

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Біофізичний Вісник

2015

Biophysical Bulletin

2015

ISSN 2075-3810

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

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

Біофізичний Вісник Biophysical Bulletin

Випуск 34 (2) Issue

Заснований 1998 р.

Founded in 1998

Харків 2015 Kharkiv

Журнал публікує статті, короткі повідомлення та огляди, які містять оригінальні результати вирішення фізико-математичних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами експериментальної і теоретичної фізики та математичного моделювання.

Для науковців, викладачів, аспірантів, студентів, що працюють у галузі біофізики, медичної фізики та суміжних областях.

Журнал є фаховим виданням у галузі фізико-математичних та біологічних наук (Наказ МОН України № 1328 від 21.12.2015 р.).

The journal publishes articles, short communications and reviews that contain original results of solution of physical and mathematical problems corresponding to biological systems of various levels of organization by using the methods of experimental and theoretical physics and mathematical modeling.

The journal is an occupational publication in a field of biology, physics and mathematics (The Decree N 1328 of MES of Ukraine of 21.12.2015).

Затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна (протокол № 14 від 28 грудня 2015 р.).

Редакційна колегія:

головний редактор -

Горбенко Г.П. - д.ф.-м.н., професор, ХНУ ім. В.Н.Каразіна

заступник головного редактора -

Катрич В.О. - д.ф.-м.н., проф., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Баранник Є.О. - д.ф.-м.н., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Бондаренко В.А. - д.б.н., проф., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Делігеоргієв Т. - проф.,

Софійський університет, Болгарія

Доран О. – проф., Університет Західної Англії, Бристоль, Великобританія

Карачевцев В.О. - д.ф.-м.н., проф. ФТІНТ НАНУ

Кнігавко В.Г. - д.б.н., проф., ХНМУ

Косевич М.В. - д.ф.-м.н. ФТІНТ НАНУ

Малєєв В.Я. - д.ф.-м.н., професор., ІРЕ НАНУ

Мартиненко О.В. - д.ф.-м.н., проф., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Осецький О.І. - д.ф.-м.н., проф. ІПКіК НАНУ

Перський Є.Е. - д.б.н., проф., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Семенов М.О. - д.ф.-м.н., проф., ІРЕ НАНУ

Сорокін В.О. - д.ф.-м.н., проф., ФТІНТ НАНУ

Толсторуков М. - к.ф.-м.н., Гарвардський університет, США

Шестопалова Г.В. - д.ф.-м.н., ІРЕ НАНУ

відповідальний секретар -

Берест В.П. - к.ф.-м.н., доц., ХНУ ім. В.Н.Каразіна

Технічна група: Горобченко О.О., Жигалова Н.М.

Technical Board: O.O. Gorobchenko, N.M. Zhigalova

Адреса редакційної колегії:

кафедра молекулярної і медичної біофізики
факультет радіофізики, біомедичної електроніки та
комп'ютерних систем

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

тел. / phone: +38 057 7075576

e-mail: biofiz-visnyk@karazin.ua

<http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

Address:

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

факс / fax: +38 057 7544746

Editorial Board:

Editor-in-Chief -

G.P. Gorbenko – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

Vice Editor-in-Chief -

V.O. Katrych – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

Ye.O. Barannik – Dr.Sci., V.N.Karazin KhNU

V.A. Bondarenko – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

T. Deligeorgiev – Professor,

University of Sofia, Bulgaria

O. Doran - Professor, University of West of England,
Bristol, Great Britain

V.A. Karachevtsev – Dr.Sci., Prof., ILTPI NASU

V.G. Knigavko – Dr.Sci., Prof., KhNMU

M.V. Kosevich – Dr.Sci., ILTPI NASU

V.Ya. Maleev – Dr. Sci., Prof., IRE NASU

A.V. Martynenko – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

O.I. Osetskiy – Dr.Sci., Prof., IPC&C NASU

Ye.Ye. Perskiy – Dr.Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

M.O. Semenov – Dr.Sci., Prof., IRE NASU

V.O. Sorokin – Dr.Sci., Prof., ILTPI NASU

M. Tolstorukov - Ph.D., Harvard Medical School,
USA

A.V. Shestopalova – Dr.Sci., IRE NASU

Executive Secretary -

V.P. Berest - Ph.D., Associate Prof., V.N.Karazin KhNU

Статті пройшли внутрішнє та зовнішнє рецензування.

Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 11007 від 17.02.2006

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, V.A. Pashynska, M.V. Kosevich, A.O. Sadchenko, D.N. Tishko, T.V. Tishko, V.P. Titar, L.N. Lisetski**
Intermolecular interactions of decamethoxinum and acetylsalicylic acid in systems of various complexity levels 5
- Ю. Н. Близнюк, Д. А. Песина, Д. М. Глибицкий, М. А. Семёнов, А. В. Шестопалова**
ИК спектроскопическое и квантово-химическое проявление протонирования изоаллоксазинового кольца флавин-моноклеотида 16
- А.С. Хребтова, Н.А. Гладковская, Е.Г. Березняк, Е.В. Духопельников, А.В. Фомин, А.В. Зинченко**
Влияние двух типов связывания лигандов с ДНК на параметры перехода спираль – клубок в полинуклеотидах 24

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

- А.Т. Ходько**
Образование метастабильных жидких фаз в изотоническом растворе натрия хлорида при охлаждении 34

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- Н.О. Боднарчук, Н.П. Гарасим, Л.І. Петрух, Д.І. Санагурський**
Порівняльний та дисперсійний аналіз активності глутатіонзалежних ферментів у зародках в'юна *Misgurnus fossilis L.* за впливу флуоренізиду 43

ХРОНІКА

- Памяти Бориса Григорьевича Емца 52

Шановні автори, будь ласка, посилайтесь на статті з цього журналу таким чином:

1. Автор І.П. Назва статті / І.П. Автор // Біофізичний вісник. – 2015. – Вип. 2 (34). – С. 80-86.
2. Lastname N.M. Title / N.M. Lastname // Biofiz. visn. – 2015. – V. 2 (34). – P. 80-86.

CONTENTS**MOLECULAR BIOPHYSICS**

- O.V. Vashchenko, N.A. Kasian, V.A. Pashynska, M.V. Kosevich,
A.O. Sadchenko, D.N. Tishko, T.V. Tishko, V.P. Titar, L.N. Lisetski** 5
Intermolecular interactions of decamethoxinum and acetylsalicylic acid in systems of various complexity levels
- Iu. N. Blyzniuk, D. A. Pesina, D. M. Glibitsky, M. A. Semenov,
A. V. Shestopalova** 16
IR spectroscopic and quantum-chemical manifestation of flavin mononucleotide's isoalloxazine ring protonation
- A.S. Khrebtova, N.A. Gladkovskaya, E.G. Bereznyak, E.V. Dukhopelnikov,
A.V. Fomin, A.V. Zinchenko** 24
The effect of two binding types on parameters of helix – coil transition in polynucleotides

ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS

- A.T. Khodko** 34
Formation of metastable liquid phases in the isotonic solution of sodium chloride during cooling

CELL BIOPHYSICS

- N.O. Bodnarchuk, N.P. Harasym L.I. Petrukh, D.I. Sanagurski** 43
Comparative and variance analysis of activity of glutation dependent enzymes in loach *Misgurnus fossilis L.* embryos under the influence of flurenizyd

CHRONICLE

- In memory of Boris Grygorovych Emets 52

УДК 577.352:615.28

INTERMOLECULAR INTERACTIONS OF DECAMETHOXINUM AND ACETYLSALICYLIC ACID IN SYSTEMS OF VARIOUS COMPLEXITY LEVELS**O.V. Vashchenko¹, N.A. Kasian¹, V.A. Pashynska², M.V. Kosevich²,
A.O. Sadchenko¹, D.N. Tishko³, T.V. Tishko³, V.P. Titar³, L.N. Lisetski¹**¹*Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine,
60, Nauky ave., 61001 Kharkov, Ukraine*²*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of
Ukraine, 47, Nauky ave., 61103, Kharkov, Ukraine*³*V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svoboda sq., 61022, Kharkov, Ukraine
e-mail: olga_v@isma.kharkov.ua*

Submitted December 2, 2015

Accepted December 17, 2015

Intermolecular interactions between decamethoxinum (DEC) and acetylsalicylic acid (ASA) have been studied in the phospholipid-containing systems of escalating complexity levels. The host media for these substances were solvents, *L*- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) membranes, and samples of human erythrocytes. Peculiar effects caused by DEC-ASA interaction have been observed in each system using appropriate techniques: (a) DEC-ASA non-covalent complexes formation in DPPC-containing systems were revealed by mass spectrometry with electrospray ionization; (b) joint DEC-ASA action on DPPC model membranes led to increasing of membrane melting temperature T_m , whereas individual drugs caused pronounced T_m decreasing, which was demonstrated by differential scanning calorimetry; (c) deceleration of DEC-induced haemolysis of erythrocytes under joint DEC-ASA application was observed by optical microscopy.

Key words: intermolecular interactions, noncovalent complexes, decamethoxinum, acetylsalicylic acid, model lipid membranes, erythrocytes.

МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЕКАМЕТОКСИНА И АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В СИСТЕМАХ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ СЛОЖНОСТИ**О.В. Ващенко¹, Н.А. Касян¹, В.А. Пашинская², М.В. Косевич², А.О. Садченко¹,
Д.Н. Тишко³, Т.В. Тишко³, В.П. Титарь³, Л.Н. Лисецкий¹**¹*Институт сцинтилляционных материалов НТК «Институт монокристаллов НАН Украины»,
пр. Науки, 60, Харьков, 61001, Украина*²*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина, пр. Науки, 47, Харьков, 61103, Украина*³*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61022, Украина*

Межмолекулярные взаимодействия между декаметоксином (ДЕК) и ацетилсалициловой кислотой (АСК) изучались в фосфолипид-содержащих системах различного уровня сложности: растворах, модельных фосфолипидных мембранах и образцах эритроцитов человека. В каждой системе соответствующими экспериментальными методами были зарегистрированы специфические эффекты, обусловленные взаимодействием ДЕК-АСК: а) методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением зарегистрировано образование нековалентных комплексов ДЕК-АСК в трёхкомпонентном растворе, содержащем также *L*- α -дипальмитоилфосфатидилохлин (ДПФХ); б) в модельных мембранах ДПФХ методом дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что совместное действие ДЕК и АСК приводит к повышению температуры плавления мембраны T_m , тогда как индивидуальное действие каждого препарата приводит к снижению T_m ; в) с помощью оптической микроскопии показано замедление ДЕК-индуцированного гемолиза эритроцитов при совместном введении ДЕК и АСК.

Ключевые слова: межмолекулярные взаимодействия, нековалентные комплексы, декаметоксин, ацетилсалициловая кислота, модельные липидные мембраны, эритроциты.

МІЖМОЛЕКУЛЯРНІ ВЗАЄМОДІЇ ДЕКАМЕТОКСИНУ ТА АЦЕТИЛСАЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ У СИСТЕМАХ РІЗНОГО РІВНЯ СКЛАДНОСТІ**О.В. Ващенко¹, Н.О. Касян¹, В.А. Пашинська², М.В. Косевич², А.О. Садченко¹,
Д.М. Тишко³, Т.В. Тишко³, В.П. Титарь³, Л.М. Лисецький¹**¹*Інститут сцинтиляційних матеріалів НТК «Інститут монокристалів НАН України»,
пр. Науки, 60, Харків, 61001, Україна*

²Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна, пр. Науки, 47, Харків, 61103, Україна

³Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Свободи, 4, Харків, 61022, Україна

Міжмолекулярні взаємодії між декаметоксином (ДЕК) та ацетилсаліциловою кислотою (АСК) вивчались у фосфоліпід-вмісних системах різного рівня складності: розчинах, модельних фосфоліпідних мембранах та зразках еритроцитів людини. У кожній із систем відповідними експериментальними методами були зареєстровані специфічні ефекти, обумовлені взаємодією ДЕК-АСК: а) методом мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням зареєстровано утворення нековалентних комплексів ДЕК-АСК у трьохкомпонентному розчині із вмістом *L*-діпальмітоїлфосфатидилхоліну (ДПФХ); б) в модельних мембранах ДПФХ методом диференціальної скануючої калориметрії було показано, що сумісна дія ДЕК та АСК призводить до підвищення температури топлення мембрани T_m , тоді як індивідуальна дія кожного препарату призводить до зниження T_m ; в) за допомогою оптичної мікроскопії показано уповільнення ДЕК-індукованого гемолізу еритроцитів при сумісному уведенні ДЕК та АСК.

Ключові слова: міжмолекулярні взаємодії, нековалентні комплекси, декаметоксин, ацетилсаліцилова кислота, модельні ліпідні мембрани, еритроцити.

To clear up the action mechanism of a biologically active agent, its effects should be tested in systems of different complexity level, ranging from its intermolecular interactions with presumed molecular targets to its effects on model biomimetic systems and biological objects. Numerous studies of individual drugs effects in model systems have been reported (e.g., [1-6]). A novel step is related to studies of the combined drugs action [7-10], because joint application of drugs is expected to modify their inherent effects. Indeed, due to intermolecular interactions of different biologically active agents, their contributions could be non-additive. In our previous studies, some effects of joint membranotropic action were found in model systems [10-12].

In the present study, we consider possibilities and consequences of noncovalent intermolecular interaction of a pair of drugs of antiseptic and anti-inflammation action, namely, decamethoxinum (DEC) and acetylsalicylic acid (ASA), which potentially could be used simultaneously during treatment of throat infection.

Alongside the mechanisms of drugs action on molecular targets in microbial or human cells, an important aspect is the drug-membrane interaction which could essentially condition the drugs pharmacokinetics. In the present work, we focused on a particular mechanism connected with the effects of drugs on biomembranes under their individual and joint action.

Antimicrobial drug DEC is an amphiphilic substance that can be considered as a membranotropic compound. The main mechanism of DEC action is related to damaging of the membranes of microbial cells [11, 13-18].

ASA, known as aspirin, is a multifunctional drug with anti-inflammatory, antipyretic and analgetic activity [19]. Its fluidizing effect upon model membranes was reported in [20-24].

In the present work, joint DEC-ASA membranotropic action was studied in phospholipid-containing media of escalating complexity, namely, solutions (physico-chemical level), model lipid membranes (biophysical level), and membranes of native cells (biomedical level). The aim of this approach is to shed light on the effects and mechanisms of joint drugs action in biomembranes and to bridge the gap between intermolecular interactions of individual drug molecules and their effects on the native cells.

To carry out the above-stated chain of studies, appropriate experimental techniques were applied. Such, an efficient tool for detection of eventual formation of stable non-covalent intermolecular complexes between the drugs and between each drug and DPPC is mass spectrometry with electrospray ionization (ESI) [25, 32-35]. Differential scanning calorimetry (DSC) gives information on thermodynamic parameters of the membranotropic drugs action at the level of model phospholipid membranes [2-5]. Digital holographic interference microscopy (DHIM) [29-31] is suitable for monitoring of morphology of erythrocyte blood

cells treated by the drugs. The eventual drug-induced haemolysis of erythrocytes was observed by optical microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Materials

L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) was purchased from Alexis Biochemicals (Switzerland) and used without further purification. Acetylsalicylic acid (ASA) was obtained from the State Scientific Centre of Medications (Kharkov, Ukraine). Decamethoxinum (1,10-decamethylene-bis[N,N-dimethyl-menthoxy carbonylmethyl] ammonium dichloride, DEC) was produced by Biolek (Ukraine). Bidistilled water, purified methanol and physiological saline solution (PSS) with osmolarity of 308 mmol/l («Niko», Ukraine) were used for samples preparation.

Human blood for the samples used in microscopic studies was collected from fingertips of healthy donors (4 authors of the present work) with their informal consent by standard clinical procedure. The blood was diluted by 0.1 % w/w solutions of the studied drugs in PSS, and by pure PSS for reference.

Mass-spectrometry

Electrospray ionization (ESI) mass spectrometry data were obtained in the positive ion mode using a triple quadrupole (QqQ) Micromass Quattro Micro mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with 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, and the desolvation potential (cone voltage, CV) value of 10 V was used. The analyte solutions (20 μ L) were infused into the mass spectrometer at a constant flow rate of 0.2 mL/min of methanol solvent. ESI mass 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).

Stock solutions of DPPC, DEC and ASA (5 mM) in methanol were used for preparation of ternary DPPC-DEC-ASA mixture with 5:1:1 molar ratio. The excess of DPPC molecules in this system simulated quantitative predominance of phospholipids over drugs under physiological conditions of drug-membrane interactions. The mixtures were incubated at the room temperature for at least 10 minutes before the ESI analysis. The spraying procedure required dilution of the studied solutions by methanol to provide 250 μ M (or less) final concentration of the components. It was confirmed that utilization of methanol as a solvent provided high quality of the ESI mass spectra and did not disturb essentially the composition of intermolecular complexes formed in water solutions [25, 26].

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC studies were carried out using a Mettler DSC 1 calorimeter. DSC profiles were obtained in cooling and heating modes at 2 K/min. Coincidence of two or more DSC profiles obtained in repeated scans was accepted as an equilibrium criterion. Phase transition parameters of model lipid membranes were determined using “Mettler Star^e 11.00” software.

Model lipid membranes of hydrated DPPC (1:1 w/w) were prepared according to the procedure described in [27]. To obtain DPPC membranes with DEC and ASA, the drugs solutions in double-distilled water were used. The resulting drug(s) concentration in all the systems were 1 % w/w with respect to dry DPPC. A number of ternary (DPPC membrane-DEC-ASA) systems was prepared with DEC to ASA molar ratios 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, and 1:8. The samples quality was controlled by the correspondence of calorimetric parameters of undoped DPPC membrane to the literature data [28].

Digital holographic interference microscopy

Erythrocytes morphology studies were carried out using digital holographic interference microscope (DHIM) (Kharkov National University, Ukraine) [29].

For DHIM measurements, fresh donor's blood was mixed (1:3 v/v) with the drugs solutions in PSS or with pure PSS for reference. The procedure was performed directly on a glass slide. The samples were covered by a cover glass and examined just after preparation. Such method of samples preparation allowed us to observe separate erythrocytes in the field of view of the DHIM. Each drug(s) solution was probed with 8 to 10 fresh blood samples.

The prepared samples were placed into the DHIM for obtaining their real-time interferograms. The interferograms were digitally recorded and processed for obtaining 3D-images of the erythrocytes and for determination their sphericity coefficients as described by [30]. The sphericity coefficient $k = t_c/t_r$ is the ratio of the erythrocyte thickness at t_c to its thickness at half of its radius t_r (Fig. 1).

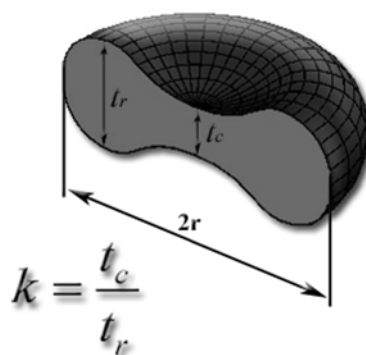


Fig. 1. Sphericity coefficient definition for erythrocytes.

Optical microscopy study of erythrocytes haemolysis

Erythrocytes haemolysis studies were carried out using a “Micromed Polar 3” optical microscope (Russia) equipped with digital camera “Canon EOS 1100D”. To determine the response of erythrocytes to the drugs introduction, 0.05 % w/w solutions of DEC or ASA were prepared in PSS. The solution of both drugs (DEC 0.05 % w/w, ASA 0.026 % w/w) with DEC to ASA molar ratio 1:2 was prepared. Fresh human blood samples (~0.50 μ l) were placed at a slide glass and mixed with the equal volume of the proper drug(s) solution with subsequent careful randomization on the glass surface during 10 s. The samples were covered with a cover glass and immediately placed onto the microscope stage. This moment was considered as a start of observation. Photos of the microscopic field were taken with 30 s intervals. Undamaged erythrocytes were clearly visible in the field of microscope, whereas the haemolysed ones (erythrocytes shadows) became almost invisible. The amount of visible (undamaged) cells was calculated using the microscopic photos. The initial amount of erythrocytes in each experiment was taken as 100 %. The average amount of erythrocytes (in percents) obtained in 3-4 independent experiments for each system was plotted as function of time. The Student's method was used to determine the confidence intervals for the reliability $P = 0.95$.

RESULTS AND DISCUSSION

Model systems in solution (mass spectrometry investigation)

Initially, joint action of DEC and ASA on the DPPC membrane was probed at molecular level. Non-covalent intermolecular interactions of DEC and ASA with DPPC were evidenced by the obtained data of ESI mass spectrometry which is an efficient tool for detection of stable non-covalent intermolecular complexes [25, 32-35].

Ternary system containing DPPC-DEC-ASA mixture (5:1:1 molar ratio) dissolved in methanol was probed. The ESI mass spectrum of the system obtained in the positive ion mode (Fig. 2) contained peaks of the individual mixture components and their intermolecular complexes formed in the system. Ions $\text{ASA}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 203.0), $2\text{ASA}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 383.1) were recorded for ASA. The intact dication $\text{Cat}_{\text{DEC}}^{2+}$ (m/z 311.3) and $\text{Cat}_{\text{DEC}}^{2+}\cdot\text{Cl}^-$ (m/z 657.5) cluster were observed for DEC. The peaks of $\text{DPPC}\cdot\text{H}^+$ (m/z 734.6), $\text{DPPC}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 756.6), and $2\text{DPPC}\cdot\text{H}^+$ (m/z 1468.1) ions corresponded to DPPC. Note that ionization of an analyte molecule by sodium cation attachment is characteristic of the ESI procedure and correlates with ion-molecule interactions under physiological conditions.

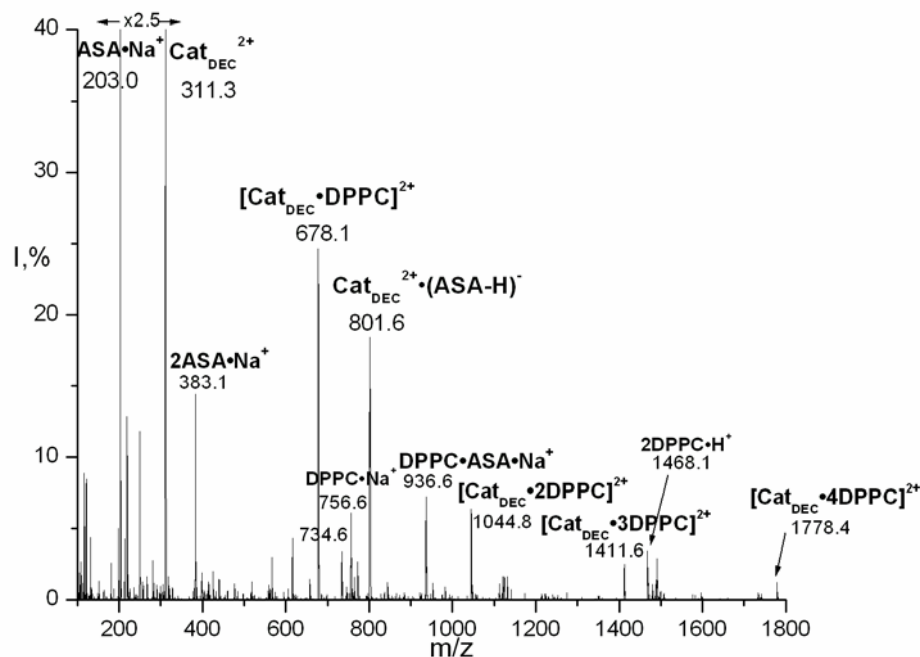


Fig. 2. ESI mass spectrum of DPPC-DEC-ASA (5:1:1 molar ratio) system.

The intermolecular complexes recorded in the mass spectrum reflected the complexity of specific non-covalent interactions in the model system. Firstly, supramolecular complexes of the DEC dication ($\text{Cat}_{\text{DEC}}^{2+}$) with the individual phospholipid molecule and phospholipid molecules associates containing up to 4 DPPC molecules $[\text{Cat}_{\text{DEC}}\cdot n\text{DPPC}]^{2+}$ ($n = 1 \div 4$) were formed similarly to the drug-phospholipid clusters in their binary systems [18]: $[\text{Cat}_{\text{DEC}}\cdot\text{DPPC}]^{2+}$ (m/z 678.1); $[\text{Cat}_{\text{DEC}}\cdot 2\text{DPPC}]^{2+}$ (m/z 1044.8); $[\text{Cat}_{\text{DEC}}\cdot 3\text{DPPC}]^{2+}$ (m/z 1411.6); $[\text{Cat}_{\text{DEC}}\cdot 4\text{DPPC}]^{2+}$ (m/z 1778.4). Secondly, ASA bound to single DPPC molecule similarly to its behaviour in the binary system forming the complex $\text{DPPC}\cdot\text{ASA}\cdot\text{Na}^+$ (m/z 936.6) [36]. Thirdly, dication-anion $\text{Cat}_{\text{DEC}}^{2+}\cdot(\text{ASA-H})^-$ complex (m/z 801.6) observed in the binary DEC-ASA mixtures by [36] was formed in the ternary system as well.

Formation of the stable pair intermolecular complexes of DEC and ASA with DPPC proved the possibility of interactions of these drugs with phospholipid membranes. The result on formation of $\text{Cat}_{\text{DEC}}^{2+}\cdot(\text{ASA-H})^-$ complex demonstrated the possibility of intermolecular interactions between the components of the basic and acidic drugs. The peaks set in the mass spectrum of the ternary DPPC-DEC-ASA system pointed to the existence of a competition between DEC and ASA for binding to DPPC molecules in the ternary system, since abundances of the peaks of $[\text{Cat}_{\text{DEC}}\cdot n\text{DPPC}]^{2+}$ complexes, $\text{Cat}_{\text{DEC}}^{2+}\cdot(\text{ASA-H})^-$ and $\text{DPPC}\cdot\text{ASA}\cdot\text{Na}^+$ associates were of comparable intensities. The competition of DEC and ASA for binding to DPPC molecules and the formation of dication-anion complexes, revealed

on the basis of the mass spectrometric data, can be considered as molecular mechanisms of the possible drugs activity modulation on their combined use.

Model lipid membranes (DSC investigation)

DSC-thermograms were obtained for model DPPC membranes containing DEC, ASA or DEC+ASA. Comparison of DSC data for binary (DPPC membrane-DEC, DPPC membrane-ASA) and ternary (DPPC membrane-DEC-ASA) systems allowed us to distinguish the effect resulting from the drugs complexes formation, described in the previous section.

For undoped DPPC membrane, the pre-transition temperature $T_p = 35.2 \pm 0.1$ °C and the main phase transition temperature $T_m = 41.8 \pm 0.1$ °C, which is in good agreement with literature data [28]. As one can see (Fig. 3), both DEC and ASA caused changes in the DSC profiles of DPPC membrane in qualitatively similar manner, i.e., the pre-transition disappeared, whereas the main phase transition peak smeared and shifted to lower temperatures. But joint DEC-ASA effect is just the opposite, resulting in T_m shifting to higher temperatures (Fig. 3). For all the systems studied, the enthalpy of the main phase transition remained almost unchanged within experimental error (data are not shown). Meanwhile, the half-width $\Delta T_m^{1/2}$ of the main phase transition exhibits clearly non-additive concentration dependence with maximum (Fig. 4, a). At the same time, the hysteresis h_m of the main phase transition shows less pronounced non-additivity (Fig. 4, b). Since these parameters are related to cooperativity of the melting process, one can conclude that DEC + ASA reduce the membrane cooperativity number more appreciably than DEC or ASA separately.

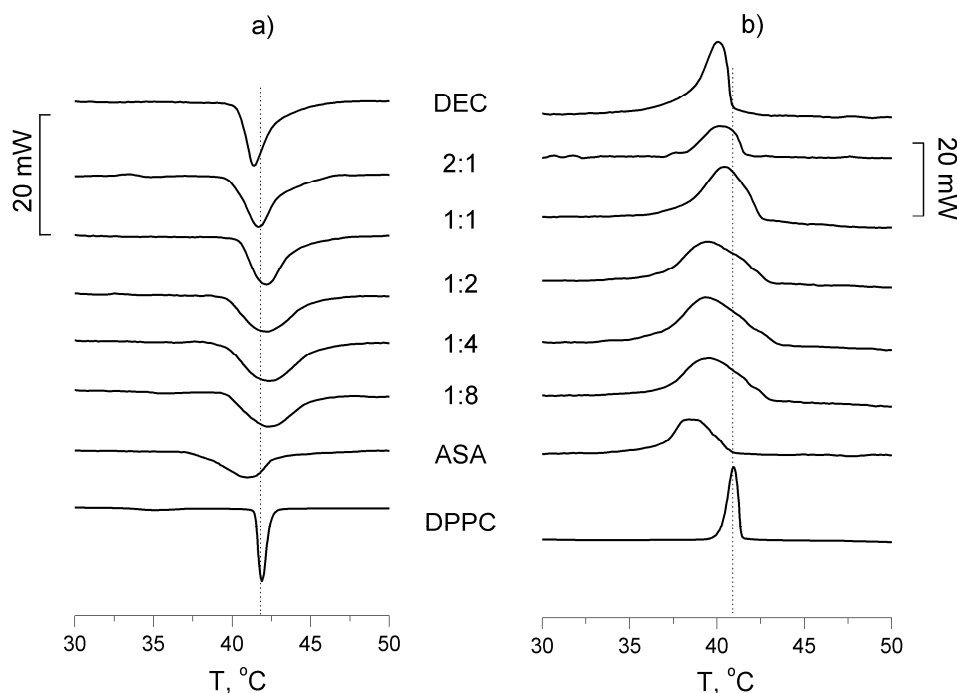


Fig. 3. DSC profiles of DPPC membrane -DEC-ASA systems: a – heating; b – cooling. Vertical dotted line marks T_m values of neat DPPC system. Designations: DPPC – neat lipid membrane; DEC – membrane containing DEC only; ASA – membrane containing ASA only; for ternary systems, DEC:ASA molar ratios are indicated.

For quantitative comparison of membranotropic effects, we used the membranotropic activity coefficient α , which is defined as T_m shift per unit weight concentration of drug(s). In Fig. 5, α is presented as a function of DEC molar fraction in the DEC+ASA mixture. One can observe qualitative difference between α values for individual and joint DEC+ASA action. Namely, α values of individual DEC and ASA are both negative, whereas α values of

DEC+ASA mixtures are generally positive. Such difference, according to [37], is a manifestation of DEC–ASA complexes formation described above (see Fig. 2).

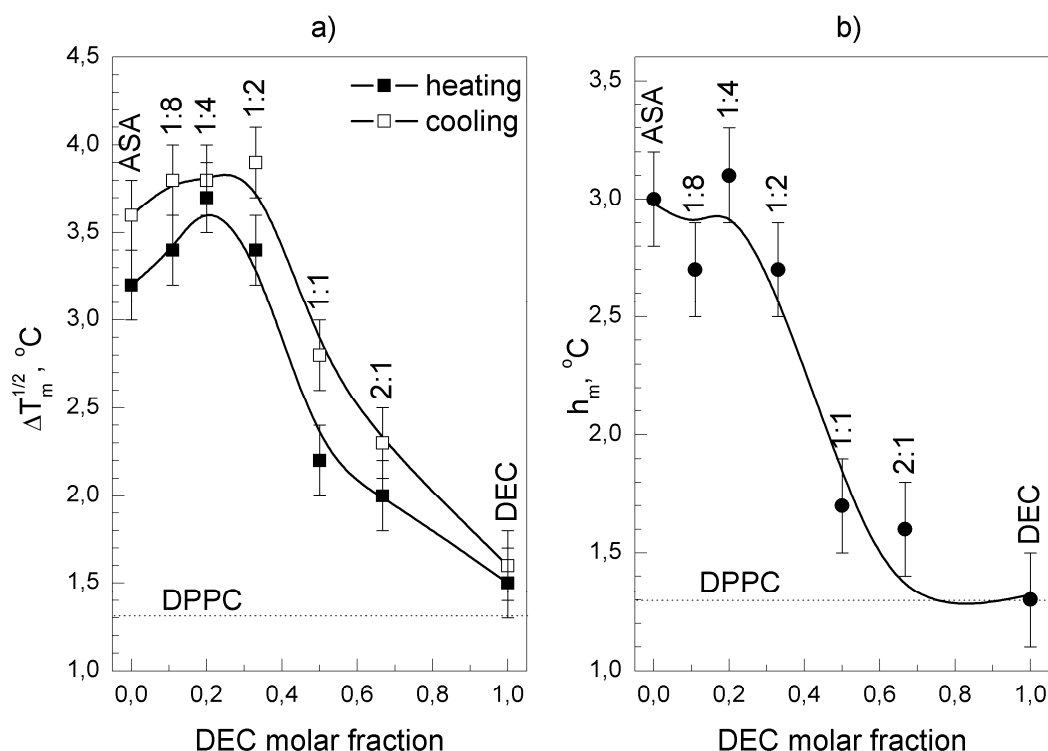


Fig. 4. Halfwidth (a) and hysteresis (b) of DPPC main phase transition as function of DEC molar fraction in the DEC+ASA mixture. Horizontal dotted lines mark corresponding values for neat DPPC membrane. Designations are the same as in Fig. 2. Standard deviations are given as error bars.

Neutralization of the positive charge of DEC dication by ASA anions in the complexes, apparently, plays an essential role in the change of membranotropic effect of the DEC–ASA complex relative to the individual drugs.

Negative α of DEC and ASA, as well as disappearance of the pretransition peak, indicates destabilization of the ordered L_β - and P_β -phases in favor of more fluid and disordered L_α -phase. It should be noted that the effects observed are in good agreement with membrane fluidizing ability of ASA [20, 21] and DEC [12]. Positive α indicates stabilization of the L_β -phase. Changes of α under joint DEC-ASA introduction occurs not only for the electroneutral DEC–ASA complex (1:2), but in the broad range of DEC: ASA molar ratios (Fig. 5).

It is believable that the described effects could have biomedical implication. The fluidizing effect of DEC could make a contribution to the mechanism of its antiseptic action causing microbial cell disintegration [13-15]. Meanwhile, joint application of DEC and ASA may reduce DEC pharmacological efficiency.

Erythrocytes (optical microscopy investigations)

The next step was to study the effects of DEC and ASA on erythrocytes. Studies at the level of native cell membranes are obviously more sophisticated due to variety of membrane components and substantially more complex structure of native membranes as compared to the model ones. Erythrocytes have no cell walls, and the lipid component of their membrane is directly exposed to the extracellular medium. Thus, they are widely used for studies of biomembranes [38, 39].

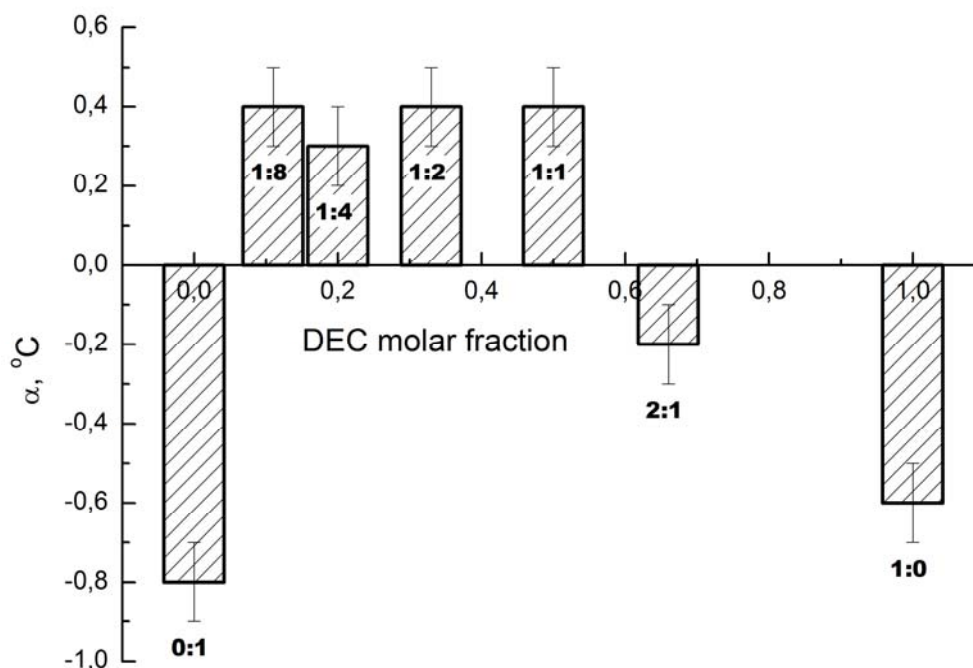


Fig. 5. Membranotropic activity coefficient of drugs as function of DEC molar fraction in the DEC+ASA mixture. Molar DEC to ASA ratios are marked as labels. Standard deviations are given as error bars.

The erythrocyte shape can be specified with sphericity coefficient k (see Fig. 1). The coefficient k is inversely proportional to the surface area of an erythrocyte, and can be considered as a characteristic of its morphological functionality [29]. For biconcave erythrocytes $k < 1$, for flat disk-shaped erythrocytes $k \sim 1$, and for spherical erythrocytes $k > 1$.

In our DHIM experiment, in the absence of drugs the biconcave erythrocyte shape was predominant; the mean k value was 0.45 ± 0.12 (Fig. 6, a). After addition of DEC or ASA solutions, the native erythrocytes morphology was changed, and the mean k value increased up to 1.1 ± 0.2 (Fig. 6 b, c). Such erythrocyte shape transformation is non-specific; it was previously reported for various substances (including drugs and cationic detergents) and external factors [30, 31, 40].

Also, there are distinctive features of DEC and ASA effects on erythrocytes. So, DEC induced instantaneous erythrocyte haemolysis at concentration above 0.05 % w/w (see Fig. 6, b), whereas in ASA-containing samples haemolysis was absent during observation time even under much higher concentrations (up to 1.5 % w/w), and echinocytosis was observed (see Fig. 6, c). The difference between DEC and ASA effects on erythrocytes could result from negative charge of the erythrocytes membrane surface. Indeed, binding of DEC dication to outer membrane surface is facilitated by this charge, whereas ASA anion binding becomes hindered, so ASA effect weakens. Generally, molecular mechanism of DEC-induced haemolysis should be a subject of thorough research.

Based on findings described above, DEC-induced haemolysis of erythrocytes was studied in more details. Kinetic of haemolysis under drug(s) action was monitored by calculation of the number of visible erythrocytes in the microscope field. Solutions of DEC, ASA and DEC+ASA 1:2 were used. This ratio was chosen basing on the DSC data presented above (see Fig. 5).

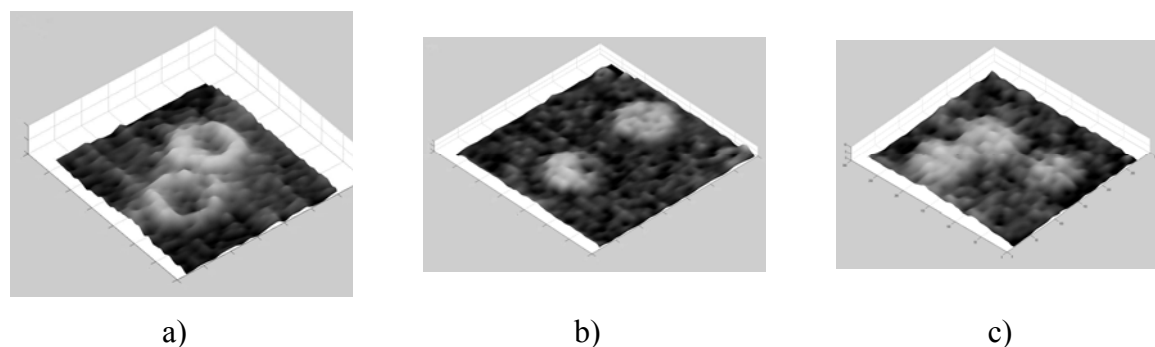


Fig. 6. DHIM images of erythrocytes in donor's blood sample (a) and erythrocytes in the presence of DEC (b) or ASA (c).

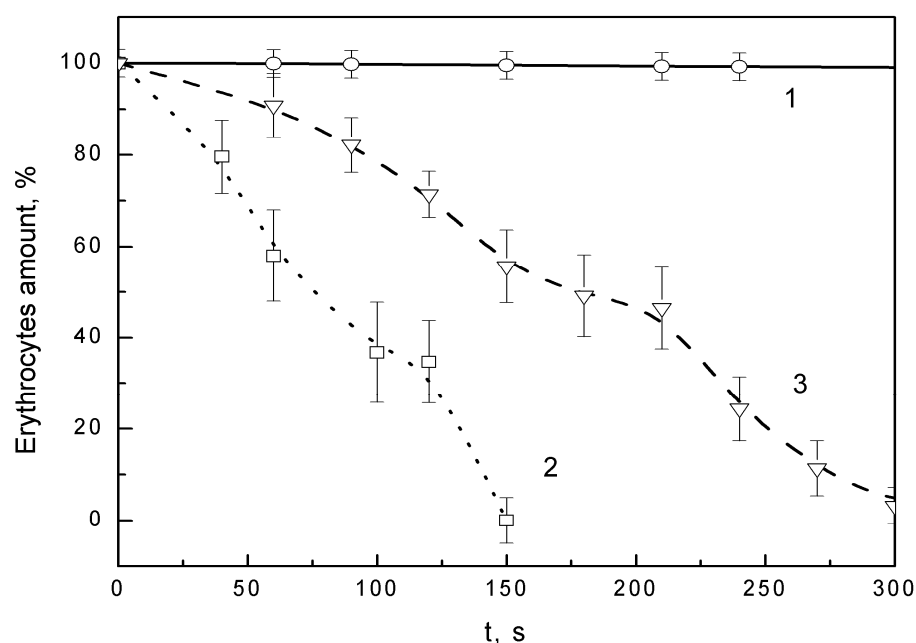


Fig. 7. Kinetic of erythrocytes haemolysis in the field of optical microscope in 0.05 % w/w solution of ASA (1), DEC (2) and of their mixture in molar ratio DEC to ASA 1 to 2 (3). The values of confidence intervals are given as error bars.

As one can see (Fig. 7), haemolysis goes rather quickly in DEC solutions, so in approximately 2 minutes the microscope field became virtually clear. On the contrary, haemolysis was practically absent in ASA solutions during 3 hours (time range is not shown completely in Fig. 7). Under joint DEC-ASA action, haemolysis deceleration was observed as compared to DEC-containing samples; the time of complete haemolysis became approximately 6 minutes. Thus, intermolecular interactions between DEC and ASA leads to deceleration of the DEC-induced erythrocytes haemolysis.

CONCLUSIONS

In phospholipid-containing systems of escalating complexity, various effects of joint DEC-ASA action were observed:

(a) In solutions containing DPPC, DEC and ASA probed by ESI mass spectrometry, the non-covalent DEC-ASA complexes formation was shown, as well as competition between the individual drugs for binding with the lipid component was registered;

(b) In model DPPC membranes, opposite individual and joint effects of DEC and ASA were revealed by DSC. While DEC and ASA individually caused pronounced T_m decreasing, their combined introduction led to T_m increasing;

(c) Being added to erythrocytes, both drugs caused erythrocyte spherocytosis, as revealed by DHIM technique. DEC induced erythrocyte haemolysis, which was decelerated by ASA under joint DEC-ASA application.

Thus, we have shown by different physical experimental techniques that formation of non-covalent complexes between two drugs could be a reason for their non-additive effects at supramolecular and cellular levels. Each of three systems probed can provide preliminary information on possible intermolecular interactions between different types of membranotropic agents prior to their biological testing. The used study approach is proposed as effective primary tool of investigation of drugs joint action prior to their pharmacological testing.

REFERENCES

1. Peelta C. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery / C. Peelta, A. Stine, V. Labhasetwar // *Mol. Pharm.* – 2009. – 6 (5). – P. 1264–1276.
2. Biomembrane models and drug-biomembrane interaction studies: involvement in design and development / R. Pignatello, T. Musumeci, L. Basile [et al.] // *J. Pharm. Bioallied Sci.* – 2011. – Vol. 3. – P. 4–14.
3. Seydel J.K. Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling. / J.K. Seydel, M. Wiese – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 002. – 2002. – 349 p.
4. Mavromoustacos T.M. The use of differential scanning calorimetry to study drug-membrane interactions / T.M. Mavromoustacos // *Methods Mol Biol.* – 2007. – Vol. 400. – P. 587-600.
5. Lucio M. Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry / M. Lucio, J.L.F.C. Lima, S. Reis // *Curr. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 17. – P. 1795-1809.
6. Le M.T. Biomimetic Model Membrane Systems Serve as Increasingly Valuable in Vitro Tools. In: *Advances in Biomimetics* (Ed. M. Cavrak) / M.T. Le, J.K. Litzenberger, E.J. Prenner – InTech, New-York. – 2011. – 532 pp.
7. Canaves J.M. Verapamil prevents the effects of daunomycin on the thermotropic phase transition of model lipid bilayers / J.M. Canaves, J.A. Ferragut, J.M. Gonzalez-Ros // *Biochem. J.* – 1991. – Vol. 279. – P. 413-418.
8. *Drug Interactions in Infectious Diseases* (Ed. S.C. Piscitelli, K.A. Rodvold), 2nd edition). – Humana Press, Totowa, NJ. – 2005. – 692 pp.
9. Probing the combined effect of flunitrazepam and lidocaine on the stability and organization of bilayer lipid membranes. A differential scanning calorimetry and dynamic light scattering study / B. Caruso, J.M. Sánchez, D.A. García [et al.] // *Cell Biochem Biophys.* – 2012. – Vol. 66. – P. 461-475.
10. Probing of the combined effect of bisquaternary ammonium antimicrobial agents and acetylsalicylic acid on model phospholipid membranes: differential scanning calorimetry and mass spectrometry studies / N.A. Kasian, V.A. Pashynska, O.V. Vashchenko [et al.] // *Mol. BioSyst.* – 2014. – Vol. 10. – P. 3155-3162.
11. Investigations of the formation of noncovalent complexes between antimicrobial agent ethonium with membrane phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry / V.A. Pashynska, M.V. Kosevich, A. Gomory, K. Vekey // *Mass-spectrometria.* – 2012. – Vol. 9, N 2. – P. 121-128.
12. Lyotropic mesophase of hydrated phospholipids as model medium for studies of antimicrobial agents activity / O. Vashchenko, V. Pashynska, M. Kosevich, [et al.] // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* – 2011. – V. 507. – P. 155-163.
13. Vievskij A.N. Cationic surfactants: new perspectives in medicine and biology. / A.N. Vievskij // *Tenside Surfactants, Deterg.* – 1997. – Vol. 34. – P. 18-21.
14. Denyer S.P. Mechanism of action of disinfectants / S.P. Denyer, G.S.A.B. Stewart // *Int. Biodeter. Biodeg.* – 1998. – Vol. 41. – P. 261-268.
15. Schreier S. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects / S. Schreier, S.V.P. Malheiros, E. de Paula // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1508. – P. 210-234.
16. Gilbert P. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet / P. Gilbert, L.E. Moor // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 99. – P. 703-715.
17. Mechanistic investigation of the interaction between bisquaternary antimicrobial agents and

phospholipids by liquid secondary ion mass spectrometry and differential scanning calorimetry / V.A. Pashinskaya, M.V. Kosevich, A. Gomory [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2002. – Vol. 16. – P. 1706-1713.

18. 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 / V.A. Pashynska, M.V. Kosevich, H. Van den Heuvel [et al.] // *Vistnyk of V.N. Karazin Kharkiv National University. Biophysical Bulletin.* – 2004. – Vol. 637, N 1-2. – P. 123-130.

19. Schrör K. *Acetylsalicylic acid.* – Wiley-Blackwell, Weinheim. – 2009. – 390 p.

20. Interaction of aspirin with DPPC in the lyotropic, DPPC-aspirin-H₂O/D₂O membrane / L. Panicker, V.K. Sharma, G. Datta [et al.] // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* – 1995. – Vol. 260. – P. 611-621.

21. Interaction of aspirin (acetylsalicylic acid) with lipid membranes / M.A. Barrett, S. Zheng, G. Roshankar [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7. – e34357.

22. Lichtenberger L.M. Association of phosphatidylcholine and NSAIDs as a novel strategy to reduce gastrointestinal toxicity. / L.M. Lichtenberger, M. Barron, U. Marathi // *Drugs of Today.* – 2009. – Vol. 45. – P. 877-890.

23. Development and characterization of aspirin-phospholipid complex for improved drug deliver / A. Semalty, M. Semalty, D. Singh [et al.] // *Int. Journ. Parhm. Sci. Nanotech.* – 2010. – Vol. 3. – P. 940-947.

24. Aspirin inhibits formation of cholesterol rafts in fluid lipid membranes / R.J. Alsop, L. Topozini, D. Marquardt [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* 2015 – Vol. 1848. – P. 805-812.

25. Are the electrospray mass spectra of proteins related to their aqueous solution chemistry? / R. Guevremont, K.W.M. Siu, J.C.Y. Le Blanc [et al.] // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 1992. – Vol. 3. – P. 216-224.

26. Mass spectrometric study and computer modeling of noncovalent interactions of cytosine with polyethylene glycol oligomers. / V.G. Zobnina, V.V. Chagovets, O.A. Boryak [et al.] // *Mass-spektrometria.* – 2014. – Vol. 16. – P. 97-106.

27. Effect of membranotropic agents on mono- and multilayers of dipalmitoylphosphatidylcholine. / L.N. Lisetski, O.V. Vashchenko, A.V. Tolmachev [et al.] // *Eur. Biophys. J.* – 2002. – Vol. 31. – P. 554-558.

28. Tristram-Nagle S. Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations, and interactions / S. Tristram-Nagle, J. F. Nagle // *Chem. Phys. Lipids.* – 2004. – Vol. 127. – P. 3-14.

29. Digital holographic interference microscopy in the study of the 3D morphology and functionality of human blood erythrocytes / T.V. Tishko, V.P. Titar, D.N. Tishko [et al.] // *Laser Physics.* – 2008. – Vol. 18. – P. 486-490.

30. Tishko T.V. Erythrocytes three-dimensional morphology by digital holographic interference microscopy / T.V. Tishko, V.P. Titar, D.N. Tishko // *Proc. of SPIE.* – 2008. – V. 7006. – P. 700600-700600-9.

31. *Holographic Microscopy of Phase Microscopic Objects. Theory and Practice* / Tishko T.V., Tishko D.N., Titar V.P. London-Singapore: World Scientific. – 2011. – 97 p.

32. *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications.* (Ed. R. Cole). 2nd edition. – Hoboken, New Jersey, – 2010. – 1008 pp.

33. Loo J. A. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying non-covalent macromolecular complexes / J. A. Loo // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2000. – Vol. 200, N 1-3. – P. 175-186.

34. Wyttenbach Th. Intermolecular interactions in biomolecular systems examined by mass spectrometry / Th. Wyttenbach, M. T. Bowers // *Ann. Rev. Phys. Chem.* – 2007. – Vol. 58. – P. 511-533.

35. McCullough B.J. Using electrospray ionisation mass spectrometry to study non-covalent interactions / B.J. McCullough, S.J. Gaskell // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* – 2009. – Vol. 12, N 2. – P. 203-211.

36. Model mass spectrometric study of competitive interactions of antimicrobial bisquaternary ammonium drugs and acetylsalicylic acid with membrane phospholipids / V.A. Pashynska, M.V. Kosevich, A. Gomory [et al.] // *Biopolymers and Cell.* – 2013. – Vol. 29. – P. 157-162.

37. Fialkov Yu.Ya. *Physical Chemistry of Non-Aqueous Solutions* / Yu.Ya. Fialkov, A.N. Zhitomirskij, Yu. A. Tarasenko – Leningrad: Khimija. – 1973. – 376 p.

38. Ciana A. Detergent-resistant membranes in human erythrocytes and their connection to the membrane-skeleton / A. Ciana, C. Balduini, G. Minetti. // *J. Biosci.* – 2005. – Vol. 30, N 3. – P. 317-328.

39. Mohandas N. Red cell membrane: past, present, and future / N. Mohandas, P.G. Gallagher // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, N 10. – P. 3939-3948.

40. Wong P. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc – sphere transformations of the erythrocyte / P. Wong // *J. Theor. Biol.* – 1999. – Vol. 6. – P. 343-361.

УДК 577.322

ИК СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ И КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ПРОТОНИРОВАНИЯ ИЗОАЛЛОКСАЗИНОВОГО КОЛЬЦА ФЛАВИН- МОНОНУКЛЕОТИДА

Ю. Н. Близнюк, Д. А. Песина, Д. М. Глибицкий, М. А. Семёнов, А. В. Шестопалова
Институт радиопластики и электроники им. А. Я. Усикова НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, Харьков, 61085, Украина

e-mail: julia-blyzniuk@yandex.ru

Поступила в редакцию 30 ноября 2015 года

Принята 11 декабря 2015 года

Флавін-мононуклеотид (FMN) являється протетическою групою численних оксидоредуктаз, виконують окислювально-відновні функції в клітинах. В реакції оборотного відновлення в коферменті задіяно ізоаллоксазинове кільце, яке може при відновленні приймати два електрони і два протони. Методом інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії в області поглинання $C=C$ і $C=N$ атомів ізоаллоксазинового кільця ($1450\text{--}1650\text{ см}^{-1}$) отримано спектри сухих плівок флавін-мононуклеотиду, вирощених з нейтральних ($pH=7,0$) і слабокислих ($pH=6,0$) розчинів. Виявлено високочастотні зсуви полос поглинання внутрішньокільцевих коливань у плівках, вирощених зі слабокислого ($pH=6,0$) розчину. Ці високочастотні зсуви було пояснено протонуванням по атомах азоту N_1 і N_5 ізоаллоксазинового кільця. Проведений в рамках теорії функціонала щільності (DFT) квантово-хімічний розрахунок показав, що на атомах N_1 і N_5 знаходяться значні негативні заряди, які зв'язують протони. Отримані квантово-хімічні дані про заряди на атомах ізоаллоксазинового кільця й порядки його зв'язків корелюють з частотними зсувами смуг поглинання протонуваних атомів внутрішньокільцевих коливань.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інфрачервона спектроскопія, флавін-мононуклеотид, протонування, квантово-хімічний розрахунок, атом азоту.

ІЧ СПЕКТРОСКОПІЧНИЙ ТА КВАНТОВО-ХІМІЧНИЙ ПРОЯВ ПРОТОНУВАННЯ ИЗОАЛЛОКСАЗИНОВОГО КІЛЬЦЯ ФЛАВИН-МОНОНУКЛЕОТИДУ

Ю. М. Близнюк, Д. О. Песина, Д. М. Глибицкий, М. О. Семенов, Г. В. Шестопалова
Институт радиопластики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна

Флавін-мононуклеотид (FMN) є протетичною групою численних оксидоредуктаз, що виконують окислювально-відновні функції в клітинах. В реакції оборотного відновлення в коферменті задіяно ізоаллоксазинове кільце, яке може при відновленні приймати два електрони і два протони. Методом інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії в області поглинання $C=C$ й $C=N$ атомів ізоаллоксазинового кільця ($1450\text{--}1650\text{ см}^{-1}$) було отримано спектри сухих плівок флавін-мононуклеотиду, вирощених з нейтральних ($pH=7,0$) і слабокислих ($pH=6,0$) розчинів. Виявлено високочастотні зсуви полос поглинання внутрішньокільцевих коливань у плівках, вирощених зі слабокислого ($pH=6,0$) розчину. Ці високочастотні зсуви було пояснено протонуванням по атомах азоту N_1 і N_5 ізоаллоксазинового кільця. Проведений в рамках теорії функціонала щільності (DFT) квантово-хімічний розрахунок показав, що на атомах N_1 і N_5 знаходяться значні негативні заряди. Отримані квантово-хімічні дані про заряди на атомах ізоаллоксазинового кільця й порядки його зв'язків корелюють з частотними зсувами смуг поглинання протонуваних атомів внутрішньокільцевих коливань.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інфрачервона спектроскопія, флавін-мононуклеотид, протонування, квантово-хімічний розрахунок, атом азоту.

IR SPECTROSCOPIC AND QUANTUM-CHEMICAL MANIFESTATION OF FLAVIN MONONUCLEOTIDE'S ISOALLOXAZINE RING PROTONATION

Iu. N. Blyzniuk, D. A. Pesina, D. M. Glibitsky, M. A. Semenov, A. V. Shestopalova
O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NAS of Ukraine, 12 Akad. Proskury Str., Kharkiv, 61085, Ukraine

Flavin mononucleotide (FMN) is the prosthetic group of many oxidoreductases performing redox function in cells. The coenzyme reversible reduction reaction involves isoalloxazine ring which may take

two electrons and two protons upon reduction. The spectra of dried films of flavin mononucleotide grown from neutral (pH=7,0) and weakly acidic (pH=6,0) solutions were obtained in absorption region of C=C, C=N atoms of isoalloxazine ring ($1450\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$) using infrared (IR) spectroscopic method. The high-frequency shifts of absorption bands of intra-ring vibrations in films grown from weakly acidic (pH=6,0) solution were found. These high-frequency shifts were explained by the protonation of N_1 and N_5 nitrogen atoms of the ring. The performed quantum-chemical calculation using the density functional theory (DFT) confirmed that the N_1 and N_5 atoms have significant negative charges. The obtained quantum-chemical data on the charges of the isoalloxazine ring atoms and its bond orders correlate with the frequency shifts of the absorption bands of protonated atoms of intra-ring vibrations.

KEYWORDS: infrared spectroscopy, flavin mononucleotide, protonation, quantum-chemical calculation, nitrogen atom.

Флавин-мононуклеотид (FMN) – аналог витамина B_2 – является простетической группой (коферментом) многочисленных оксидоредуктаз, выполняющих окислительно-восстановительные функции в клетках. Окисленная форма FMN представлена на рис. 1. В реакции обратимого восстановления в коферменте задействовано изоаллоксазиновое кольцо. Полагают, что при этом атомы водорода (протоны) присоединяются к двум атомам азота N_1 и N_5 кольца. При восстановлении происходит передача двух атомов водорода (двух протонов и двух электронов). Ранее сведения о протонировании по атомам N_1 и N_5 в кислых растворах получены при исследовании спектров FMN в области поглощения изоаллоксазинового кольца (230–500 нм) [1].

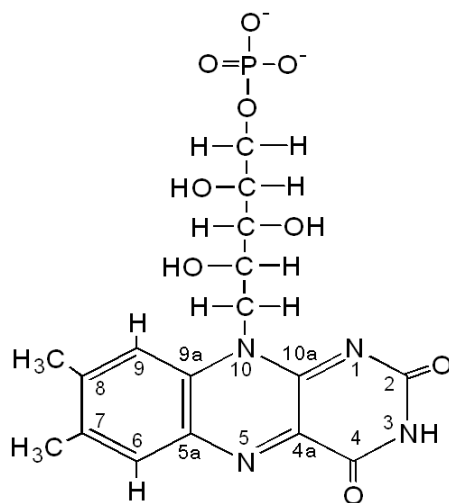


Рис. 1. Структурная формула окисленной формы флавин-мононуклеотида (FMN).

Прямые сведения о присоединении протонов к атомам N_1 и N_5 может дать инфракрасная (ИК) спектроскопия, поскольку в настоящее время выполнена достаточно надежная интерпретация полос поглощения внутрикольцевых колебаний с участием атомов азота N_1 и N_5 изоаллоксазинового кольца ИК спектров FMN [2, 3]. Дополнительные сведения о влиянии протонирования на внутрикольцевые колебания можно получить с помощью квантово-химических расчетов [4, 5].

В работе [4] исследование флавин-мононуклеотида, проведенное с помощью ИК спектроскопии многофотонной диссоциации (IRMPD) и DFT расчетов, показало, что FMN наиболее стабилен в виде O_2 - и N_1 -протонированного таутомера. Изучение физико-химических свойств люмифлавина (модельного соединения для рибофлавина) в растворах методом разрешенной по времени ИК спектроскопии (TRIR) и квантово-химическими расчетами (теории функционала плотности, DFT) показали, что

термодинамически выгодное положение для присоединения протона – это атом азота N₅ кольцевой системы флавина [5].

Целью работы было провести сравнительный анализ полос поглощения в области 1450-1600 см⁻¹, связанных с внутрикольцевыми колебаниями атомов C-C, C-N₁ и C-N₅ изоаллоксазинового кольца, в нейтральной и протонированной формах FMN. Поскольку в растворах на полосы поглощения FMN существенное влияние оказывает растворитель (H₂O), ИК спектры были получены для высушенных пленок FMN, выращенных из нейтральных (pH=7,0) и слабокислых (pH=6,0) водных растворов. С помощью квантово-химических расчетов были получены оптимизированные структуры нейтральной и протонированной форм FMN, анализ которых позволил установить влияние протонирования на распределение электронной плотности и изменение порядка связей внутрикольцевых колебаний изоаллоксазинового кольца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали флавин-мононуклеотид (7,8-диметилизо-аллоксазин • Na, рис. 1) фирмы «Fluka» без дополнительной очистки. Методика приготовления растворов FMN для ИК-спектроскопических исследований описана ранее [6].

ИК спектроскопия

ИК спектры записывали для пленок, выращенных из растворов FMN с pH=7,0 и pH=6,0. Обезвоженные до 0% относительной влажности (ОВ) пленки FMN были получены с помощью сушки вакуумом. Запись ИК-спектров FMN проводилась с помощью автоматического двухлучевого спектрофотометра UR-20 (Германия) с призмой NaCl. Техника обезвоживания, получения и обработки ИК спектров пленок FMN детально описана в работе [6].

Разложение ИК спектров

Для уточнения частот полос поглощения внутрикольцевых валентных C-C и C-N колебаний изоаллоксазинового кольца FMN проводили разложение ИК спектра по стандартной методике [7]. В качестве формы спектральных линий использовался псевдо-Фогтовский профиль (линейная комбинация профилей Гаусса и Лоренца). Оптимизацию параметров полос выполняли методом деформируемого многогранника [8].

Квантово-химическое моделирование

Для всех квантово-химических вычислений использовали программу Orca 2.9 [9]. Расчеты проводились в рамках теории функционала плотности (DFT) с применением функционала B3LYP [10, 11] в базисном наборе def2-SVP [12], используя также дополнительный базисный набор def2-SVP/J [13]. Для уменьшения времени вычислений использовали опцию RIJCOSX. Использование этих базисных наборов def2-SVP и опции RIJCOSX в сочетании с B3LYP позволяет соблюсти баланс точности расчетов и вычислительной эффективности. Соответствие найденных оптимизированных структур минимумам поверхностей потенциальных энергий подтверждено расчетами вторых производных энергии по координатам и отсутствием мнимых частот в расчетных колебательных спектрах. Заряды на атомах, воспроизводящие электростатический потенциал молекулы, были рассчитаны с использованием схемы Chelpg [14], а порядки связей – по Майеру [15].

Координаты атомов FMN были взяты из экспериментально определенной пространственной структуры молекулы (id 1fvp [16]), представленной в базе данных Protein Data Bank [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИК спектроскопическое проявление протонирования изоаллоксазинового кольца FMN

На рис. 2 представлен ИК спектр в области поглощения $1450-1600\text{ см}^{-1}$ сухой пленки FMN, выращенной из нейтрального ($\text{pH}=7,0$) раствора. Видно, что эта спектральная область состоит из трех не сильно перекрывающихся полос поглощения. С учетом разложения мы выделили самую сильную полосу при $\nu_1=1541\text{ см}^{-1}$ ($\pm 2\text{ см}^{-1}$), низкочастотную компоненту с максимумом при $\nu_2=1501\text{ см}^{-1}$ ($\pm 2\text{ см}^{-1}$) и высокочастотную полосу с максимумом при $\nu_3=1575\text{ см}^{-1}$ ($\pm 2\text{ см}^{-1}$).

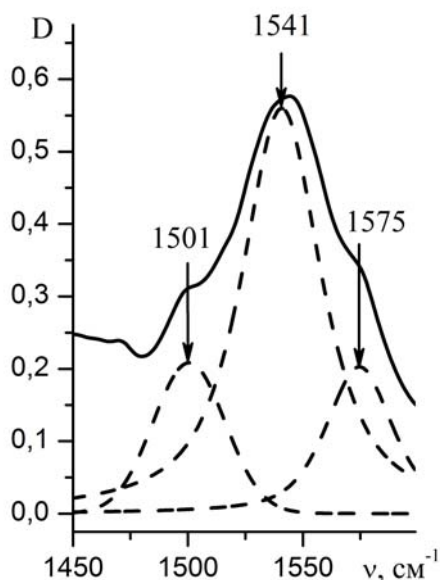


Рис. 2. ИК спектр поглощения внутрикольцевых С-С и С-Н колебаний изоаллоксазинового кольца FMN: (—) экспериментально полученный спектр и (---) спектр, полученный методом разложения. Пленка FMN выращена из раствора с $\text{pH}=7,0$.

Согласно данным работ [2, 3] эти полосы связаны с валентными колебаниями атомов С-С и С-Н в изоаллоксазиновом кольце FMN. В таблице 1 приведены полосы и их отнесение, сделанное в работе [3].

Как видно из таблицы 1, частоты полос поглощения ν_1 и ν_2 могут быть чувствительны «в чистом виде» к протонированию по атомам азота N_1 и N_5 . В полосу ν_3 дают вклад оба атома азота N_1 и N_5 .

Таблица 1

ИК полосы поглощения внутрикольцевых колебаний изоаллоксазинового кольца FMN и их отнесение

Частота (ν), см^{-1}	Отнесение
1501 (± 2) (ν_2)	Полоса IV, $\nu(\text{C}_6=\text{C}_7)$; $\nu(\text{C}_9-\text{C}_{9a})$; $\nu(\text{C}_{10a}=\text{N}_1)$
1541 (± 2) (ν_1)	Полоса III, $\nu(\text{C}_{5a}=\text{C}_6)$; $\nu(\text{C}_8-\text{C}_9)$; $\nu(\text{C}_{5a}=\text{N}_5)$
1575 (± 2) (ν_3)	Полоса II, $\nu(\text{C}_{4a}=\text{N}_5)$; $\nu(\text{C}_4-\text{C}_{4a})$; $\nu(\text{C}_{10a}=\text{N}_1)$

Для выяснения влияния протонирования на полосы поглощения ν_1 , ν_2 и ν_3 нами получен спектр сухой пленки FMN, выращенной из слабокислого (pH=6,0) водного раствора. Предполагается, что в этих условиях происходит протонирование изоаллоксазинового кольца по атомам N_1 и N_5 [1]. На рис. 3 представлен ИК спектр пленки FMN (pH=6,0) в области поглощения внутримолекулярных валентных колебаний и его компоненты, полученные разложением экспериментального спектра. Видны существенные сдвиги рассматриваемых полос поглощения, по сравнению с таким же спектром для пленки, выращенной из нейтрального раствора (см. рис. 2 и данные таблицы 2).

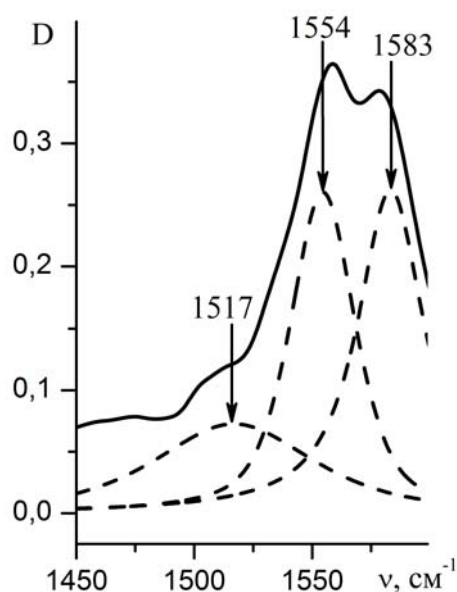


Рис. 3. ИК спектр поглощения внутримолекулярных С-С и С-N колебаний изоаллоксазинового кольца FMN: (—) экспериментально полученный спектр и (---) спектр, полученный методом разложения. Пленка FMN выращена из раствора с pH=6,0.

Таблица 2

Частоты и частотные сдвиги полос поглощения для пленок FMN, выращенных из нейтрального и слабокислого растворов

Полоса	Максимум полосы поглощения пленки FMN (pH=7,0), cm^{-1}	Максимум полосы поглощения пленки FMN (pH=6,0), cm^{-1}	Частотный сдвиг $\Delta\nu$, cm^{-1}
ν_1	1541 (± 2)	1555 (± 2)	+14 (± 2)
ν_2	1501 (± 2)	1517 (± 2)	+16 (± 2)
ν_3	1575 (± 2)	1583 (± 2)	+8 (± 2)

Из результатов, представленных в таблице 2 видно, что протонирование изоаллоксазинового кольца по атомам N_1 и N_5 вызывает значительное увеличение частот колебаний ν_1 и ν_2 и в меньшей степени – для полосы ν_3 . Для объяснения высокочастотных сдвигов нами был выполнен квантово-химический расчет электронной плотности (зарядов) на атомах и порядка связей изоаллоксазинового кольца.

Квантово-химический расчет зарядов на атомах и порядка связей изоаллоксазинового кольца FMN

В таблице 3 представлены заряды на атомах для нейтрального и протонированного по атомам N_1 и N_5 колец FMN и разница зарядов $\text{FMN } N_1H^+N_5H^+ - \text{FMN } N_1N_5$.

Из этих данных видно, что на атомах азотов N_1 и N_5 находятся значительные отрицательные заряды $-0,612$ и $-0,545$, соответственно. Поэтому связывание положительно заряженного атома водорода (протона), вероятно, будет идти по этим атомам.

Из таблицы 3 также можно видеть, что протонирование атомов N_1 и N_5 сопровождается перераспределением электронной плотности (зарядов): (i) на атомах C_{5a} , C_6 , C_8 и C_9 совместно с атомом N_5 (см. табл. 1), которые определяют частоту полосы III (ν_1); (ii) на атомах C_6 , C_7 , C_9 , C_{9a} и C_{10a} и N_1 , определяющих частоту полосы IV (ν_2); (iii) на атомах C_{4a} , N_5 , C_4 , C_{10a} и N_1 , определяющих частоту полосы II (ν_3).

Таблица 3

Заряды на атомах протонированного и непротонированного изоаллоксазинового кольца FMN и их разница (все заряды приведены в атомных единицах, а.у.)

Нумерация атомов	FMN $N_1H^+N_5H^+$	FMN N_1N_5	FMN $N_1H^+N_5H^+$ – FMN N_1N_5
N_1	-0,447	-0,612	0,165
C_2	0,725	0,927	-0,202
O	-0,405	-0,623	0,218
N_3	-0,575	-0,756	0,181
C_4	0,643	0,742	-0,099
O	-0,420	-0,581	0,161
C_{4a}	-0,054	0,236	-0,290
N_5	-0,122	-0,545	0,423
C_{5a}	0,258	0,570	-0,311
C_6	-0,379	-0,473	0,094
C_7	0,259	0,203	0,056
C	-0,421	-0,416	-0,005
C_8	0,237	0,185	0,053
C	-0,434	-0,468	0,034
C_9	-0,272	-0,289	0,017
C_{9a}	0,035	-0,283	0,318
N_{10}	0,153	0,349	-0,196
C_{10a}	0,307	0,179	0,128
C(R)	-0,416	-0,528	0,112

В работе также рассчитаны порядки связей атомов в протонированном и непротонированном изоаллоксазиновом кольце FMN и их разница. Результаты расчетов представлены в таблице 4.

Из результатов, представленных в таблице 4, следует, что для полосы III (ν_1) (табл. 1) порядок связей $C_{5a}-C_6$, C_8-C_9 и $C_{5a}-N_5$ незначительно уменьшился (от 0,022 до 0,095); для полосы IV (ν_2) порядок связей C_6-C_7 , C_9-C_{9a} незначительно увеличивается (на 0,049), а для $C_{10a}-N_1$ в то же время уменьшается (на 0,256); для полосы II (ν_3) порядок связи C_4-C_{4a} практически не изменился, тогда как порядок связей $C_{4a}-N_5$ и $C_{10a}-N_1$ уменьшается на 0,265 и 0,256, соответственно.

Таблица 4

Порядки связей протонированного и непротонированного изоаллоксазинового кольца FMN и их разница

Связи	FMN N ₁ H ⁺ N ₅ H ⁺	FMN N ₁ N ₅	FMN N ₁ H ⁺ N ₅ H ⁺ – FMN N ₁ N ₅
N ₁ -C ₂	0,9762	1,1138	-0,1376
N ₁ -C _{10a}	1,3301	1,5857	-0,2556
N ₁ -H	0,7721		-
C ₂ -O	2,2159	2,1143	0,1016
C ₂ -N ₃	1,0538	1,0307	0,0231
N ₃ -C ₄	1,1522	1,1293	0,0229
N ₃ -H	0,8759	0,8921	-0,162
C ₄ -O	2,1831	2,2582	-0,0751
C ₄ -C _{4a}	0,8850	0,8828	0,0022
C _{4a} -N ₅	1,4361	1,7284	-0,2653
C _{4a} -C _{10a}	1,1588	1,0737	0,0851
N ₅ -C _{5a}	1,2734	1,3684	-0,095
N ₅ -H	0,8422		-
C _{5a} -C ₆	1,2325	1,2560	-0,0235
C _{5a} -C _{9a}	1,1772	1,2714	-0,0942
C ₆ -C ₇	1,4499	1,4007	0,0492
C ₆ -H	0,9953	1,0022	-0,0069
C ₇ -C ₈	1,1800	1,2868	-0,1068
C ₈ -C ₉	1,3610	1,3827	-0,0217
C ₉ -C _{9a}	1,3307	1,2826	0,0481
C _{9a} -N ₁₀	1,1259	1,1170	0,0089
N ₁₀ -C _{10a}	1,2681	1,1968	0,0713
N ₁₀ -C	0,8998	0,9436	-0,0438

Полученные данные о порядках связей коррелируют с частотными сдвигами полос поглощения ν_1 , ν_2 и ν_3 (см. табл. 3): чем меньше изменяется порядок связей, тем больше частотный сдвиг в протонированном изоаллоксазиновом кольце.

ВЫВОДЫ

Анализ полученных ИК спектров в области поглощения внутримолекулярных валентных C-C и C-N колебаний изоаллоксазинового кольца FMN в высушенной пленке (0% ОВ), выращенной из слабокислого раствора, показал, что протонирование кольца может происходить по атомам азота N₁ и N₅. Квантово-химические расчеты зарядов на атомах изоаллоксазинового кольца подтвердили этот вывод, поскольку на атомах N₁ и N₅ находятся значительные отрицательные заряды.

Обнаруженные высокочастотные сдвиги полос поглощения внутримолекулярных колебаний связаны с увеличением силовой постоянной (k): частота колебаний пропорциональна k . В величину k , согласно теории колебаний многоатомных молекул, в том числе гетероциклических [18], вносят вклад изменения зарядов и порядков связей, что и было определено при проведении квантово-химических расчетов протонированной формы изоаллоксазинового кольца FMN. Но связь между силовыми

постоянными k колеблющихся атомов и изменением зарядов и порядков связей требует специального теоретического рассмотрения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beiner H. Spectral characteristics of flavins at the semiquinoid oxidation Level / H. Beiner // *J. Am. Chem. Soc.* – 1956. – Vol. 78, № 20. – P. 5323–5328.
2. Thöing C. Protonated triplet-excited flavin resolved by step-scan FTIR spectroscopy: implications for photosensory LOV domains / C. Thöing, A. Pfeifer, S. Kakorin, T. Kottke // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – Vol. 15. – P. 5916–5926.
3. Ataka K. Vibrational spectroscopy of an algal phot-LOV1 domain probes the molecular changes associated with blue-light reception / K. Ataka, P. Hegemann, J. Heberle // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 84, № 1. – P. 466–74.
4. Probing protonation sites of isolated flavins using IR spectroscopy: from lumichrome to the cofactor flavin mononucleotide / J. Langer, A. Günther, S. Seidenbecher [et al.] // *Chemphyschem.* – 2014. – Vol. 15, № 12. – P. 2550–2562.
5. Martin C. B. The reaction of triplet flavin with indole. A study of the cascade of reactive intermediates using density functional theory and time resolved infrared spectroscopy / C. B. Martin, M.-L. Tsao, C. M. Hadad, M. S. Platz // *J. Am. Chem. Soc.* – 2002. – Vol. 124, № 24. – P. 7226–34.
6. Самоассоциация и гидратация флавин-монопнуклеотида в растворах и плёнках / Ю. Н. Близинок, Д. М. Глибицкий, М. А. Семёнов [и др.] // *Біофізичний Вісник.* – 2014. – Т. 31, № 1. – С. 5–22. / Samoassociaciya i gidratacija flavin-mononukleotida v rastvorah i plenkah / Ju. N. Blyzniuk, D. M. Glibitsky, M. A. Semenov [i dr.] // *Biofiz. Visn.* – 2014. – Т. 31, № 1. – С. 5–22./
7. Химмельблау Д. М. Прикладное нелинейное программирование / Д. М. Химмельблау. – М: Мир, 1975. – 536 с./ Himmel'blau D. M. Prikladnoe nelinejnoe programmirovanie / D. M. Himmel'blau // М: Мир, 1975. – 536 с./
8. Nelder J.A. A simplex method for function minimization / J. A. Nelder, R. Mead // *The Computer Journal.* – 1965. – Vol. 7, № 4. – P. 308–313.
9. Frank N. The ORCA program system / N. Frank // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science.* – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 73–78.
10. Becke A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior / A. D. Becke // *Phys. Rev. A.* – 1988. – Vol. 38, № 6. – P. 3098–3100.
11. Chengteh L. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density / L. Chengteh, Y. Weitao, G. P. Robert // *Phys. Rev. B.* – 1988. – Vol. 37, № 2. – P. 785–789.
12. Schaefer A. Fully optimized contracted Gaussian-basis sets for atoms Li to Kr / A. Schaefer, H. Horn, R. J. Ahlrichs // *Chem. Phys.* – 1992. – Vol. 97. – P. 2571–2577.
13. Weigend F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn / F. Weigend // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2006. – Vol. 8. – P. 1057–1065.
14. Breneman C. M. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis / C. M. Breneman, K. B. Wiberg // *Journal of Computational Chemistry.* – 1990. – Vol. 11, № 3. – P. 361–373.
15. Mayer I. On the chemical hamiltonian apparatus, bond orders and valences / I. Mayer // In "Modelling of structure and properties of molecules" Z. B. Maksic (ed.). – Ellis Horwood, Chicester. – 1987 – P. 145–159.
16. Kita A. Structure of flavoprotein FP390 from a luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* refined at 2.7 Å resolution / A. Kita, S. Kasai, M. Miyata, K. Miki // *Acta Crystallogr. Sect. D.* – 1996. – V. 52. – P. 77–86.
17. The Protein Data Bank / H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28. – P. 235–242.
18. Колебания молекул / М. В. Волькенштейн, М. А. Ельяшевич, Б. И. Степанов, Л. А. Грибов. – М. : Наука, 1972. – 699 с. /Kolebanija molekul / M. V. Vol'kenshtejn, M. A. El'jashevich, B. I. Stepanov, L. A. Gribov. – М. : Nauka, 1972. – 699 с./

УДК 577.323

ВЛИЯНИЕ ДВУХ ТИПОВ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С ДНК НА ПАРАМЕТРЫ ПЕРЕХОДА СПИРАЛЬ – КЛУБОК В ПОЛИНУКЛЕОТИДАХ**А.С. Хребтова, Н.А. Гладковская, Е.Г. Березняк, Е.В. Духопельников, А.В. Фомин, А.В. Зинченко****Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 61085, Украина***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, 61015, Украина
e-mail: k_berez@mail.ru*

Поступила в редакцию 20 октября 2015 года

Принята 15 декабря 2015 года

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии и спектрофотометрии проведено исследование взаимодействия производных актиноцина Act II и Act III с ДНК. С помощью спектрофотометрического титрования определены равновесные концентрации комплексов интеркаляционного и внешнего типов в системах Act – ДНК в зависимости от относительной концентрации ДНК. Рассчитаны параметры связывания для каждого типа комплексов лигандов актиноцинового ряда с ДНК. Получены кривые теплопоглощения комплексов Act – ДНК при различных соотношениях концентраций ДНК и лиганда. Калориметрические исследования показали, что интеркаляционное взаимодействие приводит к росту энтальпии, энтропии и температуры плавления ДНК, тогда как внешний тип связывания повышает только термостабильность матрицы. Проведено сравнение параметров перехода спираль – клубок в ДНК, которая связана с лигандами актиноцинового ряда и профлавином. Степень влияния лигандов на термодинамические параметры плавления ДНК коррелирует со значениями констант связывания, полученными методом спектрофотометрии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, производные актиноцина, интеркаляция, внешнее связывание, параметры плавления, калориметрия, спектрофотометрия.

ВПЛИВ ДВОХ ТИПІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛІГАНДІВ З ДНК НА ПАРАМЕТРИ ПЕРЕХОДУ СПИРАЛЬ – КЛУБОК У ПОЛІНУКЛЕОТИДАХ**Г.С. Хребтова, Н.О. Гладковська, К.Г. Березняк, Є.В. Духопельников, О.В. Фомін, О.В. Зінченко****Институт радіофізики та електроніки ім. О.Я.Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, м. Харків, 61085, Україна***Институт проблем криобіології та криомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015, Україна*

Методами диференційної скануючої калориметрії та спектрофотометрії проведено дослідження взаємодії похідних актиноцину Act II і Act III з ДНК. За допомогою спектрофотометричного титрування розраховано рівноважні концентрації комплексів інтеркаляційного та зовнішнього типів в системах Act – ДНК в залежності від відносної концентрації ДНК. Наведено параметри зв'язування для кожного типу комплексів лігандів актиноцинового ряду з ДНК. Отримано криві теплопоглинання комплексів Act – ДНК при різних співвідношеннях концентрацій ДНК та ліганду. Калориметричні дослідження виявили, що інтеркаляційна взаємодія призводить до збільшення ентальпії, ентропії та температури плавлення ДНК, тоді як зовнішній тип зв'язування підвищує тільки термостабільність матриці. Проведено порівняння параметрів переходу спіраль – клубок у ДНК, що зв'язана з лігандами актиноцинового ряду та профлавином. Ступінь впливу лігандів на термодинамічні параметри плавлення ДНК корелює з величинами констант зв'язування, що отримані методом спектрофотометрії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ДНК, похідні актиноцину, інтеркаляція, зовнішнє зв'язування, параметри плавлення, калориметрія, спектрофотометрія.

**THE EFFECT OF TWO BINDING TYPES ON PARAMETERS OF
HELIX – COIL TRANSITION IN POLYNUCLEOTIDES****A.S. Khrebtova, N.A. Gladkovskaya, E.G. Bereznyak, E.V. Dukhopelnikov,
A.V. Fomin, A.V. Zinchenko****O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,
12 Ak. Proskura Str., Kharkov, 61085, Ukraine***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine,
23 Pereyaslavskaya Str., Kharkov, 61015, Ukraine*

An interaction of actinocin derivatives Act II and Act III with DNA is studied by differential scanning calorimetry and spectrophotometry. The equilibrium concentrations of intercalational and external types of complexes in Act – DNA systems at different relative DNA concentration are calculated from spectrophotometric titration data. The binding parameters for each type of actinocin derivatives – DNA complexes are obtained. The heat capacity curves of Act – DNA complexes were obtained at different relative ligand concentrations. Calorimetric study achieved that intercalation binding type leads to increase of enthalpy, entropy and melting temperature of DNA, while the external type induces the rise of the helix thermal stability only. The comparison of helix – coil transition parameters of DNA in the complexes with actinocin derivatives and proflavine is performed. The effect of ligands on DNA melting parameters correlates to binding constants obtained by spectrophotometry.

KEY WORDS: DNA, actinocin derivatives, intercalation, external binding, melting parameters, calorimetry, spectrophotometry.

Термическая денатурация является широко используемым инструментом для исследования комплексообразования нуклеиновых кислот с малыми молекулами. Это обусловлено кооперативным характером плавления полинуклеотидов, которое сопровождается резким изменением многих физических свойств макромолекул. Прямым методом определения тепловых эффектов при конформационных переходах биологических макромолекул и их комплексов является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Этот метод позволяет получить такие термодинамические характеристики как температура, энтальпия, энтропия, свободная энергия и изменение теплоемкости при плавлении. Возможности метода ДСК в области изучения конформационных превращений биополимеров (белков, нуклеиновых кислот и т.д.) хорошо известны и общепризнаны [1-3].

Взаимодействие с лигандами может существенно изменять термодинамическое состояние полинуклеотидной матрицы [4-6]. Комплексообразование приводит, в частности, к сдвигу температуры плавления ДНК, а также влияет на энтальпию плавления [7-9]. Сравнение параметров плавления ДНК в комплексе с лигандами и «свободного» полимера позволяет получить значения фундаментальных термодинамических характеристик в системах ДНК – лиганд.

Образование нековалентных комплексов лигандов с ДНК происходит за счет «сильного» или «слабого» типов связывания, которые по-разному влияют на параметры перехода спираль – клубок в ДНК [10-12]. К «сильным» типам относят интеркаляцию лигандов в двойную спираль ДНК, а также связывание лигандов в малом желобке ДНК. «Слабый» тип предполагает электростатические взаимодействия положительно заряженных катионов лиганда с отрицательно заряженными группами на полимерной матрице. Многие лиганды взаимодействуют с матрицей ДНК одновременно несколькими способами, т.е. проявляют мультимодальность [11, 13-15].

Ранее нами были проанализированы параметры перехода спираль – клубок в ДНК в присутствии известного мутагена акридинового ряда – профлавина (Pf), который образует интеркаляционный и внешний типы комплексов [16]. Было показано, что влияние каждого из типов связывания на параметры плавления ДНК можно определить с помощью анализа данных ДСК, полученных в широком интервале соотношения концентраций ДНК и лиганда (P/D). Концентрационные диапазоны, в которых

преобладает тот или иной тип связывания, были определены методом спектрофотометрии (СФ) в видимой области [14, 16, 19].

В данной работе методами ДСК и СФ проведено исследование плавления комплексов ДНК с производными актиноцина Act II и Act III (аналоги известного антибиотика актиномицина D [17]). Природу их биологической активности связывают с интеркаляционным типом взаимодействия с ДНК [18]. Кроме того, Act II и Act III являются заряженными молекулами, что предопределяет появление внешних электростатических комплексов.

Цель данной работы – определить влияние интеркаляционного и внешнего типов связывания мультимодальных лигандов с ДНК на переход спираль – клубок в биополимере.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерения теплотогощения свободной ДНК и ее комплексов с лигандами проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 в рабочем диапазоне температур 20÷130 °С и объемом измерительной ячейки 0,4553 мл. Для предотвращения кипения раствора вплоть до 130 °С в измерительной камере создавалось избыточное давление 2,5 атм. Скорость прогрева растворов образцов составляла 1 град / мин. Зависимости избыточной молярной теплоемкости от температуры получены с учетом базовой линии, проведенной между точками, соответствующими температурам начала и конца перехода.

Изменения энтальпии (ΔH_{melt}), энтропии (ΔS_{melt}) и свободной энергии Гиббса (ΔG_{melt}) для процесса тепловой денатурации ДНК рассчитывались из кривой теплотогощения по уравнениям:

$$\Delta H_{melt} = \int \delta C_p dT, \quad (1)$$

$$\Delta S_{melt} = \int \frac{\delta C_p}{T} dT, \quad (2)$$

$$\Delta G_{melt} = \Delta H_{melt} - T \Delta S_{melt}. \quad (3)$$

Температура плавления T_{melt} представляет собой температуру, при которой степень спиральности ДНК равна 1/2. Степень спиральности α из данных ДСК определяется как:

$$\alpha(T) = \frac{\int_{T_1}^T \delta C_p dT}{\int_{T_1}^{T_2} \delta C_p dT}, \quad (4)$$

где T_1 и T_2 – температуры начала и конца перехода, соответственно.

Ширина интервала плавления ΔT получена по формуле:

$$\Delta T = -\frac{1}{(d\alpha/dT)_{T=T_{melt}}}. \quad (5)$$

Ошибка определения термодинамических параметров плавления (ΔH_{melt} , ΔS_{melt} и ΔG_{melt}) из ДСК эксперимента составляла (5 ÷ 7)%, а температуры плавления – 1 °С.

Исследования спектров поглощения смесей лиганд – ДНК при различных

значениях P/D проведены на спектрофотометре "Specord M40" (Германия). Ошибка измерения составляла 0,005 единиц оптической плотности.

Расчет констант (K), величин мест связывания (n), а также равновесного состава раствора из данных спектрофотометрии проводился с помощью программы оптимизации DALSMOD [19].

В работе использовались следующие препараты: ДНК из молок лосося (stДНК) фирмы "Sigma" (содержание GC-пар 42%); лиганды актиноцинового ряда актиноцил-бис(3-диметиламиноэтил) амин (Act II) и актиноцил-бис(3-диметиламинопропил) амин (Act III), синтезированные профессором Е.Н. Глибиным (Санкт-Петербургский технический университет, Россия).

Структурные формулы исследованных лигандов приведены на рис. 1.

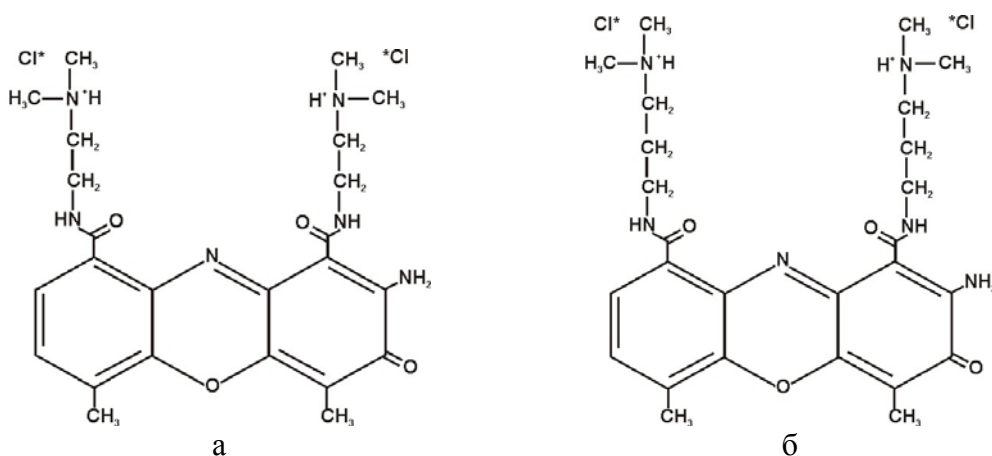


Рис. 1. Структурные формулы производных актиноцина Act II (а) и Act III (б).

Исследования взаимодействия в системах ДНК – лиганд проведены в фосфатных буферных растворах (2.5×10^{-3} М KH_2PO_4 , 2.5×10^{-3} М Na_2HPO_4 , $\text{pH} = 6,86$) с добавлением раствора NaCl до значения ионной силы $I = 0,02$ М. При определении концентрации исследуемых веществ использованы следующие значения молярных коэффициентов экстинкции: для stДНК $\varepsilon_{260} = 6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11]; для Act II и Act III в изобестической точке мономер – димерного равновесия $\varepsilon_{400} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20].

Концентрация ДНК в растворах, исследуемых методом калориметрии, для всех исследуемых образцов составляла $C_{DNA} \sim 3 \times 10^{-3}$ М. Спектрофотометрические кривые титрования для растворов ДНК – лиганд были получены при постоянной концентрации лиганда и изменяющейся концентрации ДНК в интервале P/D от 0 до ~ 120 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены спектры поглощения смесей Act II – ДНК и Act III – ДНК в растворах с ионной силой $I = 0,02$ М при разных значениях P/D и постоянных концентрациях лиганда. Из рис. 2 видно, что в исследуемых системах присутствуют три по-разному поглощающих компонента (свободный лиганд и 2 типа комплексов). Об этом свидетельствует наличие двух изобестических точек на спектрофотометрических кривых титрования: $\lambda = 470$ нм и $\lambda = 427$ нм для Act II – ДНК; $\lambda = 466$ нм и $\lambda = 423$ нм для Act III – ДНК. При образовании комплексов по внешнему типу связывания в области низких значений P/D (комплекс 1) наблюдается падение поглощения. Дальнейшее увеличение концентрации ДНК сопровождается батохромным сдвигом спектров и ростом поглощения в длинноволновом максимуме, что свидетельствует об образовании второго типа комплексов (комплекс 2). Этот комплекс соответствует связыванию по типу интеркаляции [19].

Расчет констант и величин мест связывания из данных СФ был проведен по модели, согласно которой связывание лиганда с ДНК происходит с образованием двух типов комплексов [19, 21]. Для комплекса 1 в модели учитывается кооперативное взаимодействие лиганда с матрицей ДНК и конкуренция за места связывания с ионами Na^+ . Образование комплекса 2 происходит не кооперативно.

Полученные величины констант и мест связывания для комплекса 1 (k_{bind1} , n_1) и комплекса 2 (k_{bind2} , n_2) в системах производные актиноцина – ДНК представлены в таблице 1. Также в таблице 1 приведены параметры связывания профлавина с ДНК, рассчитанные по этой модели из экспериментальных спектров поглощения, полученных нами ранее [16].

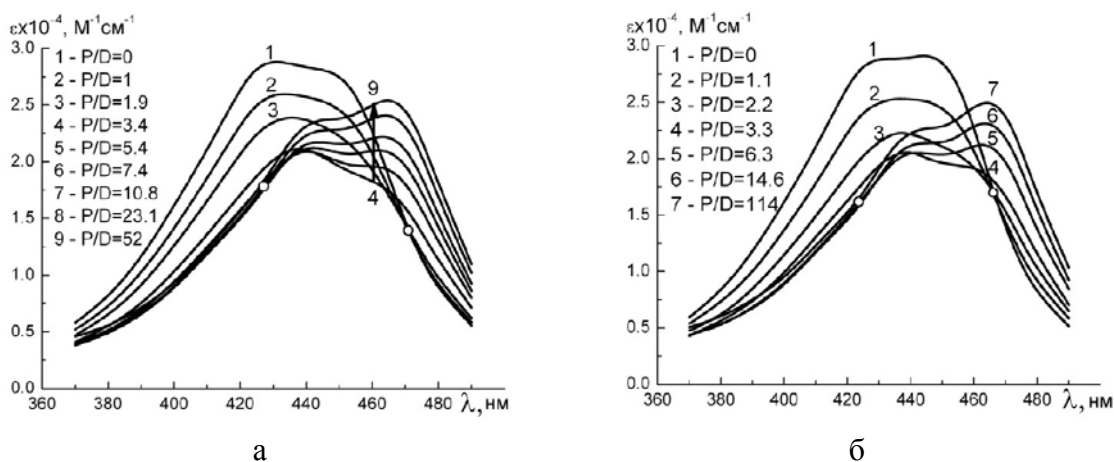


Рис. 2. Спектры поглощения смесей ДНК – лиганд при разных значениях P/D и постоянной концентрации лиганда C_L в растворах с ионной силой $I = 0,02$ М: Act II – ДНК при $C_L = 3,0 \times 10^{-5}$ М (а) и Act III – ДНК при $C_L = 1,42 \times 10^{-5}$ М (б).

Таблица 1
Параметры связывания в системах Act II – ДНК, Act III – ДНК и Pf – ДНК при $I = 0,02$ М, полученные из спектрофотометрических концентрационных зависимостей с помощью программы оптимизации DALSMOD.

система	n_1	k_{bind1}	n_2	k_{bind2}
Act II – ДНК	$3,0 \pm 0,2$	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	$6,0 \pm 0,2$	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$
Act III – ДНК	$3,0 \pm 0,2$	$(1,9 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	$6,0 \pm 0,2$	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$
Pf – ДНК	$2,0 \pm 0,2$	$(1,1 \pm 0,5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	$4,0 \pm 0,2$	$(5,2 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$

Величины констант и мест связывания (таблица 1) позволяют для любых общих концентраций ДНК (C_{DNA}) и лиганда (C_L) рассчитать равновесный состав раствора. На рис. 3 показано, как изменяются равновесные концентрации разных типов комплексов (C_k) в зависимости от P/D при постоянной концентрации лигандов Act II, Act III и Pf.

Видно, что при низких значениях P/D во всех исследуемых смесях лиганд – ДНК преобладает комплекс 1. С ростом концентрации ДНК количество комплекса 1 уменьшается, а относительное содержание комплекса 2 увеличивается.

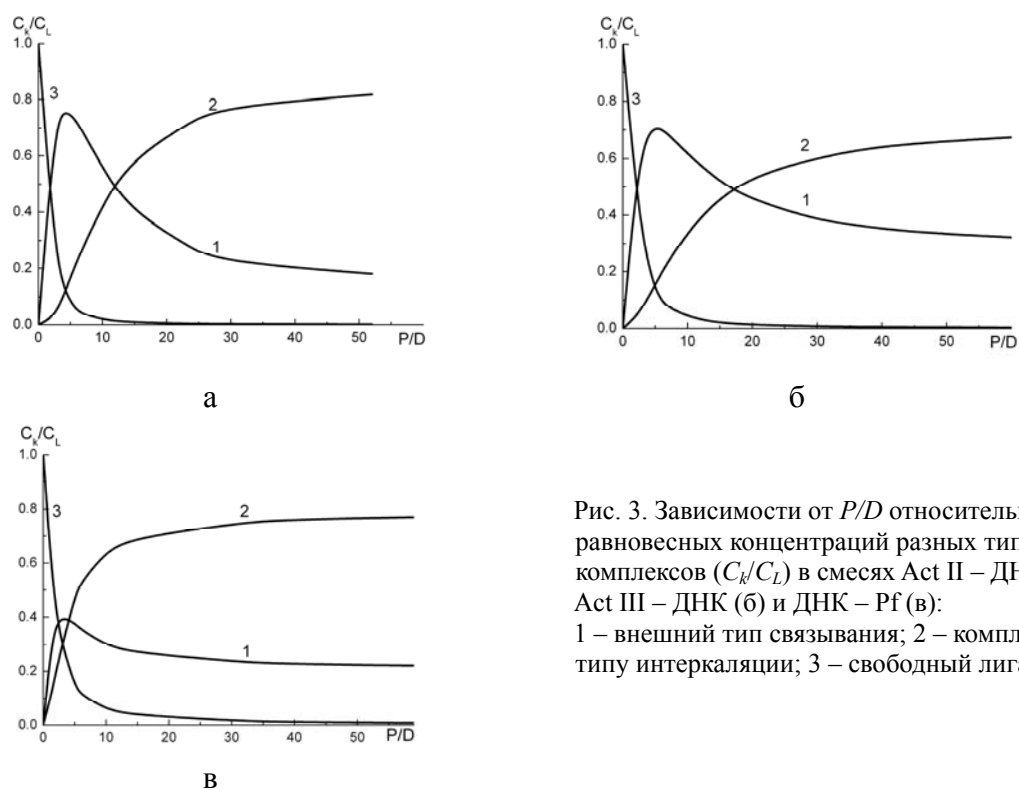


Рис. 3. Зависимости от P/D относительных равновесных концентраций разных типов комплексов (C_i/C_L) в смесях Act II – ДНК (а), Act III – ДНК (б) и ДНК – Pf (в): 1 – внешний тип связывания; 2 – комплекс по типу интеркаляции; 3 – свободный лиганд.

На рис. 4 представлены результаты микрокалориметрической регистрации процесса теплопоглощения свободной ДНК и комплексов ДНК – Act II, ДНК – Act III, а также ДНК – Pf [16] при различных значениях P/D .

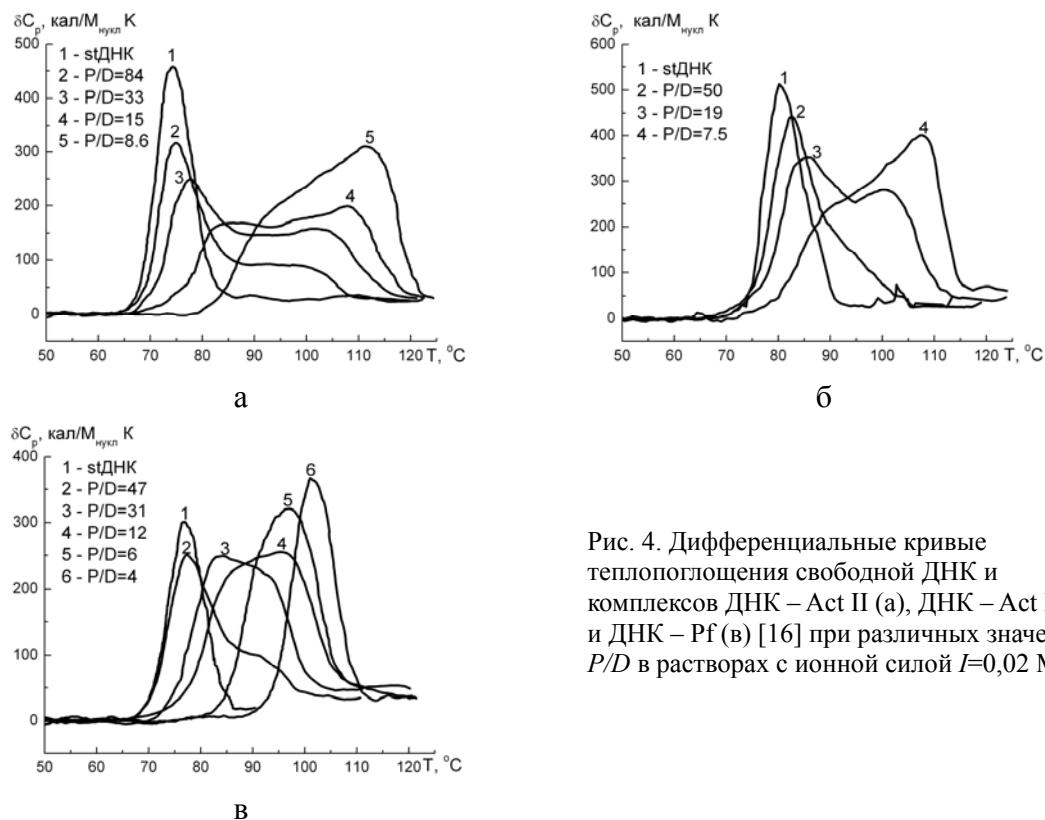


Рис. 4. Дифференциальные кривые теплопоглощения свободной ДНК и комплексов ДНК – Act II (а), ДНК – Act III (б) и ДНК – Pf (в) [16] при различных значениях P/D в растворах с ионной силой $I=0,02$ М.

При добавлении лиганда кривая теплотогощения становится двухфазной. Первый пик (низкотемпературный) соответствует плавлению свободных от лиганда участков ДНК и участков ДНК с низкой степенью насыщения матрицы лигандом, а второй (высокотемпературный) – к плавлению участков ДНК с высокой степенью насыщения лигандом [7, 22]. При увеличении относительной концентрации лиганда кривая теплотогощения смещается в область более высоких температур, интенсивность второго пика возрастает. Более отчетливо двухфазный характер плавления проявляется для систем Act II – ДНК и Act III – ДНК. Это связано с тем, что смещение второго пика напрямую зависит от величины константы связывания [23], а сродство производных актиноцина к ДНК выше, чем профлавина (таблица 1). При высокой степени заполнения матрицы лигандом ($P/D = 4,1$) в системе Pf – ДНК первый пик исчезает и кривая теплотогощения становится однофазной (рис. 4 в). В случае связывания производных актиноцина с ДНК седиментация комплексов при $P/D < 7$ не позволила получить однофазную ДСК кривую (рис. 4 а, б).

Термодинамические параметры плавления ДНК в составе комплексов с исследуемыми лигандами получены по уравнениям (1 - 5). На рис. 5 и рис. 6 представлены зависимости от относительной концентрации лиганда (D/P) приращения параметров плавления комплексов по сравнению с соответствующими значениями для свободной ДНК. Видно, что для всех лигандов увеличение их относительной концентрации приводит к нелинейным изменениям $\delta\Delta H_{melt}$, $T\delta\Delta S_{melt}$, $\delta\Delta G_{melt}$, δT_{melt} и $\delta\Delta T_{melt}$. При низких значениях D/P увеличение концентрации лиганда приводит к росту $\delta\Delta H_{melt}$, $T\delta\Delta S_{melt}$ и $\delta\Delta G_{melt}$, а также δT_{melt} и $\delta\Delta T_{melt}$. При таких соотношениях концентраций ДНК и лиганда по данным СФ преобладают комплексы по типу интеркаляции (рис. 3).

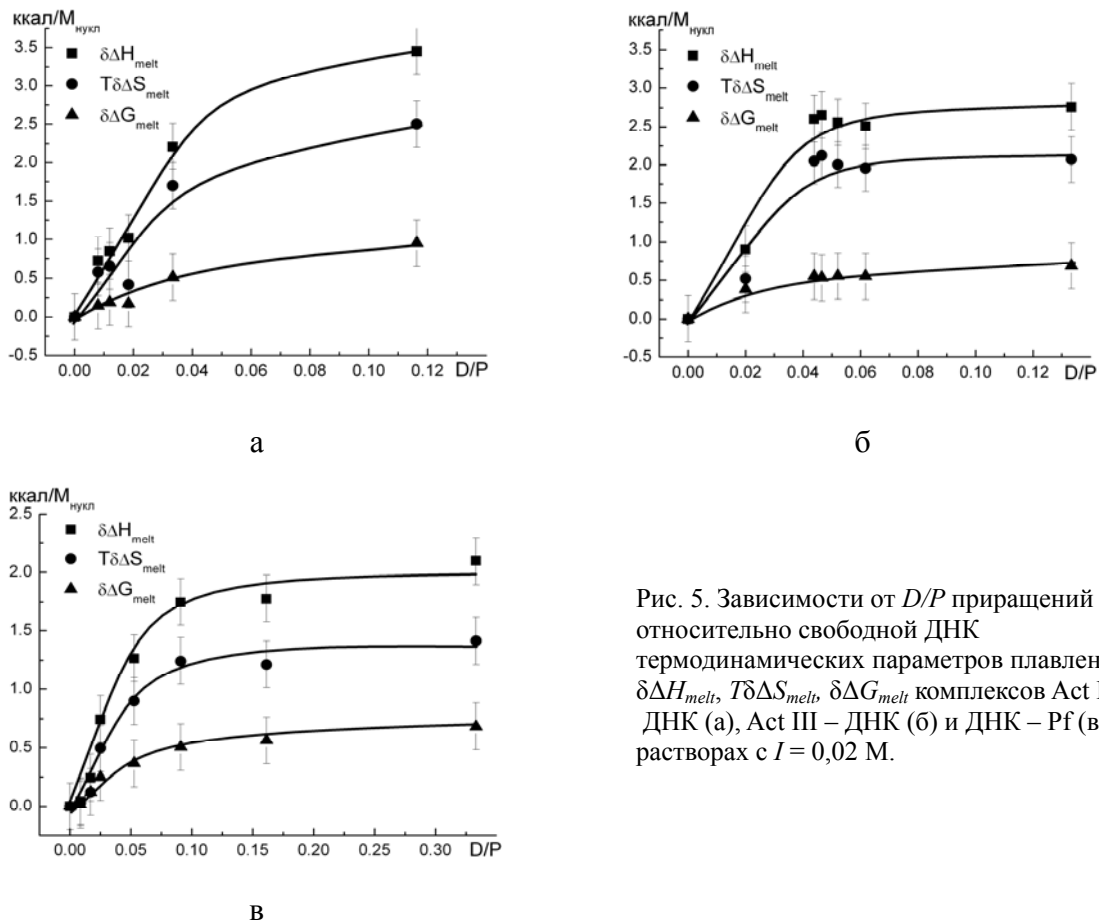


Рис. 5. Зависимости от D/P приращений относительно свободной ДНК термодинамических параметров плавления $\delta\Delta H_{melt}$, $T\delta\Delta S_{melt}$, $\delta\Delta G_{melt}$ комплексов Act II – ДНК (а), Act III – ДНК (б) и ДНК – Pf (в) в растворах с $I = 0,02$ М.

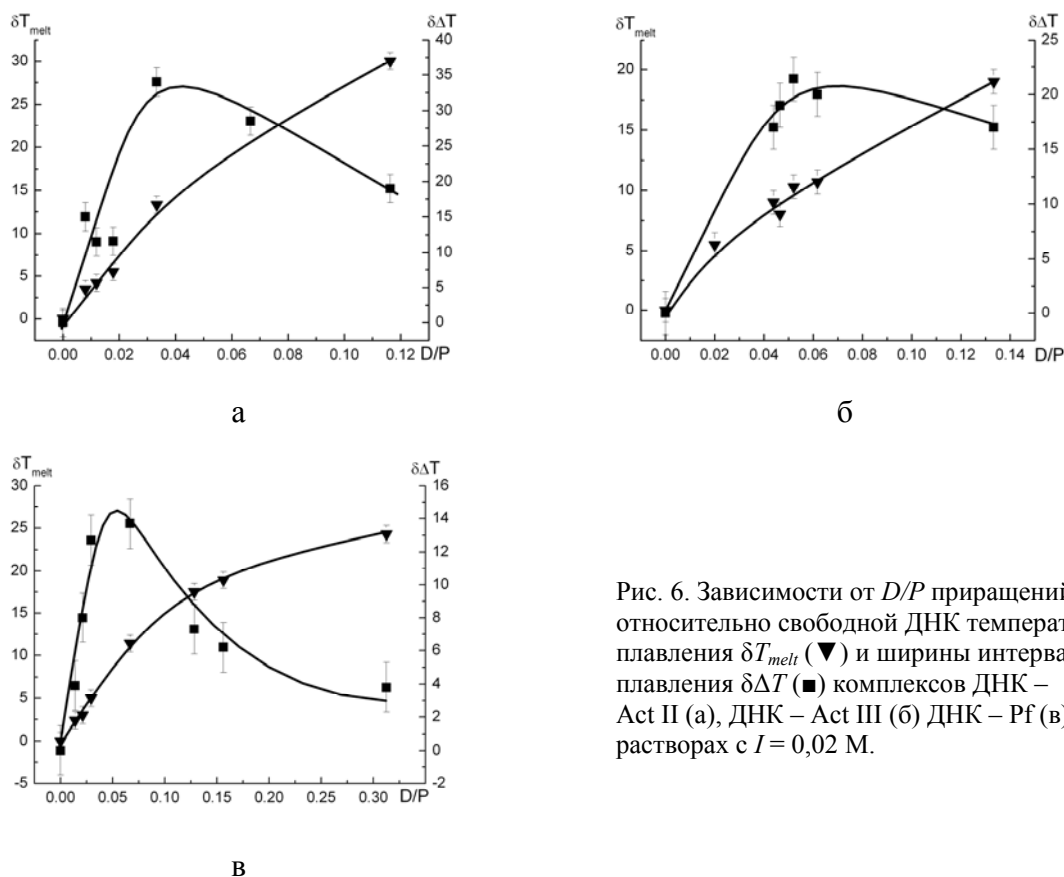


Рис. 6. Зависимости от D/P приращений относительно свободной ДНК температуры плавления δT_{melt} (\blacktriangledown) и ширины интервала плавления $\delta \Delta T$ (\blacksquare) комплексов ДНК – Act II (а), ДНК – Act III (б) ДНК – Pf (в), в растворах с $I = 0,02$ М.

Наблюдаемые изменения термодинамических параметров можно объяснить тем, что при образовании интеркаляционной полости, необходимой для встраивания лиганда, ДНК переходит в энтропийно менее выгодную конформацию. Проигрыш в энтропии компенсируется энтальпийным вкладом, который возникает за счет водородных связей между лигандом и ДНК [24], а также стэкинг-взаимодействий между парами оснований и хромофором лиганда [25].

Отличия в величинах $\delta \Delta H_{melt}$ и δT_{melt} при взаимодействии ДНК с профлавином и производными актиноцина связаны с тем, что комплексы этих лигандов с ДНК стабилизируются разным количеством водородных связей. Так, в комплексе Pf – ДНК в зависимости от нуклеотидной последовательности, в которую встраивается лиганд, наблюдается 2 или 3 водородные связи [26]. Для производных актиноцина по данным молекулярного докинга между хромофором и ДНК образуется 5-6 водородных связей [27]. Кроме того, комплексы ДНК с Act II и Act III характеризуются «глубоким» встраиванием плоских феноксазоновых колец этих лигандов в интеркаляционную полость, что дает значительный вклад энергии стэкинг-взаимодействия в стабилизацию комплексов [28].

Причиной более высокой энтальпии плавления и термостабильности комплекса Act II – ДНК по сравнению с Act III – ДНК может быть образование дополнительных водородных связей между метиленовыми цепочками боковых заместителей интеркалированного Act II и сахарофосфатным остовом ДНК [28]. Степень влияния лиганда на термодинамические параметры плавления ДНК согласуется со значениями констант связывания, полученными методом СФ (таблица 1).

При высокой относительной концентрации лиганда по данным спектрофотометрии преобладают комплексы по внешнему типу связывания (рис. 3). Это связано с тем, что при образовании интеркаляционных комплексов с большой величиной места связывания ($n \approx 6$

нуклеотидов) за счет случайного распределения лиганда вдоль матрицы ДНК возникают участки свободной ДНК, размер которых недостаточен для дальнейшего встраивания лиганда. Поэтому, несмотря на меньшее по сравнению с интеркаляцией значение константы связывания, на этих участках размещаются комплексы по внешнему типу связывания, которые характеризуется малым значением $n = 2 - 3$ нуклеотида.

Образование этого типа комплексов сопровождается небольшими энергетическими затратами [11, 14, 29], поэтому при высоких значениях D/P ($D/P > 0,1$ для профлавина и $D/P > 0,05$ для производных актиноцина) добавление лиганда не приводит к заметным изменениям величин $\delta\Delta H_{melt}$, $T\delta\Delta S_{melt}$ и $\delta\Delta G_{melt}$ (рис. 5). В тоже время, плотное заполнение матрицы ДНК лигандом в этом интервале D/P вызывает увеличение термостабильности ДНК и уменьшение интервала плавления (рис. 6).

ВЫВОДЫ

Исследование влияния лигандов, проявляющих мультимодальность при связывании, на переход спираль-клубок в ДНК показало, что интеркаляционный тип взаимодействия приводит к росту энтальпии, энтропии и температуры плавления ДНК. Степень влияния лигандов на термодинамические параметры плавления ДНК коррелирует со значениями констант связывания, полученными методом СФ. Внешний тип связывания имеет энтропийную природу и увеличивает только термостабильность матрицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helix-coil transition of plasmid DNA by adiabatic differential scanning microcalorimetry / Y. Maeda, K. Takahashi, H. Yamaki, E. Ohtsubo // *Biopolymers*. – 1988. – V. 27 (12). – P. 1917–1925.
2. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterisation by calorimetric and volumetric techniques / T.V. Chalikian, T. Volker, G.E. Plum, K.J. Breslauer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – V. 96. – P. 7853–7858.
3. Esposito D. A thermodynamic study of herring protamine–DNA complex by differential scanning calorimetry / D. Esposito, P. Del Vecchio, G. Barone // *Phys Chem Chem Phys*. – 2001. – V. 3. – P. 5320–5325.
4. Lane A.N. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands / A.N. Lane, T.S. Jenkins // *Quart. Rev. Biophys.* – 2000. – V. 33 (3). – P. 255–306.
5. Chaires J.B. A thermodynamic signature for drug – DNA binding mode / J.B. Chaires // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – V. 453. – P. 24–29.
6. Breslauer K.J. Calorimetry: a tool for DNA and ligand – DNA studies / K.J. Breslauer, E. Freire, M. Straume // *Methods Enzymol.* – 1992. – V. 211. – P. 533–567.
7. Patel D.J. Mutagen – nucleic acid complexes at the polynucleotide duplex level in solution: Intercalation of proflavine into poly(dA–dT) and the melting transition of the complex / D.J. Patel // *Biopolymers*. – 1977. – V. 16 (12). – P. 2739–2754.
8. Bjordnal M.T. DNA melting in the presence of fluorescent intercalating oxazole yellow dyes measured with a gel-based assay / M.T. Bjordnal, D.K. Fygenon // *Biopolymers*. – 2002. – V. 65. – P. 40–44.
9. Theory of helix-coil transition on DNA-ligand complexes: the effect to two types of interaction of ligand on the parameters of transition / A.T. Karapetian, P.O. Vardevanian, G.A. Tarzikian, M.D. Frank-Kamenetskii // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1990. – V. 8 (1). – P. 123–30.
10. Haq I. Thermodynamics of drug–DNA interactions / I. Haq // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – V. 403. – P. 1–15.
11. Barcelo F. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA / F. Barcelo, D. Capó, J. Portugal // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – V. 30 (20). – P. 4567–4573.
12. Kumar C.V. Groove binding of a styryl cyanine dye to the DNA double helix: the salt effect / C.V. Kumar, R.S. Turner, E.H. Asuncion // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 1993. – V. 74 (2–3). – P. 231–238.
13. Barcelo F. Heterogenous DNA binding modes of berenil / F. Barcelo, M. Ortiz-Lombardia, J. Portugal // *Bioch. Biophys. Acta*. – 2001. – V. 1519. – P. 175–184.
14. Sovenyazy K. Spectroscopic studies of the multiple binding modes of trimetine-bridged cyanine dye with DNA / K. Sovenyazy, J. Bolderon, J. Petty // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31 (10). – P. 2561–2569.

15. Stokke T. Multiple binding modes for Hoechst 33248 to DNA / T. Stokke, H.B. Steen // *J. Histochem. Cytochem.* – 1985. – V. 33 (4). – P. 333–338.
16. Калориметрическое и спектрофотометрическое исследование связывания ДНК из молок лосося с профлавином // Е.Г. Березняк, Е.В. Духопельников, Н.А. Гладковская, А.С. Хребтова, А.В. Зинченко / *Біофізичний вісник.* – 2010. – Т. 25 (2). – С. 23–29. / *Kalorimetriceskoye i spektrofotometriceskoye issledovaniye svyazyvaniya DNK iz molok lososya s proflavinom* // Ye.G. Berezhnyak, Ye.V. Dukhopel'nikov, N.A. Gladkovskaya, A.S. Khrebtova, A.V. Zinchenko / *Біофізичний вісник.* – 2010. – Т. 25 (2). – С. 23–29.
17. Veselkov A.N. Anti-cancer drug design: biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives / A.N. Veselkov, D.B. Davies. – Sevastopol: SevNTU Press, 2002. – 259 p.
18. Structure–activity relation for synthetic phenoxazone drugs. Evidence for a direct correlation between DNA binding and pro-apoptotic activity / A.N. Veselkov, V.Ya Maleev, E.N. Glibin et al. // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V. 270. – P. 4200–4207.
19. Круглова Е.Б. Использование метода спектрофотометрического анализа для вычисления термодинамических параметров связывания в системах актиноциновые производные – ДНК / Е.Б. Круглова, Н.А. Гладковская, В.Я. Малеев // *Биофизика.* – 2005. – Т. 50 (2). – С. 253–264. / *Kruglova Ye.B. Ispol'zovaniye metoda spektrofotometriceskogo analiza dlya vychisleniya termodinamicheskikh parametrov svyazyvaniya v sistemakh aktinotsinovyye proizvodnyye – DNK* / Ye.B. Kruglova, N.A. Gladkovskaya, V.Ya. Maleyev // *Биофизика.* – 2005. – Т. 50 (2). – С. 253–264.
20. Спектрофотометрический анализ димеризации производных актиноцина с разной длиной боковых цепей / Е.Б. Круглова, В.Я. Малеев, Е.Н. Глибин, А.Н. Веселков // *Біофізичний вісник.* – 2002. – В. 1 (10). – С. 12–20. / *Spektrofotometriceskiy analiz dimerizatsii proizvodnykh aktinomitsina s raznoy dlinoy bokovykh tsepey* / Ye.B. Kruglova, V.Ya. Maleyev, Ye.N. Glibin, A.N. Veselkov // *Біофізичний вісник.* – 2002. – В. 1 (10). – С. 12–20.
21. Круглова Е.Б. Моделирование процессов связывания актиноциновых антибиотиков с ДНК при разных ионных силах и температурах / Круглова Е.Б. Гладковская Н.А. Малеев В.Я. // *Біофізичний вісник.* – 2003. – В. 1 (12). – С. 53–63. / *Modelirovaniye protsessov svyazyvaniya aktinotsinovyykh antibiotikov s DNK pri raznykh ionnykh silakh i temperaturakh* / Kruglova Ye.B. Gladkovskaya N.A. Maleyev V.YA. // *Біофізичний вісник.* – 2003. – В. 1 (12). – С. 53–63.
22. Marky L.A. Calorimetric and spectroscopic investigation of drug – DNA interactions. I. The binding of netropsin to poly d(AT) / L. A. Marky, K. S. Blumenfeld, K. J. Breslauer // *Nucleic Acids Res.* – 1983. – V. 11 (9). – P. 2857–2870.
23. McGhee J.D. Theoretical calculations of the helix-coil transition of DNA in the presence of large cooperatively binding ligands / J.D. McGhee // *Biopolymers.* – 1976. – V. 15 (7). – P. 1345–1375.
24. Westhof E. X-ray-structure of a cytidylyl-3',5'-adenosine-proflavine complex: a self-paired parallel-chain double helical dimer with an intercalated acridine dye / E. Westhof, M. Sundaralingam // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – V. 77 (4). – P. 1852–1856.
25. Chaires J. B. Calorimetry and thermodynamics in drug design / J. B. Chaires // *Annu. Rev. Biophys.* – 2008. – V. 37. – P. 135–151.
26. Computational study of the interaction of proflavine with d(ATATATATAT)2 and d(GCGCGCGCGC)2 / R. Ruiz, B. Garcia, G. Ruisi, et al. // *J. Mol. Struct.: Theochem.* – 2009. – V. 915 (1–3). – P. 86–92.
27. Miroshnychenko K.V. Flexible docking of DNA fragments and actinocin derivatives / K.V. Miroshnychenko, A.V. Shestopalova // *Molecular Simulation.* – 2005. – V. 31 (8). – P. 567–574.
28. Исследование влияния воды на взаимодействие ДНК и производных актиноцина с различной длиной аминокильных цепочек методами ИК-спектроскопии и компьютерного моделирования / Е.Г. Березняк, М.А. Семенов, Т.В. Больбух и др. // *Биофизика.* – 2002. – Т. 47 (6). – С. 1005–1015. / *Issledovaniye vliyaniya vody na vzaimodeystviye DNK i proizvodnykh aktinotsina s razlichnoy dlinoy aminoalkil'nykh tsepochek metodami IK-spektroskopii i komp'yuternogo modelirovaniya* / Ye.G. Berezhnyak, M.A. Semenov, T.V. Bol'bukh i dr. // *Биофизика.* – 2002. – Т. 47 (6). – С. 1005–1015.
29. Thermodynamics of interactions of water-soluble porphyrins with RNA duplexes / A.A. Ghazaryan, Y.B. Dalyan, S.G. Haroutunian, et al // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. – P. 1914–1921.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 547.426

ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАСТАБИЛЬНЫХ ЖИДКИХ ФАЗ В ИЗОТОНИЧЕСКОМ РАСТВОРЕ НАТРИЯ ХЛОРИДА ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ**А.Т. Ходько***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, 61015, Украина*

Поступила в редакцию 11 ноября 2015 года

Принята 10 декабря 2015 года

Методом криомикроскопии процесса охлаждения 0,15 М изотонического водного раствора натрия хлорида показано, что процессу кристаллизации льда предшествует фазовый переход типа жидкость – жидкость (ликвация), в результате чего образуется метастабильная грубодисперсная система – высококонцентрированная эмульсия. Дисперсная фаза и дисперсионная среда в бинарной системе при одинаковом качественном химическом составе отличаются по концентрации, следовательно, чем больше соотношение объемов сосуществующих фаз, тем больше различается их количественный состав. Дисперсная фаза, составляющая основной объем в изучаемой в данной работе системе, должна иметь концентрацию NaCl ниже, чем дисперсионная среда и исходный раствор. Следовательно, она будет гипотоничной, а дисперсионная среда гипертоничной по отношению к цитоплазме клеток внутренней среды организма человека. Этот, не учитываемый ранее физико-химический фактор, может быть причиной осмотических повреждений живых клеток при охлаждении клеточной суспензии в процессе криоконсервирования.

Ключевые слова: фазовые превращения (переходы), ликвация, кристаллизация, дисперсные системы, криопротекторы.

FORMATION OF METASTABIL LIQUID PHASES IN THE ISOTONIC SOLUTION OF SODIUM CHLORIDE DURING COOLING

A.T. Khodko

Institute for problems of cryobiology and cryomedicine, 23, Pereyaslavskaya Str., 61015 Kharkiv, Ukraine

In this paper the cooling process cryomicroscopy of 0.15 M of isotonic sodium chloride solution was conducted. It was shown that there is liquid – liquid phase change before the crystallization process. As a result, the coarse system (highly concentrated emulsion) was formed. The dispersed phase and the disperse medium in a binary system with the same qualitative chemical composition differ in concentration. Therefore, the greater is the volume ratio of the coexisting phases, the greater is the difference in their quantitative compositions. The dispersed phase, that composes the main volume in the system under investigation, should have lower NaCl concentration than the disperse medium and the initial solution. In this case it will be hypotonic (and disperse medium – hypertonic) in relation to cytoplasm of human internal environment. This physical-chemical factor, which hasn't been considered previously, might be responsible for osmotic damage in living cells during cryopreservation of cell suspensions.

KEY WORDS: phase changes (transitions), liquid phase separation, crystallization, dispersed system, cryoprotectors.

УТВОРЕННЯ МЕТАСТАБИЛЬНИХ РІДКИХ ФАЗ В ІЗОТОНІЧНОМУ РОЗЧИНІ НАТРІЮ ХЛОРИДУ ПРИ ОХОЛОДЖЕННІ

О.Т. Ходько

Институт проблем криобіології і криомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015, Україна

Методом криомікроскопії процесу охолодження 0,15 М ізотонічного водного розчину натрію хлориду показано, що процесу кристалізації льоду передують фазовий перехід типу рідина – рідина (ліквация), внаслідок чого утворюється грубодисперсна система – висококонцентрована емульсія. Дисперсна фаза і дисперсійна середа в бінарній системі маючи однаковий якісний склад відрізняються за концентрацією, отже, чим більше співвідношення об'ємів співіснуючих фаз, тим більше розрізняється їх кількісний склад. Дисперсна фаза, що утворює основний об'єм досліджуваної в цієї роботі системи, повинна мати концентрацію NaCl нижче, ніж дисперсійна середа і початковий розчин. Отже, вона буде гіпотонічною, а дисперсійна середа гіпертонічною

відносно цитоплазми клітин внутрішньої середі організму людини. Цей фізико-хімічний фактор, який раніше не брався до уваги, може бути причиною осмотичних пошкоджень живих клітин при охолодженні клітинної суспензії під час криоконсервування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фазові перетворення (переходи), ліквідація, кристалізація, дисперсні системи, криопротектори.

Криоконсервирование биологических объектов сегодня является одним из высокотехнологичных приоритетных отраслей биотехнологии. Подавляющее большинство этих процессов производится с применением различных химических веществ, в присутствии которых резко повышается процент выживших клеток в процессе охлаждения-отогрева клеточной суспензии. Такие вещества в криобиологии обобщенно называются криопротекторами. Исторически первым из них был глицерин [1].

Основой для подавляющего большинства физиологических растворов является 0,15 М (0,9 %) водный раствор натрия хлорида, который является изотоничным по отношению к клеткам крови. Эта концентрация соответствует концентрации NaCl в их плазме. Развитие практической и теоретической криобиологии делает актуальным изучение физико-химических процессов, сопровождающих охлаждение-отогрев биологических систем.

Клеточная суспензия на этапе криоконсервирования (криобиологическая система) представляет собой дисперсную систему, в которой дисперсной фазой являются клетки, а дисперсионной средой – физиологический раствор, в который добавлен криопротектор. Для понимания процессов, имеющих место в процессе охлаждения суспензии, и определения факторов криоповреждений необходимо изучать, в том числе, и фазовые превращения в среде, окружающей клетки.

В работе Г.П. Вишневецкой с соавторами методом электронного парамагнитного резонанса было показано, что 15 %-ный водный раствор глицерина при охлаждении путем погружения его в жидкий азот стеклуется по всему объему [2].

В водно-глицериновых растворах с содержанием глицерина 20 % и 45 % при охлаждении – отогреве был обнаружен фазовый переход типа жидкость – жидкость (ФПТЖ-Ж), приводящий к появлению двух аморфных фаз, а в системе вода – диметилсульфоксид (ДМСО) – NaCl были обнаружены как ФПТЖ-Ж, так и последующая кристаллизация [3, 4].

Указанные системы содержат в своем составе криопротектор, но для понимания того, как его присутствие изменяет фазовое поведение раствора, что в свою очередь влияет на выживание клеток, и для понимания механизма действия криопротекторов, необходимо знать какие фазовые переходы происходят в базовой среде – 0,15 М водном растворе натрия хлорида.

Фазовая диаграмма (точнее диаграмма фазового равновесия) этой системы эвтектического типа хорошо известна [5]. Согласно ей в равновесных условиях в доэвтектической концентрации при понижении температуры до точки фазового перехода образуется лед, а оставшаяся часть раствора становится более концентрированной по NaCl. В точке эвтектики (23 % NaCl при $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$) выделение кристаллов NaCl и льда происходит одновременно.

Исходя из этого, в криобиологии утвердились представления о том, что вследствие образования льда клетки начинают контактировать с раствором более высокой тоничности, что должно приводить к их дегидратации [6, 7]. В теоретических и экспериментальных работах Е.А. Гордиенко, С.Е. Коваленко, Н.М. Шпаковой, С.С. Ершова, О.Е. Нипот также рассматривались только гипертонические растворы для суспендирования клеток [8, 9, 10, 11].

Равновесные условия предполагают, что изменение параметров состояния (здесь температура) происходит с бесконечно малой скоростью, и они являются научной абстракцией. Все реальные процессы протекают вдали от равновесия [12]. В неравновесных условиях могут появляться метастабильные фазы, не отображаемые на диаграммах фазового равновесия.

Часто в переохлажденных гомогенных растворах ниже некоторой температуры, как результат термодинамической неустойчивости, перед выделением кристаллических фаз происходит ФПТЖ-Ж, который называют ликвацией или расслаиванием раствора. Этот процесс характеризуется выделением каплевидных областей, отличных по химическому составу от матричной фазы [13, 14]. Различают стабильную и метастабильную ликвацию. Первая может иметь место выше линии ликвидуса, вторая только в подликвидусной области при переохлаждении. Термодинамика обоих видов ликвации одинакова, но кинетика их сильно различается. Скорость обмена веществом между фазами при метастабильной ликвации намного ниже из-за большей вязкости и в этом случае не происходит полного расслаивания раствора на два несмешивающихся между собой слоя, а образуется дисперсная система, где одна фаза распределена в другой. Процесс незавершенного расслаивания принято называть жидкостным фазовым разделением [15]. В этом случае анализировать химический состав сосуществующих фаз крайне затруднительно вследствие практической невозможности их механического разделения.

С.Я. Френкель и В.А. Каргин считают, что процессы кристаллизации при образовании новой фазы в полимерных растворах являются вторичными [16].

Наряду с этим, В.М. Залкиным [17] были сформулированы представления о превращении истинного водного раствора NaCl в коллоидный, мотивируемые изменением структуры воды при температурах немного превышающих 0 °C и приводящих к резкому снижению растворимости NaCl. Автор считает, что фазовая диаграмма системы вода – NaCl является неполной.

В случае ликвации в первоначально однофазном изотоническом растворе образуется две жидкие фазы с концентрацией NaCl как выше, так и ниже исходной, и, соответственно, отличающиеся по тоничности. Если в системе будут находиться клетки, то они потенциально могут реагировать на это путем обмена водой между цитоплазмой и суспендирующим раствором в сторону установления одинакового значения ее химического потенциала по обе стороны полупроницаемой клеточной мембраны.

Следствием процесса установления осмотического равновесия будет изменение клеточного объема, который уменьшится в клетках, находящихся в гипертонической фазе, и увеличится в гипотонической. Увеличение клеточного объема с высокой вероятностью может привести к осмотическому лизису и стать одним из факторов криоповреждений.

J.E. Tanner [5] при визуальном изучении процессов быстрого охлаждения растворов солей NaCl, KCl, CaCl₂ не учитывал неравновесность системы, и использованная им методика практически не позволяла наблюдать процесс фазового перехода в динамике, поскольку время охлаждения образца раствора толщиной около 20 мкм составляло порядка 0,1 с.

Цель работы – установить природу фазовых переходов в 0,15 М водном растворе NaCl при охлаждении в термодинамически неравновесных условиях, которые близки к реальным режимам криоконсервирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил 0,15 М (0,9 %) изотонический водный раствор NaCl производства “Лубныфарм”.

Микроскопические исследования процесса отогрева замороженного раствора проводили в капле объемом 25 мкл, наносимой на поверхность стеклянной чашки Петри, которая при свободном растекании по поверхности стекла имела диаметр 7-9 мм, что превышает поле зрения микроскопа при выбранном увеличении. Образцы охлаждались однократно путем обдува парами жидкого азота под объективом микроскопа из горловины сосуда Дьюара с высоты 20-30 мм над образцом без внесения затравок кристаллизации. Охлаждение объектов в программных замораживателях также производится парами сжиженного азота. Общее число экспериментов – 7.

Микроскопию в проходящем свете проводили на микроскопе PZO Warszawa (Польша) результаты фиксировали в видео режиме цифровой микроскопической камерой “LEVENHUK C 130” (Китай). Во всех случаях увеличение составляло $\times 80$. Промежутки времени определялись по видеограмме. В качестве объекта сравнения была выбрана бидистиллированная вода.

Зависимость температура – время (термический анализ по Курнакову) снимали в образцах раствора объемом 1 мл, помещенных в криопробирку “Nunc” (США) со скоростью охлаждения 2 градуса в минуту на программном замораживателе ЗП – 10 разработки и производства Специального конструкторского и технологического бюро с опытным производством (СКТБ с ОП) ИПКиК НАН Украины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На термограмме отогрева исследуемого раствора отсутствует температурная остановка (плато плавления), а регистрируется излом в диапазоне $-4^{\circ}\text{C} \div -1^{\circ}\text{C}$, что согласно принципу непрерывности и соответствия Н.С. Курнакова свидетельствует об имеющем место в системе фазовом превращении. Размытость по температуре характерна для растворов, которые изменяют свое фазовое состояние не в точке, а в определенном температурном диапазоне [18].

При охлаждении образца – капли исследуемого раствора, в поле зрения вначале появляются свободноплавающие частицы второй фазы, имеющие преимущественно округлые контуры (Рис. 1 и 2).

За время примерно 10 – 15 с их свободное плавание прекращается и формируется связнодисперсная система с четко выраженными частицами дисперсной фазы, которые разделены прослойками дисперсионной среды (Рис. 3).

При дальнейшем охлаждении на исходно однородной поверхности частиц дисперсной фазы (Рис. 3) наблюдается появление вогнутых участков (Рис. 4 и 5). Они появляются и исчезают в хаотическом порядке в пределах контура частиц. При продолжении охлаждения количество этих участков возрастает, и они уже не исчезают с поверхности, образуя как кратеры, так и поры (Рис. 4).

В какой-то момент появляется перемещающийся фронт фазового превращения (Рис. 5) (несколько выше пунктирной линии), приводящий к потускнению микроскопической картины за время порядка 6 с в поле зрения. После завершения этого процесса видимых изменений на поверхности частиц дисперсной фазы не наблюдалось.

При охлаждении контрольного объекта – бидистиллированной воды, которое описано в [19], наблюдается образование льда и выделение пузырей растворенного воздуха. Формирование второй фазы (льда) здесь протекает без видимых деформаций ее поверхности.

Морфологическая картина охлажденного образца с анизометрическими формами частиц дисперсной фазы характерна для аморфной грубодисперсной системы – высококонцентрированной эмульсии [20, 21].

Появление и исчезновение на начальном этапе вогнутых участков на поверхности частиц дисперсной фазы указывает на их жидкостную природу и подтверждает, что изучаемая система является эмульсией.



Рис. 1. Начальный этап формирования дисперсной системы.

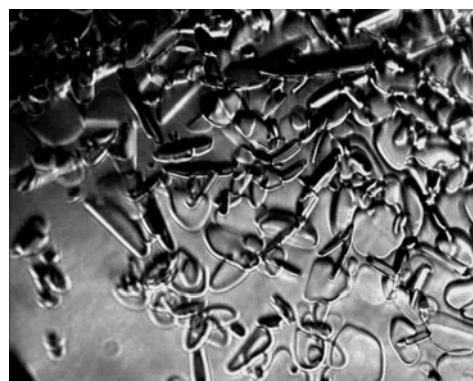


Рис. 2. Начальный этап формирования дисперсной системы. Второй эксперимент.

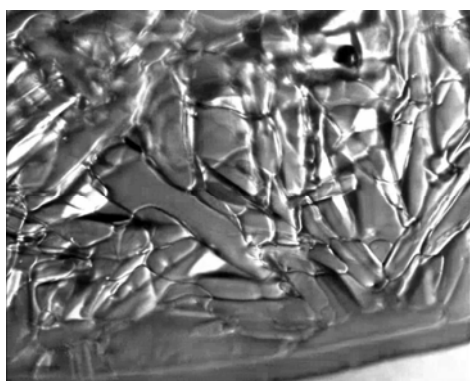


Рис. 3. Сформированная связнодисперсная система.

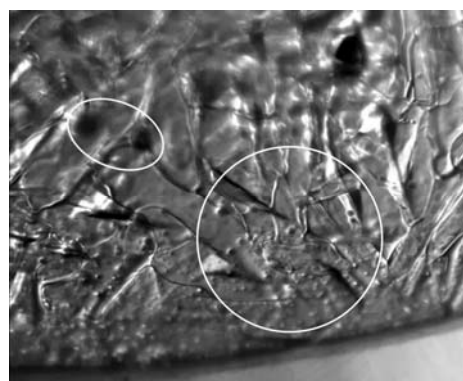


Рис. 4. Кратеры и поры в частицах дисперсной фазы – проявление процесса залечивания. Состояние через 50 с от состояния на Рис. 3.



Рис. 5. Кристаллизация дисперсной фазы (выше пунктирной линии). Состояние через 55 с от состояния на Рис. 4.

Такие явления происходят в результате обмена веществом между фазами в условиях термодинамической неравновесности. Изменение химического состава, особенно в растворах электролитов, ведет к изменению удельных показателей, в том числе объема [22]. Молекулы воды в растворе электролита находятся как в свободном состоянии, так и в составе гидратных оболочек, имеющих несколько слоев. При перемещении ион тянет их за собой, что приводит к изменению объема фазы на величину, значительно превышающую его собственный объем [23]. По мере повышения концентрации электролита увеличивается количество молекул воды, входящих в состав гидратной оболочки, в которой структура воды резко отличается от объемной из-за действия мощного электростатического поля иона, создающего в первой гидратной оболочке давление в десятки тысяч атмосфер [22]. Это приводит к изменению удельного объема, диэлектрической проницаемости и других показателей воды. Образование по мере концентрирования раствора электролита ионных двойников и тройников [23] в свою очередь также изменяет строение гидратных оболочек.

М.Н. Родниковой сформулированы представления о роли упругости пространственной сетки водородных связей ассоциированных растворителей, к которым относится и вода, в процессах выталкивания молекул примесей к местам нарушения структуры сетки и к фазовым границам, что вызывает образование областей повышенной концентрации одного из компонентов [24, 25].

Процессы переноса в растворах электролитов очень многообразны и сложны. Мощные электрические поля ионов способны сильно изменять структуру воды в своем окружении, влиять на ориентацию ее дипольных молекул и соответственно на удельные характеристики раствора [26]. Это же взаимодействие вполне может препятствовать образованию кристаллической решетки льда при охлаждении и, вероятно, что без предшествующего процесса ликвации в растворе кристаллизация воды вообще невозможна.

Помимо этих процессов на объем фазы влияет температурная зависимость плотности и частичное испарение молекул воды из образца.

Объем фазы изменяется пропорционально кубу линейных размеров, а площадь пропорционально квадрату, что приводит к появлению избытка поверхности и соответственно поверхностной энергии при уменьшении размера частицы. Этот избыток устраняется самопроизвольным переносом вещества с поверхности вовнутрь фазы под действием сил межмолекулярного взаимодействия. Такой релаксационный процесс адаптации фазовой поверхности к изменяющимся термодинамическим условиям получил название «залечивание» [27].

Наблюдаемая картина деформации поверхности дисперсной фазы, наиболее вероятно, является внешним проявлением этого процесса.

В начале проявления процесса залечивания наблюдается полное восстановление целостности поверхностного слоя, но по мере продолжения охлаждения вогнутые участки сохраняются, приводя к появлению сплошных пор и кратеров на поверхности частицы. Поверхностное натяжение увеличивается по мере удаления системы от критической температуры смещения, где оно имеет нулевое значение [21]. Повидимому, это приводит к увеличению вязкости раствора и замедлению процессов релаксации.

Формирование пористых структур в пленках раствора при фазовом распаде является частым явлением. Так, в частности, оно наблюдалось при изучении фазовых превращений в клеточном соке чеснока и в частицах дисперсной фазы в водных растворах глицерина при охлаждении-отогреве [19, 3]. Технология TIPS – thermally

induced phase separation – используется в процессе изготовления пористых мембран из пленок растворов полимеров [28].

После завершения фазового перехода, начальная стадия которого представлена на (Рис. 5), капля приобретает твердую консистенцию и в отличие ото льда, полученного из бидистиллированной воды, легко отделяется от стеклянной подложки что, вероятно, связано с гетерогенностью ее строения. Из этих наблюдений следует, что в системе произошел процесс кристаллизации. Оптически однородная среда дисперсной фазы эмульсии при этом мутнеет вследствие ее превращения в поликристалл, который обладает большим светорассеянием, чем исходная капля.

Несмотря на то, что образуемая эмульсия является метастабильной фазой, время ее существования может оказаться достаточным для проявления осмотических реакций со стороны находящегося в ней биообъекта.

В данном наблюдении от момента начала формирования эмульсии до кристаллизации прошло около 2,5 мин. Перед кристаллизацией система представляет собой высококонцентрированную эмульсию, в которой суммарный объем частиц жидкой дисперсной фазы значительно превышает объем также жидкой дисперсионной среды, которая вырождается в прослойки между ними. Исходя из этого ясно, что основной объем системы занимает фаза с меньшей концентрацией NaCl. Если в этих условиях в системе находилась бы клеточная суспензия, то большая часть клеток оказалась в гипотонической по отношению к цитоплазме среде, что потенциально способно вызвать осмотические повреждения.

При отогреве изучаемой системы на тепловой эффект процесса плавления льда накладывается тепловой эффект смешения воды с NaCl, что приводит к исчезновению на термограмме характерной для индивидуальных веществ температурной остановки (плато плавления) во время фазового перехода. При охлаждении ликвация и кристаллизация в системе протекают в весьма близких термодинамических условиях, что затрудняет их идентификацию на термограмме. Выраженные проявления ликвации имеют место в природе при замерзании морской воды [29].

ВЫВОДЫ

При охлаждении 0,15 М водного раствора натрия хлорида в неравновесных термодинамических условиях имеет место фазовый переход типа жидкость – жидкость (ликвация), приводящий к появлению метастабильной грубодисперсной системы – высококонцентрированной эмульсии.

При продолжении подвода хладагента к сформированной аморфной дисперсной системе происходит кристаллизация дисперсной фазы.

Жидкая дисперсная фаза, составляющая основной объем метастабильной системы, имеет концентрацию растворенного NaCl меньше, чем исходный изотонический раствор, и она будет гипотонична по отношению к цитоплазме живых клеток, что может стать повреждающим фактором при криоконсервировании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смит О. Биологическое действие замораживания и переохлаждения / О. Смит – М.: Изд-во иностранной литературы, 1963. – 503с. / Smit O. Biologicheskoe deystvie zamorajivaniya i pereohlajdeniya / O. Smit. – М.: Izd-vo inostrannoy literatury', 1963. – 503s.
2. Структурные изменения и фазовые переходы в водных растворах нитрата гадолиния в процессе их замораживания / Г.П. Вишневецкая [и др.] // Физика твердого тела. – 2003., том 45, вып. 7. С. 1263 – 1266. / Strukturny'e izmeneniya i fazovy'e perehody' v vodny'h rastvorah nitrata gadoliniya v processe ih zamorajivaniya / G.P. Vishnevskaya [i dr.] // Fizika tverdogo tela. – 2003., tom 45, vy'p. 7. S. 1263 – 1266./
3. Ходько А.Т. Критические явления, фазовые переходы и физические состояния в водно – глицериновых растворах при охлаждении – отогреве / А.Т. Ходько // Вісник Харківського національного

ун - ту. – 2012. – № 1026. – Хімія. Вип. 21 (44). – С. 177 – 184. / Hodko A.T. Kriticheskie yavleniya, fazovy'e perehody' i fizicheskie sostoyaniya v vodno – glicerinovy'h rastvorah pri ohlajdenii – otogreve / A.T. Hodko // Vi'snik Harki'vs'kogo naci'onaln'ogo un - tu. – 2012. – № 1026. – Hi'mi'ya. Vip. 21 (44). – S. 177 – 184.

4. Ходько А.Т. Фазовые превращения в криопротекторной системе вода-диметилсульфоксид / А.Т. Ходько // Вісник Харківського національного ун - ту. – 2014. – № 1136. – Хімія. Вип. 24 (47). – С. 118 – 125. / Hodko A.T. Fazovy'e prevrasch'eniya v krioprotekturnoy sisteme voda - dimetilsul'foksid / A.T. Hodko // Vi'snik Harki'vs'kogo naci'onaln'ogo uni'versitetu. – 2014. – № 1136. Hi'mi'ya. Vip. 24 (47). – S. 118 - 125.

5. Tanner J.E. Observation of rapid freezing of salt solutions / J.E. Tanner // Cryobiology. – 1975. – V. 12. – № 4. – P. 353 – 363.

6. Life in the frozen state / edited by Barry J. Fuller, Nick Lane, Erica E. Benson. Boca Raton London New York Washington. – 2004. – 663 p.

7. Низкотемпературная кристаллизация в биологических системах / Пушкарь Н.С. [и др.]. – К.: Наукова думка, 1972. – 242 с. / Nizkotemperaturnaya kristallizaciya v biologicheskikh sistemah / Pushkar' N.S. [i dr.]. – К.: Naukova dumka, 1972. – 242 s./

8. Шпакова Н.М. Гіпертонічний криогемоліз еритроцитів ссавців в електролітному та неелектролітному середовищі / Н.М. Шпакова, С.С. Ершов, О.Є. Ніпот // Біологія тварин. – 2010. – Т. 12. – № 2. – С. 524 – 530. / Shpakova N.M. Gi'pertonichniy kri'ogemoli'z eri'trociti'v ssavci'v v elektroli'tnomu ta neelektroli'tnomu seredovisch'i' / N.M. Shpakova, S.S. Ershov, O.E. Ni'pot // Bi'ologiya tvarin. – 2010. – T. 12. – № 2. – S. 524 – 530.

9. Шпакова Н.М. Гипертонический криогемоліз эритроцитов млекопитающих / Н.М. Шпакова, С.С. Ершов // Пробл. криобиологии. – 2006. – № 3. – С. 286-291. / Shpakova N.M. Gipertonicheskiy kriogemoliz e'ritrocitov mlekopitayusch'ih / N.M. Shpakova, S.S. Ershov // Probl. kriobiologii. – 2006. – № 3. – S. 286-291.

10. Гордиенко Е.А. Основные закономерности явления гипертонического криогемоліза / Е.А. Гордиенко, С.Е. Коваленко // Пробл. криобиологии. – 1997. – № 3. – С. 3-7. / Gordienko E.A. Osnovny'e zakonomernosti yavleniya gipertonicheskogo kriogemoliza / E.A. Gordienko, S.E. Kovalenko // Probl. kriobiologii. – 1997. – № 3. – S. 3-7.

11. Гордиенко Е.А. Биофизическая модель явления гипертонического криогемоліза / Е.А. Гордиенко, С.Е. Коваленко // Пробл. криобиологии. – 1996. – № 4. – С. 24-32. / Gordienko E.A. Biofizicheskaya model' yavleniya gipertonicheskogo kriogemoliza / E.A. Gordienko, S.E. Kovalenko // Probl. kriobiologii. – 1996. – № 4. – S. 24-32.

12. Кобеко П.П. Аморфные вещества / П.П. Кобеко. – М.– Л.: Изд-во АН СССР, 1952. – 432с. / Kobeko P.P. Amorfny'e veshchestva / P.P. Kobeko. – М. – Л.: Izd – vo AN SSSR, 1952. – 432s.

13. Андреев И.С. Явления ликвации в стеклах / И.С. Андреев, О.В. Мазурин, Е.А. Порай-Кошиц – Л.: Наука, 1974. – 220 с. / Andreev I.S. Yavleniya likvacii v steklah / I.S. Andreev, O.V. Mazurin, E.A. Poray-Koshic – L.: Nauka, 1974. – 220 s.

14. Фельц А. Аморфные и стеклообразные неорганические твердые тела: Пер. с нем. / А. Фельц – М: Мир, 1986. – 558с., ил. / Fel'c A. Amorfny'e i stekloobrazny'e neorganicheskie tverdye tela: Per. s nem. / A. Fel'c – М: Mir, 1986. – 558 s., il.

15. Дерябин В.А. Физическая химия дисперсных систем / В.А. Дерябин, Е.П. Фарафонтובה – Екатеринбург. Издательство Уральского университета, 2015. – 86 с. / Deryabin V.A. Fizicheskaya himiya dispersny'h system / V.A. Deryabin, E.P. Farafontova – Ekaterinburg. Izdatel'stvo Ural'skogo universiteta, 2015. – 86 s.

16. Бартепов Г.М. Физика полимеров / Г.М. Бартепов, С.Я. Френкель. – Л.: Химия, 1990. – 432 с. / Bartenev G.M. Fizika polimerov / G.M. Bartenev, S.Ya. Frenkel'. – L.: Himiya, 1990. – 432 s.

17. Залкин В.М. О превращении раствора NaCl в воде при низких температурах в коллоидный раствор / В.М. Залкин // Журнал физической химии. – 1995. – Т. 69. – № 2. – С. 379 – 382. / Zalkin V.M. O prevrasch'eniі rastvora NaCl v vode pri nizkih temperaturah v kolloidny'y rastvor / V.M. Zalkin // Jurnal fizicheskoy himii. – 1995. – t. 69. – № 2. – S. 379 – 382.

18. Ландау Л.Д. Статистическая физика. Часть 1. / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц – М: Наука. – 1976. – 584 с. илл. / Landau L.D. Statisticheskaya fizika. CHast' 1 / L.D. Landau, E.M. Lifshic – М: Nauka. – 1976. – 584 s. ill.

19. Ходько А.Т. Природа и динамика фазовых превращений при охлаждении – отогреве клеточного сока чеснока / А.Т. Ходько, Ю.С. Лысак // Біофізичний вісник. – 2014. – Вип. – 32 (2). – С. 48 – 60. / Hodko A.T. Priroda i dinamika fazovy'h prevrasch'eniі pri ohlajdenii - otogreve kletochnogo soka chesnoka / A.T. Hodko, YU.S. Ly'sak // Bi'off'izichniy vi'snik – 2014. – Vip. – 32 (2). – S. 48 - 60.

20. Бабак В.Г. Высококонцентрированные эмульсии. Физико-химические принципы получения и устойчивость / В.Г. Бабак // Успехи химии. – 77 (8). – 2008. – С. 729–756. / Babak V.G. Vy'sokokoncentrirrovannye e'mul'sii. Fiziko-himicheskie principy' polucheniya i ustoychivost' / V.G. Babak // Uspehi himii – 2008. – 77 (8). – S. 729 – 756.

21. Гельфман М.И. Коллоидная химия / М.И. Гельфман, О.В. Ковалевич, В.П. Юстратов – СПб.: Издательство “Лань”. – 2004. – 336 с. / Gel'fman M.I. Kolloidnaya himiya / M.I. Gel'fman, O.V. Kovalevich, V.P. Yustratov – SPb.: Izdatel'stvo “Lan”. – 2004. – 336 s.
22. Микулин Г.И. Вопросы физической химии растворов электролитов / Г.И. Микулин – Л.: Химия, 1968. – С. 126 – 139. / Mikulin G.I. Voprosy' fizicheskoy himii rastvorov e'lektrolitov / G.I. Mikulin – L.: Himiya, 1968. – S. 126 – 139.
23. Измайлов Н.А. Электрохимия растворов / Н.А. Измайлов Изд. 3 – е, испр., М.: Химия, 1976. – 488 с. / Izmaylov N.A. E'lektrohimiya rastvorov / N.A. Izmaylov Izd. 3 – e, ispr., M.: Himiya, 1976. – 488 s.
24. Родникова М.Н. Особенности растворителей с пространственной сеткой Н-связей / М.Н. Родникова // Журнал физич. химии. – 1993. – Т. 67. – № 2. – С. 275 – 280. / Rodnikova M.N. Osobennosti rastvoriteley s prostranstvennoy setkoy N-svyazey / M.N. Rodnikova // Jurnal fizich. himii. – 1993. – Т. 67. – № 2. – С. 275–280.
25. Структурная самоорганизация в растворах и на границе раздела фаз / Отв. ред. А.Ю. Цивадзе. – М: Издательство ЛКИ, 2008. – 544 с. / Strukturnaya samoorganizatsiya v rastvorah i na granice razdela faz / Отв. red. A.Yu. Civadze. - M: Izdatel'stvo LKI, 2008. – 544 s.
26. Эрдеи-Груз Т. Явления переноса в водных растворах / Т. Эрдеи-Груз Пер. с англ. – М: Мир, 1976. – 597 с., ил. / E`rdei-Gruz T. Yavleniya perenosa v vodny'h rastvorah / T. E`rdei-Gruz Per. s angl. – M: Mir, 1976. – 597 s., il.
27. Волынский А.Л. Залечивание межфазной поверхности в полимерных системах / А.Л. Волынский, Н.Ф. Бакеев // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2009. – Т. 51. – № 10. – С. 1783–1816. / Voly'nskiy A.L. Zalechivanie mejfaznoy poverhnosti v polimerny'h sistemah / A.L. Voly'nskiy, N.F. Bakeev // Vy'sokomolekulyarny'e soedineniya., Seriya A. – 2009. – Т. 51. – № 10. – С. 1783–1816.
28. Изучение формирования пористой структуры мембран при фазовом распаде раствора полиэтилсульфона / [Астахов Е.Ю. и др.] // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 2011. – Т. 53. – № 7. – С. 1090–1097. / Izuchenie formirovaniya poristoy struktury' membran pri fazovom raspade rastvora polie`tilsul'fona / [Astahov E. YU. I dr.] // Vy'sokomolekulyarny'e soedineniya, Seriya A. – 2011. – Т. 53. – № 7. – С. 1090–1097.
29. Лед и снег. Свойства, процессы, использование. Под ред. У.Д. Кингери. Пер. с англ. – М: Мир, 1966. – 480 с., ил. / Led i sneg. Svoystva, processy', ispol'zovanie. Pod red. U.D. Kingeri. Per. s angl. – M: Mir, 1966. – 480 s., il.

УДК 577 + 591.3 + 615.2

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ ТА ДИСПЕРСІЙНИЙ АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ
ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНИХ ФЕРМЕНТІВ У ЗАРОДКАХ В'ЮНА
MISGURNUS FOSSILIS L. ЗА ВПЛИВУ ФЛУРЕНІЗИДУ**

Н.О. Боднарчук, Н.П. Гарасим, Л.І. Петрух, Д.І. Санагурський

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна

e-mail: nataljabodnarchuk@ukr.net

Надійшла до редакції 1 грудня 2015 року

Прийнята 17 грудня 2015 року

Метою роботи було вивчення впливу флуренізида (препарату протимікробної, протитуберкульозної, антихламідійної, імуномодуючої, антиоксидантної, гепатопротекторної, протизапальної, протівірусної дії) на антиоксидантний гомеостаз зародків в'юна (*Misgurnus fossilis L.*) впродовж раннього ембріогенезу. Досліджено глутатіонпероксидазну й глутатіон-S-трансферазну активність (ферментів, робота яких пов'язана з наявністю в клітинах відновленого глутатіону і які зумовлюють знешкодження пероксиду водню, гідропероксидів та ксенобіотиків, в тому числі і лікарських препаратів) за дії флуренізида, в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ, у зародків в'юна на етапі розвитку першого (2 бластомери), четвертого (16 бластомерів), шостого (64 бластомери), восьмого (256 бластомери), десятого (1024 бластомерів) поділу зиготи (до стадії десинхронізації). Проведено двофакторний дисперсійний аналіз, з метою виявлення ступеня впливу дії флуренізида, часу розвитку та неврахованих факторів, на активність ферментів глутатіонової системи антиоксидантного захисту клітини. Встановлено, що флуренізид порушує роботу глутатіонпероксидази на всіх етапах розвитку зародків в'юна, зокрема зумовлює зростання її активності на етапі розвитку 2, 16 і 256 бластомерів. Досліджуваний антибіотик порушує роботу глутатіон-S-трансферази у процесі раннього ембріогенезу зародків в'юна *Misgurnus fossilis L.* впродовж досліджу. У максимальній концентрації (15 мМ) він веде до спадання ензиматичної активності, починаючи з початкових етапів розвитку зародків в'юна. За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що на глутатіонпероксидазну та глутатіон-S-трансферазну активність зародків в'юна значний вплив чинять невраховані фактори, до яких можуть належати зовнішні чинники при яких відбувається розвиток зародків. Час розвитку, більшою мірою, впливає на роботу глутатіонпероксидази впродовж раннього ембріогенезу, порівняно з флуренізидом, що свідчить про опосередкований вплив досліджуваного антибіотика на глутатіонпероксидазу. На глутатіон-S-трансферазну активність значний вплив чинить флуренізид, що свідчить, про його пряму дію на структуру ензиму.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: зародки в'юна, флуренізид, ембріогенез, глутатіонпероксидаза, глутатіон-S-трансфераза.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ И ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ
ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ В ЗАРОДЫШАХ ВЬЮНА
MISGURNUS FOSSILIS L. ПРИ ВЛИЯНИИ ФЛУРЕНИЗИДА**

Н.А. Боднарчук, Н.П. Гарасым, Л.И. Петрух, Д.И. Санагурский

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4, г. Львов., 79005, Украина

Целью работы было изучение влияния флуоренизида (препарата противомикробного, противотуберкулезного, антихламидийного, иммуномодулирующего, антиоксидантного, гепатопротекторного, противовоспалительного, противовирусного действия) на антиоксидантный гомеостаз зародышей вьюна (*Misgurnus fossilis L.*) на протяжении раннего эмбриогенеза. Исследована глутатион-пероксидазная и глутатион-S-трансферазная активность ферментов, работа которых связана с наличием в клетках возобновленного глутатиона, и которые определяют обезвреживание пероксида водорода, гидропероксида и ксенобиотиков, в том числе и лекарственных препаратов под действием флуоренизида в концентрациях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ у зародышей вьюна на этапе развития первого (2 бластомера), четвертого (16 бластомеров), шестого (64 бластомера), восьмого (256 бластомеров), десятого (1024 бластомеров) деления зиготы (до стадии десинхронизации). Проведен двухфакторный дисперсионный анализ с целью выяснения степени влияния действия флуоренизида, времени развития и неучтенных факторов на активность ферментов глутатионової системи антиоксидантної захисту клітки.

Установлено, що флуренизид порушує роботу глутатионпероксидази на всіх етапах розвитку зародків вьюна, в частині передопределяє рост її активності на етапі розвитку 2, 16 і 256 бластомерів. Исследуемый антибиотик нарушает работу глутатион-S-трансферазы в процессе раннего эмбриогенеза зародков вьюна *Misgurnus fossilis L.* на протяжении опыта. В максимальной концентрации (15 мМ) он ведет к снижению активности энзима, начиная с начальных этапов развития зародков вьюна. С помощью двухфакторного дисперсионного анализа установлено, что на глутатионпероксидазную и глутатион-S-трансферазную активность зародков вьюна значительное влияние оказывают неучтенные факторы, к которым могут принадлежать внешние факторы, при которых происходит развитие зародков. Время развития в большей степени влияет на работу глутатионпероксидазы на протяжении раннего эмбриогенеза, сравнительно с флуренизидом, что свидетельствует об опосредованном влиянии исследуемого антибиотика на глутатионпероксидазу. На глутатион-S-трансферазную активность значительное влияние оказывает флуренизид, что свидетельствует о его прямом действии на структуру энзима.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: зародки вьюна, флуренизид, эмбриогенез, глутатионпероксидаза, глутатион-S- трансфераза.

COMPARATIVE AND VARIANCE ANALYSIS OF ACTIVITY OF GLUTATION DEPENDENT ENZYMES IN LOACH *MISGURNUS FOSSILIS L.* EMBRYOS UNDER THE INFLUENCE OF FLURENIZYD

N.O. Bodnarchuk, N.P. Harasym L.I. Petrukh, D.I. Sanagurski

Ivan Franko National University of L'viv, 4 Hrushevskogo St., Lviv, 79005, Ukraine

The aim of work was to study the influence of flurenizyd (antimicrobial, antituberculosis, antichlamydia, immunomodulatory, antioxidant, hepatoprotective, anti-inflammatory medicine) on the antioxidant homeostasis of loach embryos (*Misgurnus fossilis L.*) during early embryogenesis. Glutathioneperoxidase and glutathione-S-transferase activity was studied under the action of flurenizyd in concentrations 0.01; 0.05; 0.15; 1; 5; 15 mM, at the embryos of loach on the stage of development of the first (2 blastodmeres), fourth (16 blastodmeres), sixth (64 blastodmeres), eighth (256 blastodmeres), tenth (1024 blastodmeres) division of zygote (before the stage of de-synchronization). The two-factor analysis of variance was conducted to figure out the degree of flurenizyd influence, time of development and miscellaneous factors on activity of the enzymes of cell's glutathione antioxidant defence system. It was shown that flurenizyd violates work of glutathioneperoxidase on all stages of development of loach embryos in particular predetermines the increase of their activity on the stage of development of 2, 16 and 256 blastomeres. The investigated antibiotic violates work of glutathione-S-transferase in the process of early embryogenesis of loach embryos *Misgurnus fossilis L.* In a maximal concentration (15 mM) flurenizyd decreases activity of enzyme, starting from the initial stages of development of loach embryos. Two-factor analysis of variance indicated, that on glutathioneperoxidase and glutathione-S-transferase activity of loach embryos considerable influence is made by the miscellaneous factors, like external factors affecting the development of embryos. Time of development, in a greater degree, influences the work of glutathioneperoxidase during early embryogenesis, compared to flurenizyd that indicates indirect influence of the investigated antibiotic on glutathioneperoxidase. Considerable influence of flurenizyd on glutathione-S-transferase activity testifies its direct effect on a structure of the enzyme.

KEY WORDS: Loach embryos, flurenizyd, embryogenesis, glutathioneperoxidase, glutathione-S-transferase.

У формуванні антиоксидантного ефекту важливу ланку займає глутатионова система антиоксидантного захисту організму, до якої належить глутатион, глутатионпероксидаза (ГПО), глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза тощо. Глутатион є основним компонентом цієї системи, який неферментативним шляхом інактивує H_2O_2 та інші активні форми кисню [1]. В організмі він бере участь у метаболізмі ксенобіотиків, регулює проліферацію клітин, впливає на синтез нуклеїнових кислот і білків, а також на активність ферментів. Дефіцит глутатиону в клітинах призводить до активації процесів ліпопероксидації [2, 3]. Глутатионзалежні ферменти під час своєї роботи перетворюють відновлену форму глутатиону в окиснену. Для того, щоб у клітинах був необхідний рівень відновленого глутатиону, глутатионредуктаза (локалізується у мітохондріальному матриксі та цитозолі) перетворює окиснену його форму у відновлену [2]. ГПО – селенумісний ензим, який

каталізує руйнування гідропероксидів ліпідів нерадикальним шляхом за допомогою відновленого глутатіону. У більшій мірі цей фермент локалізується у цитозолі (приблизно 70%) і лише 30% – у матриксі мітохондрій. У складі глутатіонової системи антиоксидантного захисту варто виділити підсистему глутатіон-S-трансфераз (GST). Це група ферментів, яка є важливим компонентом системи детоксикації шкідливих метаболітів та ксенобіотиків. Відомо, що стан глутатіонової системи антиоксидантного захисту організму залежить від багатьох факторів, зокрема від амінокислотного забезпечення, а також вмісту в організмі аскорбінової кислоти, токоферолу, ретинолу, селену тощо.

У медичній практиці використовують новий клас ліків – похідні флуорену (трициклічного ароматичного ядра). До них належать відомі противірусні препарати Флореналь і Аміксин [4, 5–7]. Флореналь – бісульфітна сполука 2-флуоренонілглюксалу, що нейтралізує дію *Herpes simplex*, *Herpes zoster* і застосовується в офтальмології для лікування вірусних захворювань очей. Аміксин (синоніми: Тилорон, 2,7-біс-[2-діетиламіноетокси]-флуоренону-9 дигідрохлорид) – низькомолекулярний індуктор ендogenous інтерферону. Він є противірусним засобом та імуномодулятором, ефективним проти всіх збудників гострих респіраторних вірусних інфекцій. Пошук серед флуоренів, високоефективних субстанцій широкого спектра дії, привів до створення флуренізиду (N-9-флуореніліден-N'-ізонікотиногідрозиду) (рис. 1) – препарату протимікробної, протитуберкульозної, антихламідійної, імуномодулюючої, антиоксидантної, гепатопротекторної, протизапальної, противірусної дії [7, 8]. Противірусний ефект флуренізиду вивчено *in vitro* та *in ovo* щодо вірусу грипу птахи типу Росток/34 (H7N1) та вірусу хвороби Ньюкасла. Найближчим аналогом флуренізиду за структурою та дією є Аміксин, котрий відрізняється фармакологічними властивостями. Показники противірусної дії флуренізиду (відносно вірусу грипу птахів) у системах *in vitro* та *in ovo* перевищують такі для аміксину.

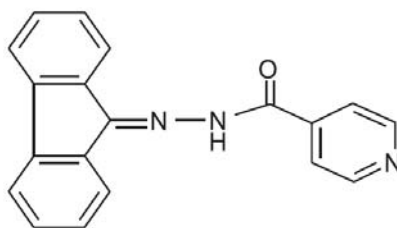


Рис. 1. Структурна формула флуренізиду

Флуренізид є українським препаратом (реєстраційне посвідчення № Р.10.00/02305 від 12.10.2000 р.), який випускається у вигляді порошку, таблеток і супозиторіїв вагінальних [2, 5]. Відомо, що цей антибіотик не чинить негативного впливу на рівень еритроцитів, гемоглобіну і тромбоцитів периферичної крові, функцію печінки та нирок. Проте залишається недостатньо вивченою його дія на антиоксидантний стан клітин на ранніх стадіях розвитку.

Метою даного дослідження є вивчити зміну активності ГПО та GST на різних етапах розвитку зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) за дії флуренізиду різних концентрацій.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на зародках в'юна *Misgurnus fossilis* L. Коротка тривалість періоду ембріогенезу, легкість отримання статевих продуктів і відсутність труднощів в

утриманні цих риб у лабораторних умовах пояснюють їхню популярність. Відносно великі розміри яйцеклітини дозволяють спостерігати за періодами розвитку після запліднення і контролювати кожен з етапів поділу під бінокулярно [9].

Яйцеклітини отримували і запліднювали за методом Нейфаха [9]. Для отримання ікри, самкам внутрішньом'язово вводили хоріонічний гонадотропін за 24–48 годин до проведення експерименту. Доза гормону становила від 250 міжнародних одиниць (лютий–червень) до 500 (з жовтня). Самця декапітували, сім'яники подрібнювали і заливали відстояною водопровідною водою. Усі досліди з в'юнами проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Запліднення ікри проводили в чашках Петрі, додаючи суспензію спермій. Для задовільного запліднення ікри контакт із спермою становив 5–10 хв. Потім запліднену ікру відмивали від спермій та інкубували за температури 21–22°C у розчині Гольфрета. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Дослідження проводили на зародках в'юна, які відповідали: першому поділу зиготи (2 бластомери); четвертому (16 бластомерів); шостому (64 бластомери); восьмому (256 бластомерів); десятому (1024 бластомери). Через 5–10 хв після запліднення відмиті зиготи інкубували у фізіологічному розчині Гольфрета ($t = 20\text{--}22^\circ\text{C}$), який містив розчин флуренізиду (використовували новосинтезовану професором Петрух Л.І. у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького субстанцію) в концентраціях 0,01; 0,05; 0,15; 1; 5; 15 мМ. Згідно Державної фармакопеї України флуренізид першопочатково розчиняли диметилсульфоксидом, (оскільки він в цій речовині легко розчинний) у співвідношенні 1:2, після чого доводили розчином Гольфрета до відповідних концентрацій [5]. У відібраних зразках визначали активність ензимів антиоксидантного захисту: ГПО [10] та ГТ [11]. Концентрацію білка в кожному зразку визначали за методом Лоурі [12].

Перевірку нормальності вибірки здійснювали за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова з використанням пакета аналізу SPSS (Statistics17). Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програми „Excel-2007” для Windows.

Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $p \geq 0,95$ (або рівні значимості $P < 0,05$), $p \geq 0,99$ (або рівні значимості $P < 0,01$), $p \geq 0,999$ (або рівні значимості $P < 0,001$). За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу розраховували частку впливу флуренізиду, часу розвитку та неврахованих чинників на активність досліджуваних ферментів у зародках в'юна. Результати дослідження представлені у вигляді рисунків.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Нами встановлено, що флуренізид у низьких концентраціях 0,01 мМ, 0,05 мМ, а також в максимальній досліджуваній концентрації (15 мМ), зумовлює значне зростання ГПО активності (на 435%, 169% та 151% відповідно) на етапі розвитку зародків в'юна 2 бластомерів. На стадії 16 бластомерів відмічено зростання активності цього ензиму за впливу флуренізиду у концентрації 0,15 мМ на 129%. Потрібно зазначити, що за дії флуренізиду у інших досліджуваних концентраціях у зародках в'юна на цій стадії розвитку виявлено тенденцію до зростання ГПО активності, порівняно з контролем (рис. 2). На етапі розвитку 64 бластомерів виявлено переважаюче пониження ГПО активності, проте ці зміни є недостовірними (рис. 3). Значуще зростання ГПО активності на 155% виявлено на стадії 256 бластомерів за дії флуренізиду в концентрації

15 мМ (рис. 3). Зростання ГПО активності пов'язане з реакцією знешкодження пероксиду водню, детоксикацією інших пероксидів, насамперед ліпідних, що входять до складу біомембран [13]. Подальший розвиток зародків у середовищі з флуренізидом зумовлює спадання глутатіонпероксидазної активності, на етапі розвитку 1024 бластомерів, за концентрацій антибіотика 0,15 мМ, 1 мМ, 5 мМ, та 15 мМ порівняно з контролем (рис. 4).

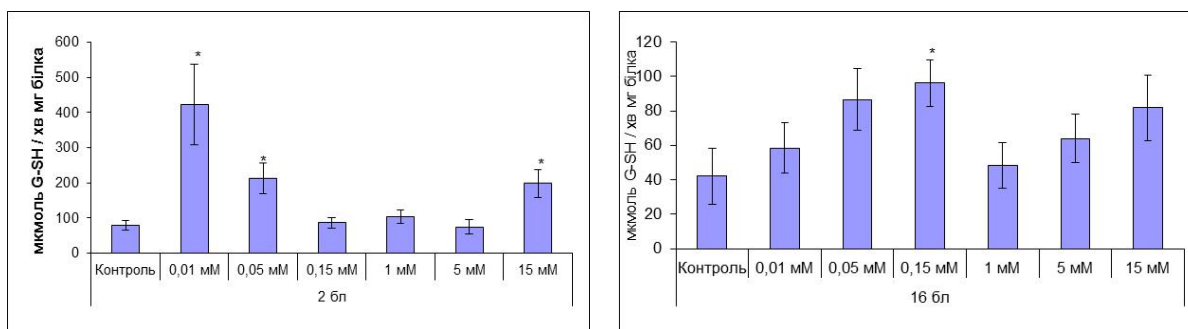


Рис. 2. Глутатіонпероксидазна активність зародків в'юна на етапі розвитку 2 та 16 бластомерів за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$).

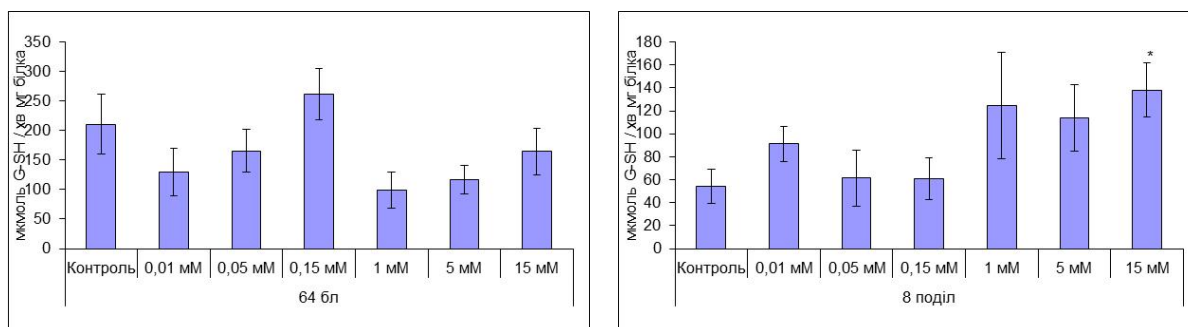


Рис. 3. Глутатіонпероксидазна активність зародків в'юна на етапі розвитку 64 та 256 (8 поділ) бластомерів за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$).

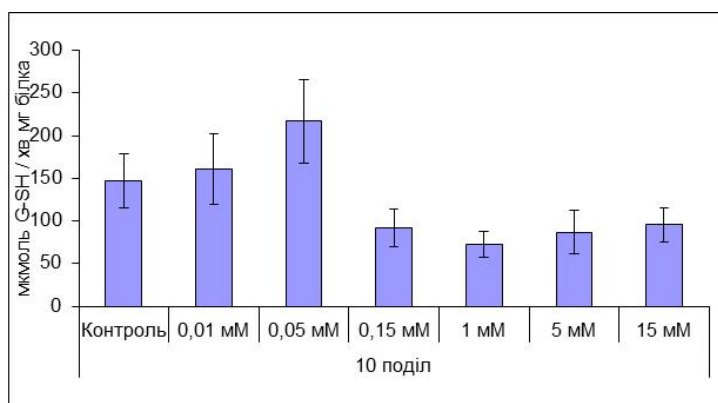


Рис. 4. Глутатіонпероксидазна активність зародків в'юна на етапі розвитку 1024 бластомерів (10 поділ) за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ.

Отже, флуренізид зумовлює, більшою мірою, зростання ГПО активності на етапі розвитку зародків в'юна 2, 16, 256 бластомерів, тоді як на етапі розвитку 64 і 1024

бластомери – спадання активності. Проте пониження роботи ГПО достовірно не підтверджене, що дає змогу твердити, що флуренізид не зумовлює його ушкодження.

Відомо, що ГПО може відновлювати гідропероксиди вільних жирних кислот, гідропероксиди фосфоліпідів, естерифікованих жирних кислот окисненням глутатіону, який відновлюється НАДФН-залежним ферментом глутатіонредуктазою. В усіх клітинах міститься глутатіон, який є найпоширенішою сульфгідрильною сполукою. За допомогою відновленого глутатіону здійснюється детоксикація H_2O_2 і гідропероксидів, які утворюються у ході реакції активних радикалів кисню з ненасиченими жирними кислотами мембран [5]. Незакономірні зміни роботи ГПО за дії флуренізиду різних концентрацій можуть свідчити про недостатній вміст вільного глутатіону в зародкових клітинах на певних етапах розвитку.

Враховуючи те, що GST знешкоджує лікарські речовини, а також входить до глутатіонової системи антиоксидантного захисту (як і ГПО) важливо вивчити її активність у зародках в'юна за дії флуренізиду. Подібно до ГПО, GST активність зростає на 341 % на стадії розвитку зародків в'юна 2-ох бластомерів за низької досліджуваної концентрації флуренізиду (0,01 мМ) (рис. 5). Проте у високій концентрації (15 мМ) цей антибіотик зумовлює пониження роботи цього ензиму (на 30%). На стадії 16 бластомерів нами виявлено достовірне спадання GST активності за впливу флуренізиду у концентраціях 0,15 мМ, 1 мМ, 15 мМ на 41 %, 44%, 35 % відповідно, порівняно з контролем (рис. 5). Треба відмітити, що флуренізид у низьких досліджуваних концентраціях (0,05 мМ), на стадії 64 бластомерів, веде до зростання GST активності (на 60%), тоді як вищі концентрації (1мМ, 15мМ) зумовлюють тенденцію до спадання активності цього ферменту порівняно з контролем (рис. 6). Важливо зазначити, що на стадії 8 поділу зародкових клітин відбувається спадання GST активності, в середньому, на 32%. Значне достовірне зниження активності цього ферменту виявлено також на стадії 10 поділу зародків за дії флуренізиду у концентраціях 1мМ, 5мМ, 15мМ (на 67%, 62% та 56% відповідно) (рис. 7).

Отже, флуренізид порушує роботу GST у процесі раннього ембріогенезу зародків в'юна *Misgurnus fossilis L.* на всіх досліджуваних етапах розвитку. Цей антибіотик у високих концентраціях зумовлює переважаюче спадання GST активності, у більшій мірі, на етапі розвитку зародків 256 та 1024 бластомерів (рис 6, 7). Флуренізид у максимальній концентрації (15 мМ) призводить до спадання ензиматичної активності, починаючи з початкових етапів розвитку зародків в'юна, що свідчить про слабку інактивацію досліджуваного антибіотика цим ферментом. Відомо, що другу фазу знешкодження шкідливих речовин (в тому числі і лікарських) забезпечують реакції кон'югації, в процесі яких відбувається приєднання до функціональних груп, що утворилися на першому етапі (при мікросомальному окисненні), інших молекул чи груп ендogenous походження, які збільшують гідрофільність і зменшують токсичність ксенобіотиків [14]. GST, власне, забезпечує реакції кон'югації, тому спадання її активності розглядається як негативний процес. У науковій літературі є відомості, що GST інгібується продуктами фосфоліпазного гідролізу, зокрема, вільними жирними кислотами, тоді як ГПО, навпаки, є повністю резистентною до їхньої дії [14]. Ймовірно, флуренізид зумовлює утворення вільних жирних кислот, що й спричиняє порушення роботи, більшою мірою, GST.

За допомогою двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що на ГПО та GST активність зародків в'юна значний вплив чинять невраховані фактори, до яких можуть належати зовнішні чинники при яких відбувається розвиток (лабораторні умови) (рис. 8). Час розвитку, більшою мірою, впливає на роботу ГПО (частка впливу 28%) впродовж раннього ембріогенезу, порівняно з флуренізидом. Це може свідчити,

що досліджуваний антибіотик не справляє прямого впливу на ГПО. На GST активність значний вплив чинить флуренізид (частка впливу 41%), що свідчить, ймовірно, про, його дію на структуру ензиму.

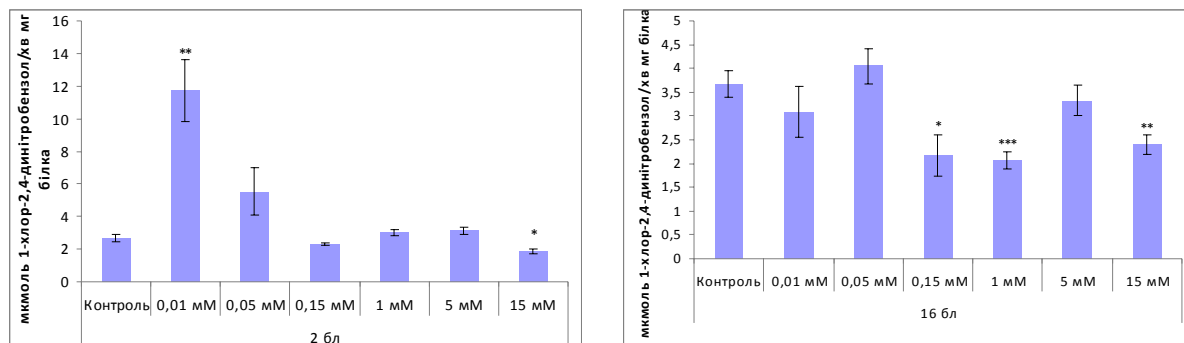


Рис. 5. Глутатіон-S-трансферазна активність зародків в'юна на етапі розвитку 2 та 16 бластомерів за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$).

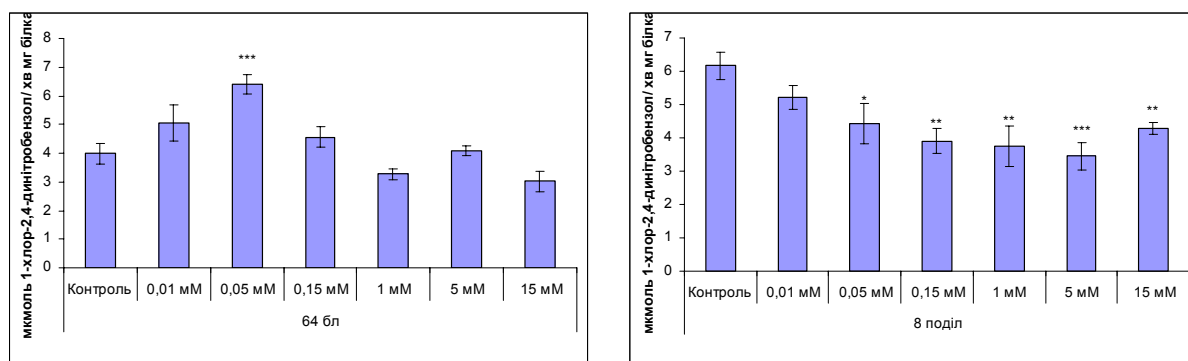


Рис. 6. Глутатіон-S-трансферазна активність зародків в'юна на етапі розвитку 64 та 256 (8 поділ) бластомерів за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$; *** – $p \geq 0,999$).

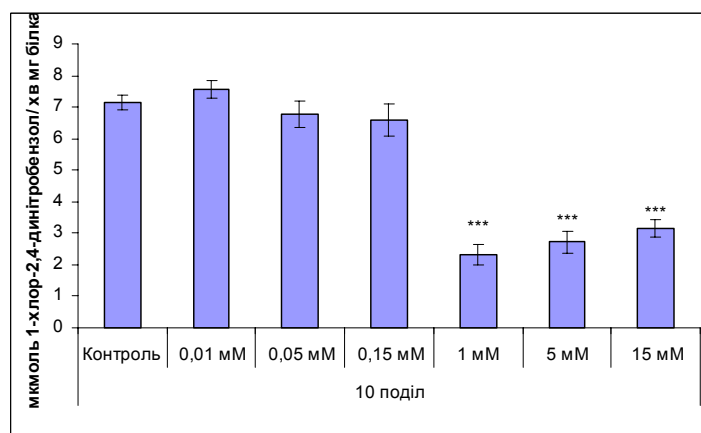


Рис. 7. Глутатіон-S-трансферазна активність зародків в'юна на етапі розвитку 1024 бластомерів (10 поділ) за дії флуренізиду в діапазоні концентрацій 0,01÷15 мМ (*** – $p \geq 0,999$).

Відомо, що у відкритому ланцюзі молекули флуореніду міститься гідразидне угруповання з двома структурно різними атомами азоту. Один з них з'єднаний подвійним зв'язком ($=C=N-$) з флуореновим ядром, а другий ($-NH-$)-із залишком ізонікотинової кислоти, що здатні взаємодіяти з різними біоструктурами та змінювати їх специфічну дію. Флуоренід здатний проникати, крізь цитоплазматичну мембрану клітини, в цитоплазму і зв'язуватися зі специфічним рецептором. Утворений активований комплекс флуоренід-рецептор проникає у ядро клітини, сполучається з ДНК і стимулює утворення інформаційної РНК. У результаті трансляції РНК на рибосомах синтезуються різні регуляторні білки. Проте у зародкових клітинах до десятого поділу не відбувається синтезу іРНК, а використовується іРНК, закладена ще материнським організмом. Тому під час розвитку зародків використовуються тільки наявні ферменти ГПО і GST.

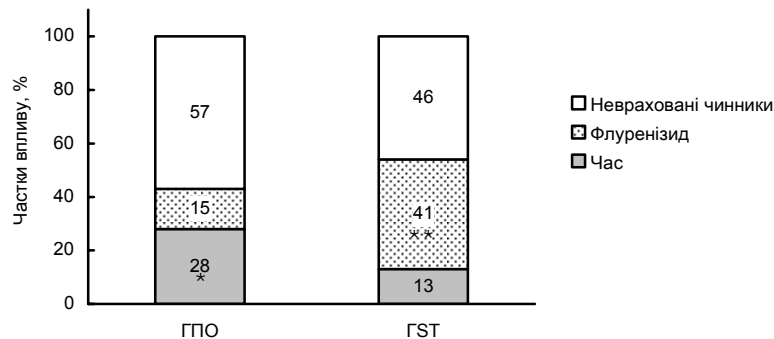


Рис. 8. Частки впливу флуореніду, часу розвитку та неврахованих чинників на глутатіонпероксидазну та глутатіон-S-трансферазну активність зародків в'юна (* – $p \geq 0,95$; ** – $p \geq 0,99$)

Отже, провівши порівняльний та дисперсійний аналіз встановлено, що за дії флуореніду відбувається порушення роботи як ГПО, так і GST. ГПО менш виражено ушкоджується, тоді як ензим GST виявився, більшою мірою, чутливим до цього антибіотика. Відомо, що узгоджена робота GST та ГПО попереджає прогресування пероксидації та накопичення вторинних метаболітів у клітинах [15], тому зміни функціонування цих ферментів за дії флуореніду може призвести до інтенсифікації вільнорадикальних процесів.

ВИСНОВКИ

1. Флуоренід зумовлює зростання ГПО активності на етапі розвитку зародків в'юна 2, 16, 256 бластомерів, тоді як на етапі розвитку 64 і 1024 бластомери веде до переважаючого пониження її роботи.
2. Досліджуваний антибіотик порушує роботу GST у процесі раннього ембріогенезу зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. У високих концентраціях він зумовлює переважаюче спадання GST активності на етапі розвитку 256 та 1024 бластомерів.
3. Флуоренід у концентрації 15 мМ веде до спадання GST активності упродовж досліджу.
4. Двофакторний дисперсійний аналіз дозволив встановити, що на GST активність значний вплив чинить флуоренід, тоді як на ГПО активність більший вплив має час розвитку зародків в'юна.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Процеси перекисного окиснення ліпідів у живих організмах : монографія / Н. П. Головчак, А. В. Тарновська, Г. І. Коцюмбас, Д. І. Санагурський.– Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2012. – 250 с. / *Procesi perekisnogo okisnennja lipidiv u zhivih organizmah : monografija / N. P. Golovchak, A. V. Tarnovska, G. I. Kocjumbas, D. I. Sanagurs'kij. – L'viv : LNU imeni Ivana Franka, 2012. – 250 s.*
2. Данчук В.В. Пероксидне окиснення у сільськогосподарських тварин і птиці / В.В. Данчук. – Кам'янець-Подільський: Абетка, 2006. – 192 с. / *Danchuk V.V. Peroksidne okisnennja u sil'skogospodars'kih tvarin i ptici. / V.V. Danchuk. – Kam'janec'-Podil's'kij: Abetka, 2006. – 192 s.*
3. Activities of Superoxide Dismutase and Catalase in Erythrocytes and Plasma Transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) Exposed to Cadmium / R.V. Zicic, A.S. Stajn, S.Z. Pavlovic, et al. // *Physiol. Res.* – 2001. – V. 50. – P. 105–111.
4. Михалик О. Сучасні лікарські засоби для хеміотерапії вірусних інфекцій. / О. Михалик – Львів, 2013. 180 с. / *Mihalik O. Suchasni likars'ki zasobi dlja hemioterapii virusnih infekcij. / O. Mihalik. – L'viv, 2013. 180 s.*
5. Петрух Л.І. Фруорени як туберкулостатики. Флуренізид: мікробіологічні, фармакологічні і клінічні аспекти / Л.І. Петрух ; Нац. ун-т «Львів. політехніка». – Львів : Вид-во Нац. ун-ту «Львів. політехніка», 2008. – 463 с. / *Petruh L.I. Fruoreni yak tuberkulostatiki. Flurenizid: mikrobiologichni, farmakologichni i klinichni aspekti / L.I. Petruh ; Nats. un-t «L'viv. politehnika». – L'viv : Vid-vo Nats. un-tu «L'viv. politehnika», 2008. – 463 s.*
6. Петрух Л.І. Флуренізид для ветеринарної практики / Л.І. Петрух // Сучасні проблеми ветеринарної медицини, продукції зооінженеринг тварини і технологій : зб. матеріалів міжнародної науково-практичної конференції, 1997. – С. 216–217. / *Petruh L.I. Flurenizid dlya veterinarnoї praktiki / L.I. Petruh // Suchasni problemi veterinarnoї medicini, produkції zoоengineering tvarini i tehnologiy : zb. materialiv mizhnarodnoї naukovo-praktichnoї konferentsii, 1997. – P. 216–217.*
7. Petruh L.I. Pharmaceutical education and language / L.I. Petruh // *The achievements of pharmaceutical research.* – 2011. – № 1. – P. 152.
8. Petruh L.I. The urgency of the creation and implementation of industrial production of new medicines / L.I. Petruh // *Collection descriptions of inventions.* – 2003. – № 2. – P. 198.
9. Нейфак А. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития / Нейфак А., Тимофеева М. - М.: Наука. - 1978. - 336 с. / *Nejfah A. Problemy reguljacji v molekularnoj biologii razvitija / Nejfah A., Timofeeva M. - M.: Nauka. - 1978. - 336 s.*
10. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // *Лабораторное дело.* – 1986. – № 2. – С. 724–727. / *Moin V.M. Prostoj i specificheskij metod opredelenija aktivnosti glutathionperoksidazy v jeroitocitah / V.M. Moin // Laboratornoe delo. – 1986. – № 2. – S. 724–727.*
11. Habig W.H. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Parst, W.B. Jakovb // *Journal of Biological Chemistry.* – 1974. – V. 249 (22). – P. 7130–7139.
12. Lowry O. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. Lowry // *Journal of Biological Chemistry.* – 1951. – V. 193 (1). – P. 404–415.
13. Зинь А.Р. Вплив гіпохлориту натрію на прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу / А.Р. Зинь, Н.П. Головчак, А.В. Тарновська, М.Б. Галан, Д.І. Санагурський // *Біологічні студії / Studia Biologica.* – 2012. – Т.6, №1. – С. 67–76. / *Zin' A.R. Vpliv gipohloritu natriyu na prooksidantno-antioksidantnij gomeostaz zarodkiv v'yuна protyagom rannioго embriogenezu / A.R. Zin', N.P. Golovchak, A.V. Tarnovska, M.B. Galan, D.I. Sanagurs'kij // Biologichni studii/Studia Biologica. – 2012. – T.6, №1. – S. 67–76.*
14. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. ; – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с. / *Men'schikova E.B. Okislitel'nyj stress. Prooksidanty i antioksidanty / Men'schikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. ; – M.: Firma «Slovo», 2006. – 556 s.*
15. Філінська О.М. Стан антиоксидантної системи печінки та вміст матриксної металопротеїнази-2 товстого кишечника у разі дії похідного малеїміду за експериментального колоректального канцерогенезу щурів / О.М. Філінська, С.В. Яблонська, С.Я. Мандрик, І.В. Харчук, Г.В. Островська, В.К. Рибальченко // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – Т. 82, № 4. – С. 69–77. / *Filins'ka O.M. Stan antioksidantnoї sistemi pechinki ta vmist matriksnoї metaloproteїnazi-2 товstogo kishechnika u razi дії pohidnogo maleimidu za eksperimental'nogo kolorektal'nogo kancerogenezu schuriv / O.M. Filins'ka, S.V. Yablons'ka, S.Ya. Mandrik, I.V. Harchuk, G.V. Ostrovs'ka, V.K. Ribal'chenko // Ukr. biohim. zhurn. – 2010. – T. 82, № 4. – S. 69–77.*

ПАМ'ЯТИ БОРИСА ГРИГОРЬЕВИЧА ЕМЦА

25 декабря 2014 в возрасте 73 лет ушел из жизни известный ученый в области радиофизики и биофизики, профессор кафедры молекулярной и медицинской биофизики факультета радиофизики, биомедицинской электроники и компьютерных систем Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина Борис Григорьевич Емец.

В 1964 году Б.Г. Емец окончил радиофизический факультет Харьковского государственного университета имени М. Горького (сейчас Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина) по специальности «радиофизика и электроника», получил квалификацию «радиофизик-исследователь» и остался работать на кафедре радиоспектроскопии. С 1965 г. Борис Григорьевич работал на кафедре в должности ассистента, затем с 1972 г. – старшего преподавателя. В 1974 году защитил



диссертацию «Изучение эффектов действия электромагнитного излучения на воду и водные растворы методом ЯМР» на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. С 1978 г. работал на кафедре в должности доцента, с 1977 года по 1981 год был заместителем декана радиофизического факультета. В 1993 году Б.Г. Емец был избран членом Академии наук высшей школы Украины по отделению «физика и астрономия» и «биология».

В 2005 году Б.Г. Емец защитил докторскую диссертацию «Эффекты взаимодействия низкоинтенсивных электромагнитных волн с наноразмерными газовыми включениями в жидких средах». В диссертации была предложена физическая модель влияния низкоинтенсивных электромагнитных колебаний широкого частотного диапазона на свойства жидких растворителей, что обуславливает, в частности, изменение их диэлектрических проницаемостей и оптических плотностей при наличии практически незаметного повышения температуры, вызванного поглощением лучистой энергии. Эта модель предполагает зависимость физических свойств жидкостей от суммарного объема присутствующих в ней газовых включений. При облучении более сложных объектов, например суспензий, изменение в них объемной доли газовых включений воздуха приводит к изменению параметров приграничных диффузионных жидких слоев, которые непосредственно прилегают к суспендированным в жидкости частицам. В случае, когда такими частицами являются биологические клетки, указанная особенность способствует изменению режима обменных процессов в системе "клетка – межклеточная среда". Кроме того, была создана ЯМР-методика экспрессного контроля изменения объемной доли газовых включений в образцах жидких растворителей. Это дало возможность определить изменение объемов данного воздуха в воде и органических растворителях (ацетоне, бензоле, метаноле, циклогексане, этаноле), обусловленных действием низкоинтенсивных электромагнитных колебаний широкого диапазона частот.

После защиты докторской диссертации Борис Григорьевич работал на кафедре в должности профессора, входил в состав специализированного ученого совета Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина Д 64.051.13 по специальности 03.00.02 – биофизика.

Областью научных интересов Емца Б.Г. были проблемы взаимодействия электромагнитных полей с биологическими объектами. В 70-е годы Б. Г. Емец сотрудничал с академиком Н.Д. Десятковым, разрабатывая с помощью методов ЯМР и ЭПР модное тогда направление изучение «памяти» воды. В последние годы Бориса Григорьевича интересовало воздействие электромагнитных полей на живые объекты. В частности на раковые клетки и эритроциты крови. Проводились исследования по влиянию низкоинтенсивных электромагнитных волн на жидкости. В 1999 г. в журнале «Биофизика» (МАИК) вышла статья Бориса Григорьевича «О физическом механизме влияния низкоинтенсивного электромагнитного излучения на биологические клетки». Работы на дрозофилах и клетках буккального эпителия велись совместно с кафедрой генетики биофака. Совместно с Академией медицинского последипломного образования и Институтом радиофизики и электроники имени А.Я. Усикова (ИРЭ) осуществлялись исследования аутогемотерапии (воздействие на кровь волн миллиметрового диапазона) на больных с дисциркулярной энцефалопатией и были получены обнадеживающие результаты, а именно улучшение мозгового кровообращения. Диагностическое значение имели разрабатываемые совместно с ИРЭ методы исследования диэлектрических характеристик крови. Также имело прикладное значение изучение воздействия ультрафиолетового излучения на состав крови и в целом на организм человека. Интерес Бориса Григорьевича к биофизическим процессам, происходящим на организменном уровне, привел к появлению работ, посвященных механизму повышения радиационной стойкости организмов с помощью холодового закаливания, а также первичному механизму терапевтического влияния микроволнового облучения при лучевой болезни.

Преподавательская работа Б.Г. Емцы была связана с чтением учебных дисциплин по «Молекулярной спектроскопии», «Электронике в биологии и медицине», «Квантовой радиофизике», «Экологическому действию физических факторов», а также проведением практикума по «Методам биофизических исследований». В 2011 году в ХНУ имени В.Н. Каразина было издано учебное пособие для студентов с тестами и задачами *Емец Б.Г., Ромоданова Э.П., Тиманюк В.А. «Спектроскопические методы в биофизике, биологии и медицине».*

Помимо научной и преподавательской работы Борис Григорьевич Емец активно занимался художественной самодеятельностью. Когда невероятно популярная игра КВН уже вышла за рамки Москвы и студенчество других крупных городов горело желанием принять в ней участие, под эгидой обкома комсомола были сформированы команды КВН в Харьковском авиационном институте (ХАИ), Харьковском политехническом институте (ХПИ) и Харьковском государственном университете (ХГУ). Капитаном команды КВН ХГУ стал старшекурсник Б.Г. Емец. Харьковский финал, в который попали команды ХПИ и университета транслировался по харьковскому телевидению. Несмотря на то, что объективно команда ХГУ была сильнее, все же было принято решение, чтобы никого не обижать, сделать ничью.

Несколько наиболее активных членов команд из ХПИ и ХГУ выступили с инициативой создания на базе ХГУ Студенческого Интеллектуального театра, который позже постеснялся своего претенциозного названия и был переименован в Студенческий Синтетический театр, сокращенно СИНТ (1963 г.). Как писал сам Б.Г. Емец, это был «коллектив, который в своих постановках использует синтез

сценической речи, музыки, света, изображения, пластики, пантомимы и т.д., иначе говоря, всех применяемых в искусстве выразительных средств».

СИНТ сыграл большую и незабываемую роль в творческой жизни города вообще и студенчества в частности. Характерен был плакат, приглашающий вступить в СИНТ: «Ты прочел этот плакат и прошел мимо? Жаль, у тебя такое симпатичное лицо!» Одним из актеров и некоторое время (с 1966 по 1969 гг.) директором был Б.Г. Емец. Задача, стоявшая перед театром, была благородной: чтобы беззаботная в те времена молодежь немного задумалась о последствиях войны, которая могла бы быть развязана. Ставились спектакли по Брехту, Маяковскому и пр., которые имели большой успех и завоевали широкую аудиторию нестандартной режиссурой и исполнением.

Победа ХГУ в смотре художественной самодеятельности была поощрена руководством университета. Для участников самодеятельности был организован тур по Волге от Астрахани до Москвы на теплоходе «Сунгари». Это было незабываемое путешествие – концерты в городах по пути, экскурсия по Москве, организованная Борисом Григорьевичем, с ночевкой в скверике на Садовом кольце. Кстати, во время этого путешествия Борис Григорьевич познакомился с участницей университетского хора мехматовской красавицей Наташей Кац. Это знакомство закончилось свадьбой и рождением двух детей (дочь Алена – ныне ассистент кафедры ХПИ и сын Максим). Борис Григорьевич был очень хорошим семьянином, необыкновенно заботливым мужем и отцом.

Во времена расцвета СИНТа был снят фильм по спектаклю «Хорошо» Маяковского для харьковского телевидения.

В 1969 г. после спектакля «Черная шкатулка» (по мотивам произведения чешского писателя Людвика Ашкенази) театр был расформирован из-за подозрения в пропаганде пацифизма. По поводу 35-летия со дня основания театра Борис Григорьевич написал статью под названием «И будет славен СИНТ, «доколь в подлунном мире жив будет хоть один» человек, видевший его спектакли», в которой изложил свои размышления о феномене СИНТа, его участниках и причинах закрытия театра. Тем не менее, члены коллектива (имена участников первого года жизни СИНТа и их таланты Борис Григорьевич запечатлел в своем стихотворении «СИНТ годовалый») продолжали регулярно встречаться и общаться друг с другом многие годы спустя.

Со смертью Б.Г. Емца кафедра молекулярной и медицинской биофизики, факультет радиофизики, биомедицинской электроники и компьютерных систем ХНУ имени В.Н. Каразина, украинское научное сообщество биофизиков и радиофизиков понесли невосполнимую утрату. Друзья, коллеги и студенты всегда будут помнить Бориса Григорьевича Емца как замечательного человека, ученого и преподавателя, общение с которым было полезным и интересным для всех, кому довелось его знать.

А.И. Фисун, А.П. Николаенко, Г.В. Голубничая, О.А. Горобченко

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Contributions written in English, Ukrainian or Russian should be sent to the Editorial Office in duplicate with electronic version as an attached file via e-mail biofiz-visnyk@karazin.ua.

By submitting a paper for publication in Biophysical Bulletin the authors imply that the material neither has been published previously nor has been submitted for publication elsewhere and that the authors have obtained all the necessary authority for publication. A manuscript should be typed in single spacing on good quality white paper (A4 format), one side only. Use the MS Word with following options 12 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2.5 cm, upper margin should be 3.5 cm, and bottom one should be 2 cm. All pages should be numbered serially on the backside in pencil.

Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means (MathType). Figures should be computer-generated with printed symbols labeling axes (use Origin, Mathcad et al for plotting) and should be inserted into a MS Word file as files of *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png format. 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.

Layout of the Manuscript

Insert UDK in the first line on the left of a first page (11 pt, Italic). Leave one line blank. The title of the paper should appear in capital letters (12 pt, bold, centered) on the fifth line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt, bold, centered). On the next line type affiliations and full addresses including e-mail addresses of the authors (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission month, day, year (10 pt, centered).

After one blank line place abstract (10 pt) of the paper, which should contain 1,000-1,200 symbols. The abstract should contain the brief overview of the problem; method used in the paper, and main results and conclusions. The word "Abstract" should be omitted. On the next line type 5-8 key words (10 pt, the heading "**KEY WORDS**" should be typed in bold capital letters in the beginning of the line) The text of the abstract and key words should be indented 0,5 cm from the left and right margins.

Leave one blank line and provide all mentioned below in English and after one blank line in Ukrainian (or Russian depending on the language of the manuscript). This should include: title of the paper in capital letters (10 pt, bold, centered) on the next line type initials and surnames of the authors (10 pt, bold, centered). On the next line type affiliations and full addresses including e-mail addresses of the authors (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission month, day, year (10 pt, centered). On the next line place abstract (10 pt) of the paper, which should contain 1,000-1,200 symbols. The word "Abstract" should be omitted. On the next line type 5-8 key words (10 pt, the heading "**KEY WORDS**" should be typed in bold capital letters in the beginning of the line) The text of the abstract and key words should be indented 0,5 cm from the left and right margins.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper with following options 12 points Times New Roman font, text justified. The first line of each paragraph should be indented 0,75 cm from the left margin. It is recommended to divide the text into following sections introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS** (headings of sections should appear in capital letters and be centered). For theoretical studies 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. Sections may be subdivided in subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after every section or subsection. After headings of sections and subsections a point should be omitted. Any acknowledgement regarding support, such as names of the foundations and grant numbers should be included at the end of the text after one blank line. References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers is prohibited. A full list of the references should be given at the end of the manuscript as a separate section according to the following pattern:

1. Pelzer G. Oxidation-reduction processes occurring in secondary ion mass spectrometry and fast atom bombardment of glycerol solutions / G. Pelzer, E. De Pauw, J. Marien // J. Phys. Chem. – 1984. – V. 88, N 21. – P. 5065–5068.
2. Photocatalytic degradation of methylene blue on nanocrystalline TiO₂: Surface mass spectrometry of reaction intermediates / H. Gnaser, M. R. Savina, W. F. Calaway [et al.] // Int. J. Mass Spectrom. – 2005. – V. 245, N 1-3. – P. 61–67.
3. Israelachvili J. Intermolecular and Surface forces / J. Israelachvili. – [3rd ed.]. – Burlington: Academic Press, 2011. – 674 p. – ISBN 978 – 0–12–375182–9.

Please, pay attention to compact organization of the manuscript.

Manuscripts that do not correspond to the instructions above will not be considered for publication.