих клітин, що мають збільшений розмір ядра і клітини в цілому, і можуть, ймовірно, бути результатом арешту клітинного циклу у стадії G₂/M. При вивченні репарації подряпини нами отримано підтвердження, що GS з концентрацією 5 мкг/мл дійсно зворотно блокує проліферацію та міграцію фібробластів на 24, або 48 годин в залежності від тривалості аплікації.

Таким чином, граміцидин S в концентрації 5 мкг/мл не має значущого цитотоксичного ефекту на культуру фібробластів, але призводить до пригнічення міграційної активності клітин. Причому ступінь пригнічення і можливість відновлення цього параметру залежить від терміну аплікації GS та вихідного рівня адгезії клітин.

Перспективою нашого дослідження може стати вивчення впливу GS на формування об'ємних клітинних агрегатів. Базовою проблемою розвитку пухлин, фіброзу та раку є здатність трансформованих клітин «відчувати» жорсткість тканин і визначати напрямок міграції. Дуротаксис — міграція клітин в бік збільшення жорсткості субстрату, спостерігається частіше, проте описано і спрямовану міграцію клітин гліоми U-251MG до менш жорстких областей [44]. Негативний та позитивний дуротаксиси опосередковані механочутливою сигналізацією, скоротливістю актоміозину, рівнем таліну. Як показано в нашій роботі, граміцидин S впливає на міграційну активність фібробластів при 2-D культивуванні, а з'ясування скорочувальних і адгезивних механізмів, чутливих до дії пептиду при формуванні 3-D клітинних кластерів, сприятиме розумінню молекулярних механізмів міграції та створенню нових засобів терапії.

Іще одним можливим застосуванням знайденої нами здатності граміцидину S зворотно блокувати проліферацію та міграцію фібробластів є використання пептидного антибіотика для загоєння ран при пошкодженні тканин або в косметології. Фібробласти разом із мезенхімальними стовбуровими клітинами та кератиноцитами керують молекулярними процесами, залученими до закриття та відновлення пошкодженої тканини, запобігаючи інфекціям і вразливості до подальших пошкоджень. Дослідники зацікавлені в потенційному терапевтичному застосуванні фібробластів для загоєння ран завдяки їх регенеративним можливостям і секреції сигнальних молекул, які регулюють інші клітини, що відновлюють тканини [45].

ВИСНОВКИ

Антимікробний пептид граміцидин S у нелітичних концентраціях виявляє властивість слабого мутагена, впливає на проліферативну активність клітин сполучної тканини, зокрема, в концентраціях 0,5 мкг/мл і 5 мкг/мл граміцидин S підвищує синтетичну активність та стимулює проліферацію фібробластів в моношарі та швидкість формування моношару клітинами культури L929. Найбільш чутливими до нелітичних концентрацій граміцидину S є клітини на стадії прикріплення та формування моношару. Підвищення концентрації граміцидину S до 50 мкг/мл веде до лізису фібробластів лінії L929 у культурі.

У нелітичних концентраціях граміцидин S пригнічує адгезивні властивості фібробластів, викликаючи різноспрямовані зміни показників проліферації та функціональної активності клітин при сталому гальмуванні пептидом формування моношару.

Граміцидин S в концентрації 5 мкг/мл не має значущого цитотоксичного ефекту на культуру фібробластів, але призводить до пригнічення міграційної активності клітин. Причому ступінь пригнічення і можливість відновлення цього параметру залежить від терміну аплікації GS та вихідного рівня адгезії клітин.

Зворотне блокування граміцидином S у концентрації 5 мкг/мл проліферації та міграції фібробластів узгоджується зі спостереженим нами раніше антиагрегаційним ефектом GS щодо тромбоцитів, тобто може бути універсальною анти-адгезивною властивістю даного декапептиду, яка в перспективі може бути використана в терапії новоутворень; у косметології; а також може сприяти загоєнню ран.


КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ


Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

Authors' ORCID ID

Н. М. Алабедацькарім  <https://orcid.org/0000-0002-4445-9230>

В. П. Берест  <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>

Н. М. Моїсєєва.  <https://orcid.org/0000-0002-9845-2317>

Г. А. Божок  <https://orcid.org/0000-0002-4188-9286>

REFERENCES

1. Prenner EJ, Lewis RN, McElhane RN. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1462(1–2):201–21. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00207-2](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00207-2)
2. Malik A, Bissinger R, Liu G, Liu G, Lang F. Enhanced eryptosis following gramicidin exposure. *Toxins* 2015;7(5):1396–410. <https://doi.org/10.3390/toxins7051396>
3. Ovsyannikova T M, Kovalenko AO, Berest VP, Borikov OY. Changes in electrophysical characteristics of red blood cells induced by gramicidin S. *Biophys Bull*. 2021;(45):32–43. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2021-45-03>
4. Hackl EV, Berest VP, Gatash SV. Interaction of polypeptide antibiotic gramicidin S with platelets. *J Pept Sci*. 2012;18(12):748–54. <https://doi.org/10.1002/psc.2461>
5. Hazam PK, Phukan C, Akhil R, Singh A, Ramakrishnan V. Antimicrobial effects of syndiotactic polypeptides. *Sci Rep*. 2021;11(1):1823. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81394-2>
6. Berditsch M, Afonin S, Reuster J, Lux H, Schkolin K, Babii O, et al. Supreme activity of gramicidin S against resistant, persistent and biofilm cells of staphylococci and enterococci *Sci Rep*. 2019;9(1):17938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54212-z>
7. Guan Q, Huang S, Jin Y, Campagne R, Alezra V, Wan Y. Recent advances in the exploration of therapeutic analogues of gramicidin S, an old but still potent antimicrobial peptide. *J Med Chem*. 2019;62(17):7603–17. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00156>
8. Pal S, Singh G, Singh S, Tripathi JK, Ghosh JK, Sinha S, et al. Tetrahydrofuran amino acid-containing gramicidin S analogues with improved biological profiles. *Org Biomol Chem*. 2015;13(24):6789–802. <https://doi.org/10.1039/c5ob00622h>

9. Tamaki M, Harada T, Fujinuma K, Takanashi K, Shindo M, Kimura M, et al. Polycationic gramicidin S analogues with both high antibiotic activity and very low hemolytic activity *Chem Pharm Bull*. 2012;60(9):1134–8. <https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00290>
10. Chen T, Wang Y, Yang Y, Yu K, Cao X, Su F, et al. Gramicidin inhibits human gastric cancer cell proliferation, cell cycle and induced apoptosis. *Biol Res*. 2019;52(1):57. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0264-1>
11. Wang RQ, Geng J, Sheng WJ, Liu XJ, Jiang M, Zhen YS. The ionophore antibiotic gramicidin A inhibits pancreatic cancer stem cells associated with CD47 down-regulation. *Cancer Cell Int*. 2019;19:145. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0862-6>
12. Raileanu M, Popescu A, Bacalum M. Antimicrobial peptides as new combination agents in cancer therapeutics: A promising protocol against HT-29 tumoral spheroids. *Int J Mol Sci*. 2020;21:6964. <https://doi.org/10.3390/ijms21186964>
13. Wijesinghe D, Arachchige MCM, Lu A, Reshetnyak YK, Andreev OA. pH dependent transfer of nano-pores into membrane of cancer cells to induce apoptosis. *Sci Rep*. 2013;3:3560. <https://doi.org/10.1038/srep03560>
14. Jafari A, Babajani A, Sarrami Forooshani R, Yazdani M, Rezaei-Tavirani M. Clinical applications and anticancer effects of antimicrobial peptides: From bench to bedside. *Front Oncol*. 2022;12:819563. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.819563>
15. Tornesello AL, Borrelli A, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules*. 2020;25(12):2850. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>
16. Ashrafuzzaman MD. The antimicrobial peptide gramicidin S enhances membrane adsorption and ion pore formation potency of chemotherapy drugs in lipid bilayers. *Membranes*. 2021;11(4):247. <https://doi.org/10.3390/membranes11040247>
17. Li H, Anuwongcharoen N, Malik A, Prachayasittikul V, Wikberg J, Nantasenamat C. Roles of d-Amino Acids on the Bioactivity of Host Defense Peptides. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7):1023. <https://doi.org/10.3390/ijms17071023>
18. Liang CC, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329–33. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
19. Hendrix DV, Ward DA, Barnhill MA. Effects of antibiotics on morphologic characteristics and migration of canine corneal epithelial cells in tissue culture. *Am J Vet Res*. 2001;62(10):1664–9. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1664>
20. Haoyang W-W, Xiao Q, Ye Z, Fu Y, Zhang D-W, Li J, et al. Gramicidin A-based unimolecular channel: cancer cell-targeting behavior and ion transport-induced apoptosis. *ChemComm*. 2021;57(9):1097–1100. <https://doi.org/10.1039/D0CC08073J>
21. Ali SS, Hajrah NH, Ayuob NN, Moshref SS, Abuzinadah OA. Morphological and morphometric study of cultured fibroblast from treated and untreated abnormal scar. *Saudi Med J*. 2010;31(8):874–81. PMID: 20714684
22. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453–65. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00120-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00120-x)
23. Cory G. Scratch-wound assay. *Methods Mol Biol*. 2011;769:25–30. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_2
24. Abraham T, Prenner EJ, Lewis RNAH, Mant CT, Keller S, Hodges RS, et al. Structure–activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: Aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(5):1420–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.12.019>
25. Mogi T, Ui H, Shiomi K, Ōmura S, Kita K. Gramicidin S identified as a potent inhibitor for cytochrome bd - type quinol oxidase. *FEBS Lett*. 2008;582(15):2299–302. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.031>
26. Mogi T, Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(23):3821–6. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0129-9>
27. Wenzel M, Rautenbach M, Vosloo JA, Siersma T, Aisenbrey CHM, Zaitseva E, et al. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. *mBio*. 2018;9(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00802-18>
28. Hackl EV, Berest VP, Gatash SV. Human erythrocytes resistance to haemolysis caused by polypeptide antibiotic gramicidin S. *Biophys Bull*. 2008;20(1):114–20. Available from: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/1577>
29. Berest V, Sotnikov A, Sichevska L. Lipid nanocarriers impede side effects of delivered antimicrobial peptide. 2021 IEEE 3rd Ukraine Conference on Electrical and Computer Engineering (UKRCON), Lviv, Ukraine, 2021, pp. 513–8. <https://doi.org/10.1109/UKRCON53503.2021.9575721>

30. Berest VP, Hackl EV, Gatash SV. Effect of the erythrocyte membrane state on the gramicidin S - induced haemolysis of erythrocytes. *J Pept Sci.* 2004;10(S2):237. <https://doi.org/10.1002/psc.618>
31. Kondejewski LH, Farmer SW, Wishart DS, Hancock REW, Hodges RS. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Int J Pept Protein Res.* 2009;47(6):460–6. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1996.tb01096.x>
32. Swierstra J, Kapoerchan V, Knijnenburg A, van Belkum A, Overhand M. Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(5):763–9. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2595-y>
33. Hackl E.V., Berest V.P., Gatash S.V. Effect of cholesterol content on gramicidin S-induced hemolysis of erythrocytes. *Int J Pept Res Ther.* 2012;18(2):163–70. <https://doi.org/10.1007/s10989-012-9289-9>
34. Son S, Moroney GJ, Butler PJ. β_1 -integrin-mediated adhesion is lipid-bilayer dependent. *Biophys J.* 2017;113(5):1080–92. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.010>
35. Li Y, Burrige K. Cell-cycle-dependent regulation of cell adhesions: adhering to the schedule. *BioEssays.* 2018;41(1):1800165. <https://doi.org/10.1002/bies.201800165>
36. Jones MC, Zha J, Humphries MJ. Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci.* 2019;374(1779):20180227. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0227>
37. Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giulitti S, Michielin F, Elvassore N, et al. A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell.* 2013;154(5):1047–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>
38. Advani AS, Chen AY, Babbitt CC. Human fibroblasts display a differential focal adhesion phenotype relative to chimpanzee. *Evol Med Public Health.* 2016;1:110–6. <https://doi.org/10.1093/emph/eow010>
39. Falck Minitis M, Mukwaya A, Gjørloff Wingren A. Digital holographic microscopy for non-invasive monitoring of cell cycle arrest in L929 cells. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e106546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106546>
40. Mikami K, Haseba T, Ohno Y. Ethanol induces transient arrest of cell division ($G_2 + M$ block) followed by G_0/G_1 block: dose effects of short- and longer-term ethanol exposure on cell cycle and cell functions. *Alcohol Alcohol.* 1997;32(2):145–52. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.alcalc.a008248>
41. Guo W, Qiu W, Ao X, Li W, He X, Ao L, et al. Low-concentration DMSO accelerates skin wound healing by Akt/mTOR-mediated cell proliferation and migration in diabetic mice. *Brit J Pharmacol.* 2020;177(14):3327–41. <https://doi.org/10.1111/bph.15052>
42. Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Kloska A, Piotrowska E, Narajczyk M, Gabig-Cimińska M. The role of dimethyl sulfoxide (DMSO) in gene expression modulation and glycosaminoglycan metabolism in lysosomal storage disorders on an example of mucopolysaccharidosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):304. <https://doi.org/10.3390/ijms20020304>
43. Rodríguez-Burford C, Oelschläger DK, Talley LI, Barnes MN, Partridge EE, Grizzle WE. The use of dimethylsulfoxide as a vehicle in cell culture experiments using ovarian carcinoma cell lines. *Biotechnic & Histochemistry.* 2003;78(1):17–21. <https://doi.org/10.1080/10520290312120004>
44. Isomursu A, Park K-Y, Hou J, Cheng B, Mathieu M, Shamsan GA, et al. Directed cell migration towards softer environments. *Nat Mat.* 2022;21(9):1081–90. <https://doi.org/10.1038/s41563-022-01294-2>
45. Cialdai F, Risaliti C, Monici M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:958381. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.958381>

THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE GRAMICIDIN S ALTERS PROLIFERATION AND INHIBITS ADHESION OF L929 CELL LINE FIBROBLASTS

N. M. Alabedalkarim¹, V. P. Berest², N. M. Moiseieva¹, G. A. Bozhok^{1,2}, T. P. Bondarenko^{1,2}

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NASU, 23 Pereyaslavska St., Kharkiv, 61016, Ukraine

²V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

e-mail: berest@karazin.ua

Submitted December 28, 2022; Revised June 20, 2023;

Accepted June 26, 2023

Background: Natural antimicrobial peptides are used in the fight against pathogens resistant to existing synthetic antibiotics. The non-specific mechanism of cytostatic action of antimicrobial peptides, in particular gramicidin S, against bacteria is also effective for damaging the cells of neoplasms. The existence of such a property in a registered antibiotic will indicate its antineoplastic potential and can be used to expand the spectrum of its therapeutic application.

Aim of work is to clarify the possible antitumor effect of the antimicrobial peptide gramicidin S.

Materials and Methods: Using the methods of confocal laser microscopy and light microscopy, the morphological and functional features of connective tissue cells under the influence of gramicidin S in the concentration range 0.5–50 $\mu\text{g/ml}$ were studied using L929 fibroblasts cell culture. The cell area, nucleus

area, and nucleus-to-cytoplasm ratio were determined. To study the migratory and proliferative activity of cells in vitro, the “scratch assay” was used, the confluency of the monolayer of cells was evaluated, morphometric studies were performed, and the relative area of the scratch was measured after 24, 48, and 72 hours.

Results: The lytic effect of gramicidin S in a concentration of 50 µg/ml on L929 cells was established, in concentrations of 0.5 µg/ml and 5.0 µg/ml, the antibiotic increases the synthetic activity of cells and stimulates the proliferation of fibroblasts in a monolayer. Cell anisomorphism is more pronounced in the presence of 5.0 µg/ml gramicidin S added to the culturing medium during monolayer formation, while a one-third of the cells in the sample form a population that is morphologically different from other cells in the culture. The addition of gramicidin S at non-lytic concentrations of 0.5 and 5.0 µg/ml to unattached fibroblasts reliably inhibits monolayer formation. Under the influence of 5.0 µg/ml gramicidin S, the rate of monolayer formation is low, even despite the significant content of cells with a high nuclear-cytoplasmic ratio. The kinetics of filling the cell monolayer defect using the “scratch assay” shows that GS in concentrations of 0.5 and 5.0 µg/ml can control the migratory and proliferative properties of L929 cells.

Conclusions: The effect of gramicidin S on the morphometric parameters of cells depends on the concentration of the peptide and the cell status in the culture. GS corrupts the adhesive properties of L929 fibroblasts in monolayer cell culture and the rate of cell monolayer formation. Cells at the stage of attachment and monolayer formation were most sensitive to non-lytic concentrations of GS. Inhibition of the adhesive properties of connective tissue cells by gramicidin S is a new non-canonical effect of a known antimicrobial drug, which may indicate the possibility of using gramicidin S as an anti-neoplasm agent.

KEY WORDS: gramicidin S; fibroblasts L929; proliferation; cell adhesion; cell migration.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається електронний варіант статті (MS Word 2007 і вище) українською або англійською мовою через сайт журналу <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk> з направленням установи і експертним висновком у вигляді відсканованих файлів.

Текст набирається на аркушах формату А4 через один інтервал. Використовується шрифт Times New Roman 12 pt, вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху – 3,5 см, знизу – 2 см. Математичні та хімічні символи вводяться до тексту статті за допомогою редактора MathType або Microsoft Equation. Рисунки, придатні до репродукції, у форматі *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки розміщувати в межах таблиці з прозорими зовнішніми границями у першому рядку, підпис та коментарі до рисунку – у другому рядку таблиці. Графіки будуються у програмних пакетах, призначених для обробки і візуалізації наукових даних: Origin, Mathcad тощо. Використання офісного пакету MS Excel для побудови графіків не допускається. Цифри і підписи на осях та надписах повинні мати шрифт 9 pt. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 10 pt. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1. Якщо стаття написана українською мовою, підписи до рисунків і таблиць дублюються англійською мовою.

На першій сторінці зверху на першому рядку в лівому верхньому куті наводиться УДК (курсив, 11 pt). Після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (великі літери, прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка набираються ініціали, прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку розміщуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота, адреса електронної пошти автора – контактної особи (курсив, 10 pt, вирівнювання по центру). Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число – цифрами, місяць – прописом, рік – цифрами (шрифт прямий, 10 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку вміщується дата прийняття статті до друку (заповнюється редколегією).

Після пропуску одного рядка вміщуються два реферати (українською та англійською мовами). Реферат мовою статті розміщується першим. Перед другим рефератом з нового рядка пишеться назви статі (великими літерами, шрифт прямий, 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), назви організацій та їх адреси (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Реферат повинен бути структурованим та містити наступні частини з заголовками: **Актуальність, Мета роботи, Матеріали і методи, Результати, Висновки**, які починаються з нового рядка. Слова “Реферат” і “Abstract” не пишуться. Заголовки структурних частин пишуться напівжирним шрифтом, після заголовка ставиться крапка. Текст реферату складає не менше 1800 та не більше 2000 фонетичних символів, тобто без проміжків між словами; прямий шрифт 10 pt. Реферати другою мовою також повинен мати обсяг не менше 1800 та не більше 2000 фонетичних символів. На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів, які розділяються між собою крапкою з комою (10 pt – перший реферат, 9 pt – другий та третій реферати). З початку рядка великими літерами, шрифт напівжирний, пишеться заголовок з двокрапкою “**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**”. Тексти рефератів і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку). Реферати розділяються одним пустим рядком.

Основний текст статті наводиться після пропуску одного рядка шрифтом Times New Roman (Cyr), 12 pt. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов'язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ, ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ, МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються, літери великі, напівжирні, вирівнювання по центру. При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої літери і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру. Розділи або підрозділи розділяються одним пустим рядком. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться. У кінці тексту статті після пропуску одного рядка у розділі **ПОДЯКА** зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту. Потім розміщується розділ **КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ**, у якому автори декларують наявність фінансових або інших конфліктів інтересів, які могли вплинути на результати, інтерпретацію та висновки дослідження. Якщо немає конфлікту інтересів, так і потрібно заявити: «Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів». Потім розміщується розділ **Authors' ORCID ID**, у якому автори вказують адреси своїх профілів ORCID.

Літературні посилання нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи, підручники та навчальні посібники. Список літератури (шрифт 10 pt.) розміщується за основним текстом статті, виділяється як розділ **REFERENCES** і оформлюється згідно з міжнародним стилем оформлення списку наукових публікацій **Vancouver**. Приклади оформлення бібліографічних посилань можна подивитись на сайті журналу у розділі «Керівництво для авторів»: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>.

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться!

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Electronic files of the contributions (created in MS Word 2007 and later versions) written in English or Ukrainian, scans of the expert inference directive and directive from the author's institution should be sent to the Editorial Office online via the website <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>.

A manuscript should be typed in single spacing on A4 paper. Use the MS Word with following options: 12 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2.5 cm, the upper margin should be 3.5 cm, and bottom one should be 2 cm. Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means (MathType or Microsoft Equation). Figures should be computer-generated in software packages intended for processing and visualization of scientific data: Origin, Mathcad, etc. The use of the MS Office Excel is not recommended. Use computer printed symbols for axes labeling. Insert prepared images into an MS Word file as files in *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png format within the area of the page specified above. We recommend the following layout: images are placed in the first row of the table with transparent outer borders, legends and comments to figures are placed in the second row of the table. The font size of figure legends should be 9 points. Formulae, tables, figures should be numbered consecutively using Arabic numerals, e.g. (1), Table 1, Fig 1. If the article is written in Ukrainian, captions to figures and tables are duplicated in English.

Insert UDC in the first line on the left of a first page (11 pt, Italic). Leave one line blank. Place the title of the paper in capital letters (12 pt, bold, centered) on the next line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt, bold, centered). On the next line type the authors' affiliation and postal addresses of the institution where the actual work was done, including an e-mail address of the corresponding author (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission: day — in numbers, month — in words, year — in numbers (straight font, 10 pt, centered). Then, place the date of the paper submission (to be filled by editor).

After one blank line place two abstracts of the paper (written in Ukrainian and English). The first abstract should be written in the language of the manuscript. On the next line provide the second abstract (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered). Above the second abstract place the titles of the paper in the second language (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered), then — initials and surnames of the authors (straight font, 10 pt, bold, centered), and finally — the authors' affiliation names and addresses (9 pt, Italic, centered), every time starting from a new line. The abstract should be structured and consist of the following parts with headings: **Background, Objectives, Materials and Methods, Results, Conclusions**, each placed on a new line. The words "Резюме" and "Abstract" should be omitted. The headers of structural parts are written in bold letters, putting a dot after the header. The two abstracts of the paper should contain not less than 1,800 and not more than 2,000 phonetic symbols (i.e., without taking into account the spacing between words); straight font, 10 pt. On the next line type 5-8 key words, separated by a semicolon (10 pt — first abstract, 9 pt — second and third abstracts). Next, the header "**KEY WORDS:**" should be typed in bold capital letters at the beginning of the line. The texts of the abstracts and key words should be indented 0.5 cm from the left and right margins. The abstracts should be separated by a blank line.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper with following options: Times New Roman font, 12 pt, text justified. The first line of each paragraph should be indented 0.75 cm from the left margin. Each manuscript should contain the following elements: an introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS**. For theoretical less specified text organization is envisaged, e.g., instead of section **MATERIALS AND METHODS**, the sections **PROBLEM FORMULATION** or **MODEL** are recommended, etc. The sections are not numbered, capital letters, bold, centered. Sections may be subdivided into subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after each section or subsection. A dot should be omitted after headings of sections and subsections. Names of the foundations and grant numbers should be included in the section **ACKNOWLEDGMENTS** at the end of the text after one blank line. The next section should be **CONFLICT OF INTEREST** in which you should declare financial or any other conflict of interest. If there is no conflict of interest, you can state: "The authors declare that there is no conflict of interest." The next section should be **Authors' ORCID ID** in which you should include ORCID internet addresses of all authors.

References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers, textbooks and tutorials are prohibited. List of references (10 pt) should be given at the end of the manuscript as a separate section **REFERENCES**, formatted according to the **Vancouver** style for scientific publications.

The examples for reference formats are given on the journal's website in the "Author Guidelines": <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>.

Manuscripts that do not meet the requirement mentioned above will not be considered for publication!

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 49

Збірник наукових праць

Укр. та англ. мовами.

Комп’ютерне верстання к.ф.-м.н. Горобченко О. О.

Підписано до друку 03.07.2023. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 5,06. Обл.-вид. арк. 5,88. Наклад 50 пр.

61022, Харків, майдан Свободи, 4
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Надруковано: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна
61022, Харків, майдан Свободи, 4, тел. +38-057-705-24-32
Свідоцтво суб’єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.09