

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

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Біофізичний Вісник

2016

Biophysical Bulletin

2016

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається рукопис українською, російською або англійською мовою у двох екземплярах з направленням установи і експертним висновком, а також електронний варіант статті (у форматі MS Word 2003 і вище) приєднаним файлом на електронну адресу редакції biofiz-visnyk@karazin.ua

Текст друкується на білих аркушах формату А4, через один інтервал, з високою якістю друку. Використовується редактор MS Word, шрифт Times New Roman (Cyr), розмір шрифту 12 pt., вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху 3,5 см, знизу 2 см. Сторінки нумеруються послідовно на зворотному боці аркуша олівцем. Математичні та хімічні символи (із вбудованої до MS Word таблиці символів), рівняння і формули вводяться до тексту статті за допомогою редактора MathType. Рисунки, у вигляді повністю придатного до репродукції, вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Графіки будуються у будь-якому програмному пакеті, призначеному для обробки і візуалізації наукових даних: Origin, Mathcad, тощо. Цифри і підписи на осях та надписах повинні мати шрифт 9 pt. Використання офісного пакету MS Excel для побудови графіків не допускається. Бажано розмішувати рисунки у таблицю із прозорими зовнішніми границями, вирівнювання по ширині. Рисунок розмішувати у першому рядку таблиці, підпис та коментарі до рисунку – у другому рядку таблиці. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 10 pt. Рисунки мають бути вставлені до файлу MS Word із файлів у форматі *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1.

Послідовність розміщення матеріалу:

На першій сторінці зверху на першому рядку в лівому верхньому куті друкується УДК (курсив, 11 pt.). Потім, після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., всі букви прописні, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка друкуються спочатку ініціали, потім прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку друкуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота (курсив, 10 pt., вирівнювання по центру), адреса електронної пошти друкується за бажанням авторів. Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число - цифрами, місяць - прописом, рік - цифрами (шрифт прямий, 10 pt., вирівнювання по центру). На наступному рядку вміщується дата прийняття статті до друку (заповнюється редколегією).

Після пропуску одного рядка вміщується реферат статті, обсягом 1000-1200 символів, з коротким викладом об'єкту дослідження, мети або задач, методичних підходів, використаних у роботі, та основних результатів і висновків. Слово "реферат" не пишеться (використовується прямий шрифт розміром 10 pt.).

На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів (10 pt., заголовок "**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**" пишеться прописом на тому ж рядку, що й ключові слова і виділяється напівжирним шрифтом).

Текст реферату і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку).

Після пропуску одного рядка приводяться назва статті, автори й реферат англійською та українською або російською мовою (в залежності від мови статті) тобто, перед статтею мають бути розміщені усі три реферати із назвами статті та авторами. Заголовки "Abstract" і "Реферат" не пишуться. Назва статті: прописом, шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру. На наступному рядку - ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt., напівжирний, вирівнювання по центру). На наступному рядку друкується повна назва організації та її адреса (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка вміщується текст реферату (шрифт прямий 10 pt., вирівнювання по ширині, без червоного рядка). На наступному рядку після слів "**KEY WORDS:**" (прописом, шрифт прямий напівжирний, 9 pt.) вміщуються ключові слова (шрифт прямий 9 pt., вирівнювання по ширині). Текст рефератів і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку).

Після пропуску одного рядка, вміщується основний текст статті, шрифт Times New Roman (Cyr), розмір шрифту 12 pt. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов'язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ, ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ, МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються (в назвах розділів усі букви прописні і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру). При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої букви і виділяються напівжирним шрифтом (вирівнювання по центру). Після кожного розділу або підрозділу іде один пустий рядок. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться. У кінці тексту статті, після пропуску одного рядка, якщо необхідно, зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту.

Літературні посилання нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи. Список літератури (шрифт 10 pt.) розміщується за основним текстом статті й виділяється як розділ. Оформлення бібліографічних посилань має відповідати вимогам ДСТУ ГОСТ 7.1:2006. Посилання на російськомовні і україномовні публікації дублюються у транслітерації. Транслітерація робиться за допомогою, наприклад, сайту <http://translit.net>. Приклад:

1. ¹H ЯМР анализ самоассоциации рибофлавин-мононуклеотида и его комплексобразования с никотинамидом в водном растворе / А. Н. Веселков, А. О. Лантушенко, А. С. Чубаров [и др.] // Журн. физ. химии. – 2002. – Т. 76., № 7. – С. 1313–1320. /¹H ЯМР анализ самоассоциации рибофлавин-мононуклеотида и его комплексобразования с никотинамидом в водном растворе А. Н. Веселков, А. О. Лантушенко, А. С. Чубаров [и др.] // Zhurn. fiz. himii. – 2002. – Т. 76., № 7. – С. 1313–1320./

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться.

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

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 36 (2) Issue

Заснований 1998 р.

Founded in 1998

Харків 2016 Kharkiv

Журнал публікує статті, які містять оригінальні результати розв'язання фізико-математичних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами сучасної біології, фізики та математичного моделювання.

Для науковців, викладачів, аспірантів, студентів, що працюють у галузі біофізики 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 that contain original results of physical and mathematical problems related to biological systems of various complexity levels solved with the help of modern life sciences methods and computer simulation.

Затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна (протокол № 15 від 28 листопада 2016 р.).

Редакційна колегія:

головний редактор –

Горбенко Г.П. – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

заступник головного редактора –

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

відповідальний секретар –

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

Баранник С.О. – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Бондаренко В.А. – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Веселовський М.С. – д.б.н., проф., акад. НАН України,

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця, м. Київ

Говорун Д.М. – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України, ІМБГ

НАН України, м. Київ

Делігеоргієв Т. – PhD., проф., Софійський університет, Софія,

Болгарія

Доманов Є.О. – PhD., завідувач відділу біофізики шкіри,

L'Oréal, Париж, Франція

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

Велика Британія

Карачевцев В.О. – д.ф.-м.н., проф.,

ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна НАН України

Кірілова Є. – PhD., доцент, Даугавпілський університет,

Даугавпілс, Латвія

Кнігавко В.Г. – д.б.н., проф., ХНМУ

Корнелюк О.І. – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України,

ІМБІГ НАН України, м. Київ

Косевич М.В. – д.ф.-м.н., с.н.с., ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна

НАН України

Малєєв В.Я. – д.ф.-м.н., проф., ІРЕ ім. О.Я. Усикова

НАН України

Мартиненко О.В. – д.ф.-м.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна

Осецький О.І. – д.ф.-м.н., проф., ШКІК НАН України

Перський С.Є. – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Семенов М.О. – д.ф.-м.н., проф.,

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України

Сибірний А.А. – д.б.н., проф., акад. НАН України,

Інститут біології клітини, м. Львів

Сорокін В.О. – д.ф.-м.н., проф.,

ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна НАН України

Стойка Р.С. – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України,

Інститут біології клітини, м. Львів

Суходуб Л.Ф. – д.ф.-м.н., проф., чл.-кор. НАН України,

Сумський державний університет

Толсторуков М.Є. – Ph.D., Масачусетський загальноклі-

нічний госпіталь, Бостон, США

Трусова В.М. – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Шестопалова Г.В. – д.ф.-м.н., проф.,

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України

Шкорботов Ю.Г. – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Editorial Board:

Editor-in-Chief –

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

Vice Editor-in-Chief –

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

Executive Secretary –

V.P. Berest – PhD., Associate Prof., V.N. Karazin KhNU

E.A. Barannik – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

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

N.S. Veselovsky – Dr. Sci., Prof., academician of NASU,

Bogomoletz Institute of Physiology of NASU, Kiev

D.M. Govorun – Dr. Sci., Prof., corresponding member

of NASU, IMBG NASU, Kiev

T. Deligeorgiev – PhD., Prof., University of Sofia,

Sofia Bulgaria

Ye.A. Domanov – PhD., Head of Skin Biophysics Unit

at L'Oréal R&I, Région de Paris, France

O. Doran – PhD., Professor, University of the West of

England, Bristol, UK

V.A. Karachevtsev – Dr. Sci., Prof.,

B. Verkin ILTPI NASU

E. Kirilova – PhD., Associate Prof., Daugavpils

University, Daugavpils, Latvia

V.G. Knigavko – Dr. Sci., Prof., KhNMU

A.I. Kornelyuk – Dr. Sci., Prof., corresponding member

of NASU, IMBG NASU, Kiev

M.V. Kosevich – Dr. Sci., Leading research fellow,

B. Verkin ILTPI NASU

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

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

A.I. Osetski – Dr. Sci., Prof., IPC&C NASU

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

M.A. Semenov – Dr. Sci., Prof., O.Ya. Usikov IRE NASU

A.A. Sybirny – Dr. Sci., Prof., academician of NASU,

Institute of Cell Biology, Lviv

V.A. Sorokin – Dr. Sci., Prof., B. Verkin ILTPI NASU

R.S. Stoika – Dr. Sci., Prof., corresponding member of

NASU, Institute of Cell Biology, Lviv

L.F. Sukhodub – Dr. Sci., Prof., corresponding member of

NASU, Sumy State University, Sumy

M.Ye. Tolstorukov – Ph.D., Assistant In Molecular

Biology, Massachusetts General

Hospital Instructor, Harvard Medical

School, Boston, USA

V.M. Trusova – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

A.V. Shestopalova – Dr. Sci., Prof.,

O.Ya. Usikov IRE NASU

Yu.G. Shkorbatov – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

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

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

Адреса редакційної колегії:

Address:

кафедра молекулярної і медичної біофізики

Department of Molecular and Medical Biophysics

факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних

School of Radio Physics, Biomedical Electronics and

систем

Computer Systems

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна

V.N. Karazin Kharkiv National University

майдан Свободи, 4,

4 Svobody Sq.,

61022 м. Харків, Україна

Kharkiv 61022 Ukraine

тел. / phone: +38 057 7075576

факс / fax: +38 057 7544746

e-mail: biofiz-visnyk@karazin.ua

http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk

Статті пройшли внутрішнє та зовнішнє рецензування.

Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 11007 від 17.02.2006

© Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, оформлення, 2016

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- В.М. Трусова**
Теоретичний аналіз амілоїдогенного потенціалу лізоциму, цитохрому *C* та аполіпопротеїну А-I 5-10
- О.В. Ващенко, Л.В. Будянская**
Совместное действие лекарственных веществ в модельных липидных мембранах: калориметрические эффекты 11-18

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

- К.А. Kuznetsov, О.Т. Nikolov, Y.G. Shckorbatov**
Response of exfoliated human buccal epithelium cells to combined gamma radiation, microwaves, and magnetic field exposure estimated by changes in chromatin condensation and cell membrane permeability 19-26
- А.К. Гулевський, Д.В. Третьяк**
Исследование пептидного состава супернатантов из личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* и карася серебряного *Carassius auratus* в процессе холодной акклимации 27-36

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- К.О. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, P. Kinnunen**
Phospholipids as inhibitors of amyloid fibril formation 37-42
- А.А. Герус, Н.А. Гладковская, Е.Г. Березняк, Е.В. Духопельников**
Конкурентное связывание хлорофиллина и профлавина с ДНК 43-50

МЕДИЧНА ФІЗИКА

- Л.І. Кобилінська, Т.С. Малий, С.В. Апуневич, І.Г. Маньковська, А.С. Волошиновський, О.Ю. Ключівська, Р.С. Стойка, Р.Б. Лесик, Б.С. Зіменковський**
Характеристика нових похідних 4-тіазолідинонів: спектри люмінесценції та оцінка потенційної протипухлинної активності 51-62

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

- Д.Ф. Астаповіч, В.П. Берест, Л.В. Батюк, О.А. Муравейник**
Спосіб аналізу кінетики гемолізу еритроцитів 63-70

CONTENTS**MOLECULAR BIOPHYSICS****V.M. Trusova**Theoretical analysis of amyloidogenic potential of lysozyme, cytochrome *C* and apolipoprotein A-I 5-10**O.V. Vashchenko, L.V. Budianska**

Joint action of pharmaceuticals in model lipid membranes: calorimetric effects 11-18

ACTION OF PHYSICAL AGENTS ON BIOLOGICAL OBJECTS**K.A. Kuznetsov, O.T. Nikolov, Y.G. Shkorbatov**

Response of exfoliated human buccal epithelium cells to combined gamma radiation, 19-26 microwaves, and magnetic field exposure estimated by changes in chromatin condensation and cell membrane permeability

A.K. Gulevsky, D.V. TretiakThe study of the peptide composition of the supernatants from mealworm *Tenebrio molitor* larvae and goldfish *Carassius auratus* during cold acclimation 27-36**MOLECULAR BIOPHYSICS****K.O. Vus, V.M. Trusova, G.P. Gorbenko, P. Kinnunen**

Phospholipids as inhibitors of amyloid fibril formation 37-42

A.A. Herus, N.A. Gladkovskaya, E.G. Bereznyak, E.V. Dukhopelnikov

Competitive binding of chlorophyllin and proflavine to DNA 43-50

MEDICAL PHYSICS**L.I. Kobylinska, T.S. Malyy, S.V. Apunevych, I.G. Mankovska, A.S. Voloshynovsky, O.M. Klyuchivska, R.S. Stoika, R.B. Lesyk, B.S. Zimenkovsky**

Characterization of the novel 4-thiazolidinone derivatives: luminescence spectra and potential antitumor activity 51-62

METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS**D.F. Astapovich, V.P. Berest, L.V. Batyuk, O.A. Muraveynik**

Approach to analyse kinetics of erythrocyte hemolysis 63-70

УДК 577.322

**ТЕОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ АМІЛОІДОГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЛІЗОЦИМУ,
ЦИТОХРОМУ С ТА АПОЛІПОПРОТЕЇНУ А-I****В.М. Трусова***Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна
e-mail: valeriya.m.trusova@gmail.com*

Надійшла до редакції 29 вересня 2016 року

Прийнята 17 жовтня 2016 року

З використанням 8 веб-алгоритмів, що включали Pasta2, AmylPred2, Tango, MetAmyl, Waltz, Aggrescan, BetaScan та FoldAmyloid, було проведено теоретичний аналіз амінокислотних послідовностей лізоциму, цитохрому *c* та N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I та ідентифіковано їх амілоїдогенні фрагменти. Фрагмент вважався амілоїдогенним, якщо він був ідентифікований щонайменше чотирма алгоритмами. Порівняльний аналіз амілоїдогенних фрагментів нативного та мутантного білків, проведений з використанням різних методів прогнозування, виявив, що усі мутанти характеризуються тими ж амілоїдогенними ділянками, що й нативний білок, однак для мутантних білків агрегаційний потенціал кожної ділянки вище. Показано, що агрегаційні сегменти усіх білків характеризуються збагаченістю гідрофобними алифатичними (Ile, Val, Leu, Ala) та ароматичними (Trp, Phe, Tyr) амінокислотними залишками. Висловлено припущення щодо ключової ролі гідрофобних взаємодій у процесі агрегації білків.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амілоїдні фібрили, агрегаційний потенціал, комп'ютерне моделювання, лізоцим, цитохром *c*, аполіпопротеїн А-I.

**THEORETICAL ANALYSIS OF AMYLOIDOGENIC POTENTIAL OF LYSOZYME,
CYTOCHROME C AND APOLIPOPROTEIN A-I****V.M. Trusova***V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv 61022, Ukraine*

Using 8 web-algorithms, including Pasta2, AmylPred2, Tango, MetAmyl, Waltz, Aggrescan, BetaScan та FoldAmyloid, theoretical analysis of amino acid sequences of lysozyme, cytochrome *c* and N-terminal fragment of apolipoprotein A-I has been carried out, and amyloidogenic fragments of the proteins have been identified. The fragment was identified as amyloidogenic if it was determined by at least four algorithms. Comparative analysis of aggregation-prone regions of native and mutant proteins showed that that all mutants are characterized by same amyloidogenic segments as native proteins with the amyloidogenic potential being more pronounced for mutated proteins. It was shown that aggregation-prone regions of all proteins analyzed here, were rich in hydrophobic aliphatic (Ile, Val, Leu, Ala) and aromatic (Trp, Phe, Tyr) amino acid residues. Hydrophobic interactions were supposed to play key role in protein aggregation process.

KEY WORDS: amyloid fibrils, aggregation potential, computer modelling, lysozyme, cytochrome *c*, apolipoprotein A-I.

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМИЛОИДОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛИЗОЦИМА,
ЦИТОХРОМА С И АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I****В.М. Трусова***Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина*

С использованием 8 веб-алгоритмов, которые включали Pasta2, AmylPred2, Tango, MetAmyl, Waltz, Aggrescan, BetaScan та FoldAmyloid, был проведен теоретический анализ аминокислотных последовательностей лизоцима, цитохрома *c* и N-терминального фрагмента аполіпопротеїна А-I, а также идентифицированы их амилоидогенные фрагменты. Сравнительный анализ амилоидогенных фрагментов нативного и мутантного белков, проведенный с использованием различных методов прогнозирования, показал, что все мутанты характеризуются теми же амилоидогенными областями, что и нативный белок, однако для мутантных белков агрегационный потенциал выше. Показано, что агрегационные сегменты всех белков характеризуются насыщенностью гидрофобными алифатическими (Ile, Val, Leu, Ala) и ароматическими (Trp, Phe, Tyr) аминокислотными остатками. Высказано предположение относительно ключевой роли гидрофобных взаимодействий в процессе агрегации белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амилоидные фибриллы, агрегационный потенциал, компьютерное моделирование, лизоцим, цитохром *c*, аполіпопротеїн А-I.

Дослідження молекулярних механізмів агрегації біологічних макромолекул, зокрема білків, є одним із фундаментальних напрямків сучасної біофізики [1,2]. Міжмолекулярні нековалентні взаємодії між білковими молекулами призводять до формування широкого спектру надмолекулярних ансамблів, структура яких коливається від неупорядкованих аморфних агрегатів до кристалів із чітко визначеною трансляційною симетрією у трьох напрямках. В останні десятиріччя невпинно зростаюча увага вчених прикута до дослідження процесу одномірної кристалізації білків та пептидів з утворенням високовпорядкованих фібрилярних структур, які зветься амілоїдами [3]. Ці агрегати являють собою лінійні β -складчасті ансамблі мономерних субодиниць із трансляційною симетрією у повздовжньому напрямку, структура яких стабілізується, головним чином, мережею водневих зв'язків [4]. Згідно з сучасними уявленнями, акумуляція фібрилярних агрегатів в тканинах організму є ключовим фактором в етіології цілої низки так званих конформаційних хвороб, включаючи хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона, діабет другого типу, ревматоїдний артрит, губчасті енцефалопатії (пріонні хвороби), тощо [5]. Численні дослідження свідчать про те, що здатність утворювати амілоїдні фібрили не обмежується амілоїдогенними білками, які пов'язані із конформаційними хворобами, а є фундаментальною властивістю різних структурно незалежних білків [1, 3]. Все більшого теоретичного та експериментального обґрунтування набуває ідея про те, що здатність білка до фібрилізації закодована у його амінокислотній послідовності. Рядом авторів була висунута гіпотеза, згідно з якою за утворення амілоїдних фібрил відповідають короткі фрагменти амінокислотної послідовності поліпептидів [6]. Однак, у більшості випадків експериментальне визначення амілоїдогенних фрагментів білків такими методами, як кристалографія чи ЯМР-спектроскопія, утруднюється внаслідок низької розчинності фібрил. З огляду на це, для ідентифікації ділянок з високим агрегаційним потенціалом та з'ясування загальних принципів і закономірностей патологічної агрегації білків наразі широко застосовуються комп'ютерні методи прогнозування амілоїдогенного потенціалу поліпептидного ланцюга на основі його амінокислотної послідовності. Основною метою даної роботи була ідентифікація агрегаційних ділянок лізоциму, цитохрому *c* та N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I (апоА 83) з використанням різних методів прогнозування. Варто відзначити, що список розроблених до теперішнього часу алгоритмів не обмежується лише тими методами, які будуть описані нижче. При розв'язанні поставлених задач ми використовували найпоширеніші алгоритми, які відрізняються за принципом імплементації.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для ідентифікації амілоїдогенних сегментів лізоциму, цитохрому *c* та N-кінцевого фрагменту аполіпопротеїну А-I були використані алгоритми, що включали Pasta2, AmylPred2, Tango, MetAmyl, Waltz, Aggrescan, Betascan та FoldAmyloid. При аналізі припускали, що фрагмент є агрегаційним, якщо він ідентифікований як мінімум чотирма методами прогнозування.

Один з широко застосовуваних алгоритмів, що має назву FoldAmyloid, був запропонований групою Галзитської та співавторів [7]. Цей метод базується на принципі ентальпійно-ентропійної компенсації, який постулює, що для компенсації втрати конформаційної ентропії при переході білка у більш впорядковану конформацію необхідна достатня кількість контактів між амінокислотними залишками, які визначають ентальпійний внесок у вільну енергію стабілізації білка. З огляду на те, що ентальпія залежить від енергії короткодійних взаємодій, було зроблено припущення,

що у випадку, коли очікувана середня густина пакування, яка визначає усереднену кількість контактів між залишками на окремій ділянці, нижче граничної, тобто густини пакування для глобулярних білків, білок залишиться незгорнутим. На противагу, якщо очікувана середня густина пакування перевищує граничну, то ймовірність утворення фібрилярних агрегатів досить висока. Фактично, висока термостабільність амілоїдних фібрил, їх стійкість до дії протеаз та насиченість β -структурами і передбачає той факт, що ці самоасоціати містять ділянки з високою густиною пакування. Результати верифікації описаної гіпотези показали, що здатність поліпептидного ланцюга утворювати амілоїди дійсно корелює із числом ділянок з високою густиною пакування.

Алгоритм Tango прогнозує ймовірність утворення тієї чи іншої вторинної структури [8]. В основі методу лежить статистичний аналіз емпіричних властивостей амінокислот з метою розрахунку відносної ймовірності згортання окремих ділянок поліпептидного ланцюга в одну з наступних конформацій: α -спіраль, β -петля, β -лист та невідповідна структура.

Метод Waltz використовує базу даних пептидів з експериментально визначеними амілоїдогенними властивостями для ідентифікації агрегаційних ділянок білків [9]. База даних включає пептиди, що складаються з шести амінокислотних залишків. При цьому, як мінімум три залишки утворюють амілоїдогенну ділянку. Автори використовують так звану позиційно-специфічну оцінювальну матрицю, яка віддзеркалює ймовірність того, що певна амінокислота буде розташовуватись в амілоїдогенному гексапептиді.

Серед розмаїття методів прогнозування особливе місце посідають AmylPred2 та MetAmyl, мета-сервери для консенсус-аналізу, які комбінують декілька методів аналізу, включаючи FoldAmyloid, Tango та Waltz [10, 11]. На основі коефіцієнту кореляції Метьюса ці алгоритми пропонують усереднені результати прогнозування амілоїдних фрагментів білка.

На основі функції розподілу Больцмана алгоритм Pasta2 визначає, які фрагменти білка стабілізуються крос- β -структурою [12]. Даний аналіз базується на прогнозуванні здатності двох залишків розташовуватись у сусідніх β -тяжах у паралельній чи антипаралельній орієнтації. Далі на основі регресійного аналізу передбачається переважна локалізація агрегаційних фрагментів та їх відносна орієнтація.

Принцип алгоритму BetaScan подібний до Pasta2, однак BetaScan розглядає лише паралельну орієнтацію β -тяжів з огляду на те, що ця орієнтація є більш поширеною у порівнянні із антипаралельною [13].

Сервер Aggrescan базується на припущенні, що короткі фрагменти (5-7 залишків) можуть ініціювати агрегацію в пептидах та білках, та що амілоїдогенний потенціал цих фрагментів залежить від їх амінокислотної послідовності [14]. Шкала агрегаційної здатності амінокислот була розрахована на основі експериментальних даних. Програма аналізує короткі фрагменти досліджуваного білка (5 чи 7 залишків) та визначає середній амілоїдогенний потенціал кожного фрагменту на основі цієї шкали. Фрагменти з найвищим середнім потенціалом вважаються агрегаційними ділянками білка.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Лізоцим з яєчного білка (UniProt ID P00698) містить 129 амінокислотних залишків. У базі даних кристалічних структур білків (PDB) для аналізу було обрано структуру 1AKI. Як видно з табл. 1, білок характеризується п'ятьма амілоїдогенними ділянками, які охоплюють залишки 27-31 (NWVCA), 53-60 (YGILQINS), 81-90 (SALLSSDITA), 106-110 (NAWVA) та 121-125 (QAWIR). При цьому, найвищим агрегаційним потенціалом характеризуються фрагменти 53-60 та 81-90.

Лізоцим людини (UniProt ID P61626) схожий за своїми властивостями та первинною структурою із лізоцимом яєчного білка. Лізоцим людини містить 130 амінокислотних залишків (для аналізу використано структуру 1REX) та згідно з результатами прогнозування з використанням різних комп'ютерних алгоритмів, має три амілоїдогенні фрагменти: залишки 25-33 (LANWMCLAK), 55-62 (GIFQINSR) та 107-112 (RAWVAW). Агрегаційний потенціал збільшується у порядку (25-33) < (107-112) < (55-62). Варто відзначити, що фрагменти з найвищою агрегаційною здатністю аналогічні для людського та курячого аналогу – вони знаходяться майже в однаковому місці в поліпептидному ланцюзі (55-62 та 53-60 для першого та другого випадку, відповідно) та мають схожу амінокислотну послідовність.

Таблиця 1

Агрегаційні ділянки лізоциму, цитохрому *c* та аполіпопротеїну А-I, прогнозовані різними алгоритмами.

Білок/пептид	Амілоїдогенний фрагмент
Лізоцим з яєчного білка	²⁷ NWVCA ₃₁ (5 алг.)*, ⁵³ YGILQINS ₆₀ (4 алг.), ⁸¹ SALLSSDITA ₉₀ (4 алг.), ¹⁰⁶ NAWVA ₁₁₀ (5 алг.), ¹²¹ QAWIR ₁₂₅ (4 алг.)
Лізоцим людини	²⁵ LANWMCLA ₃₂ (4 алг.), ⁵⁵ GIFQINSR ₆₂ (4 алг.), ¹⁰⁷ RAWVAW ₁₁₂ (5 алг.)
Цитохром <i>c</i>	⁹ IFVQK ₁₃ (7 алг.), ⁸⁰ MIFAG ₈₄ (5 алг.)
АпоА 83	¹⁴ LATVYVDVL ₂₂ (8 алг.), ⁵³ VTSTFS ₅₈ (5 алг.)

* У дужках зазначено кількість алгоритмів, які ідентифікували певний фрагмент як амілоїдогенний.

При прогнозуванні амілоїдогенних фрагментів білків має сенс проаналізувати не тільки нативний білок, але і його мутанти, які пов'язані із розвитком конформаційних хвороб. Так, зокрема, відомо, що *in vivo* лізоцим утворює амілоїдні фібрили при мутаціях I56T, F57I, W64R та D67H, F57I/T70N та W112R/T70N [15]. Тому у даному контексті уявлялось доцільним не тільки ідентифікувати амілоїдогенні фрагменти нативного білка, але й порівняти агрегаційні потенціали білка дикого типу та мутантів. Аналіз, проведений з використанням різних методів прогнозування виявив, що усі мутанти характеризуються тими ж амілоїдогенними ділянками, що й нативний лізоцим людини, однак для мутантних білків агрегаційний потенціал кожної ділянки вище у порівнянні з нативним білком (табл. 2).

Таблиця 2

Агрегаційна здатність нативного лізоциму людини та його амілоїдогенних мутантів за даними прогнозування серверу Pasta2

Номер амінокислотного залишку	Нативний	I56T	F57I	W64R	D67H	F57I/T70N	W112R/T70N
25-33	0,25	0,31	0,26	0,37	0,44	0,46	0,36
55-62	0,66	0,69	0,72	0,74	0,73	0,74	0,7
107-112	0,42	0,47	0,5	0,52	0,57	0,61	0,57

На відміну від лізоциму, у молекулах апоА 83 людини (UniProt ID P02647; PDB ID 2A01) та цитохрому *c* коня (UniProt ID P00004; PDB ID 1HRC) були ідентифіковані два амілоїдогенних сегмента, локалізовані на залишках 14-22 (LATVYVDVL), 52-58 (VTSTFS) (апоА 83) та 9-13 (IFVQK), 80-84 (MIFAG) (цитохром *c*) (табл. 1).

Важливо, що ділянка 14-22 апоА 83 була ідентифікована усіма алгоритмами прогнозування, а також підтверджена експериментальними дослідженнями [16]. Необхідно також зазначити, що аналогічно лізоциму, введення точкової амілоїдогенної мутації G26R у амінокислотну послідовність апоА 83 не призвело до змін агрегаційних фрагментів білка, однак майже у 1,5 рази підвищило його амілоїдогенну здатність.

Згідно з сучасними фізичними теоріями, ключова роль у забезпеченні стабільності фібрилярних структур належить гідрофобності поліпептидного ланцюга [17]. Аналогічно фолдінгу глобулярних білків, самоасоціація білкових мономерів в амілоїдні структури ініціюється гідрофобним ефектом. Конформаційний перехід поліпептидного ланцюга у стан розплавленої глобули при зміні концентрації білка, температури, рН чи іонної сили розчину є початком процесу нуклеації. Мінімізація числа термодинамічно не вигідних контактів між неполярними залишками, які експонуються у ході розгортання білкової глобули, та розчинником призводить до утворення олігомерних інтермедіатів. Зрілі фібрили поряд з гідрофобними взаємодіями стабілізуються також мережею водневих зв'язків. Мережа водневих зв'язків виступає у ролі остову, який утримує усю архітектуру молекули. Численні експериментальні дослідження підтверджують ідею про те, що зростання гідрофобності поліпептидного ланцюга прискорює швидкість фібрилізації та підвищує термодинамічну стабільність агрегатів [1]. Окрім цього, окремий клас гідрофобних взаємодій – ароматичні взаємодії – також відіграють суттєву роль у стабілізації фібрил [18]. У той час як Марек зі співавторами [19] припустили, що π - π взаємодії кінетично важливі лише у ході лаг-фази, Газіт зробив висновок, що роль ароматичних контактів включає два аспекти [20]: і) вони роблять позитивний енергетичний внесок за рахунок π - π стекингу, та ii) їх специфічний орієнтуючий ефект лежить в основі енергетично оптимального пакування β -тяжів у структурі фібрил. Ці положення збігаються з результатами аналізу лізоциму, апоА 83 та цитохрому *c* (табл. 1). Відмінними рисами агрегаційних сегментів усіх досліджених білків є збагаченість гідрофобними аліфатичними (Phe, Val, Leu, Ala) та ароматичними (Trp, Phe, Tyr) амінокислотними залишками.

ВИСНОВКИ

За допомогою алгоритмів FoldAmyloid, Tango, Waltz, AmylPred2, MetAmyl, Pasta2, BetaScan та Aggrescan ідентифіковані амілоїдогенні фрагменти лізоциму, цитохрому *c* та N-термінального фрагменту аполіпопротеїну А-I. Проведено порівняльний аналіз агрегаційних властивостей білків дикого типу та мутантів лізоциму людини та апоА-I. Продемонстровано, що амілоїдогенні мутації лізоциму та аполіпопротеїну А-I не змінюють положення агрегаційно-компетентних ділянок, але підвищують їх агрегаційний потенціал.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Buell K. The physical chemistry of the amyloid phenomenon: thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation / A. Buell, C. Dobson, T. Knowles // *Essays Biochem.* – 2014. – V. 56. – P. 11 – 39.
2. Volpatti L. Polymer physics inspired approaches for the study of the mechanical properties of amyloid fibrils / L. Volpatti, T. Knowles // *J. Polymer Sci. A.* – 2014. – V. 52. – P. 281-292.
3. Adamcik J. Protein fibrils from a polymer physics perspective / J. Adamcik, R. Mezzenga // *Macromolecules.* – 2012. – V. 45. – P. 1137-1150.
4. Tycko R. Solid state NMR studies of amyloid fibril structure / R. Tycko // *Annu. Rev. Phys. Chem.* – 2011. – V. 62. – P. 279-299.
5. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction / M. Sunde, L.C. Serpell, M. Bartlam et al. // *J. Mol. Biol.* – 1997. – V. 273. – P. 729-739.
6. Impact of sequence on the molecular assembly of short amyloid peptides / V. Wagoner, M. Cheon, I. Chang et al. // *Proteins.* – 2014. – V. 82. – P. 1469-1483.

7. Garbuzynskiy S. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence / S. Garbuzhynskiy, M. Lobanov, O. Galzitskaya // *Bioinformatics*. – 2010. – V. 26. – P. 326-332.
8. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins / A. Fernandez-Escamilla, F. Rousseau, J. Schymkowitz et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – P. 1302-1306.
9. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices / S. Maurer-Stroh, M. Debulpaep, N. Kuemmerer et al. // *Nat. Methods*. – 2010. – V. 7. – P. 237-242.
10. A consensus method for the prediction of “aggregation-prone” peptides in globular proteins / A. Tsolis, N. Papandreou, V. Iconomidou et al. // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – P. e54175.
11. Emily M. MetAmyl: a META-predictor of AMYLOID proteins / M. Emily, A. Talvas, C. Delamarche // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – P. e79722.
12. PASTA2: an improved server for protein aggregation prediction / I. Walsh, F. Seno, S. Tosatto et al. // *Nucl. Acids Res.* – 2014. – V. 42. – P. W301-307.
13. BETASCAN: probable beta-amyloids identified by pairwise probabilistic analysis / A. Bryan, M. Menke, L. Cowen et al. // *PLoS Comput. Biol.* – 2009. – V. 5. – P. 1000333.
14. AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides // O. Conchillo-Sole, N. de Groot, F. Aviles et al. // *BMC Bioinformatics*. – 2007. – V. 8. – P. 65.
15. Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis / E. Frare, M. Mossuto, P. Polverino de Laureto et al. // *J. Mol. Biol.* – 2006. – V. 361. – P. 551-561.
16. Das M. Amyloid-forming properties of human apolipoproteins: sequence analysis and structural insights / M. Das, O. Gursky // *Springer Subcellular Biochemistry Series: Lipids in Protein Misfolding* – 2015. – V. 855. – P. 175-211.
17. Relative influence of hydrophobicity and net charge in the aggregation of two homologous proteins / M. Calamai, N. Taddei, M. Stefani et al. // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – P. 15078-15083.
18. Tu L. Role of aromatic interactions in amyloid formation by islet amyloid polypeptide / L. Tu, D. Raleigh // *Biochemistry*. – 2013. – V. 52. – P. 333-342.
19. Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology / P. Marek, A. Abedini, B. Song et al. // *Biochemistry*. – 2007. – V. 46. – P. 3255-3261.
20. Gazit E. Self-assembly of short aromatic peptides into amyloid fibrils and related nanostructures / E. Gazit // *Prion*. – 2007. – V. 1. – P. 32-35.

УДК 544.016.2:[577.352:615.31]

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ: КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ**О.В. Ващенко, Л.В. Будянская***Институт сцинтилляционных материалов НТК «Институт монокристаллов НАН Украины»,
пр. Науки, 60, Харьков, 61001, Украина
olga_v@isma.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 11 октября 2016 года

Принята 18 октября 2016 года

Исследовано совместное действие лекарственных веществ (ЛВ) в мультибислойных модельных липидных мембранах *L*- α -дипальмитоилфосфатидилхолина. Сдвиг температуры основного фазового перехода модельной мембраны в присутствии ЛВ (ΔT_m), определяемый методом дифференциальной сканирующей калориметрии, был использован как основной показатель их мембранотропного действия (МД). Были подобраны пары ЛВ с различной липофильностью и характером индивидуального МД; дополнительно был использован холестерин как компонент биомембран с хорошо изученным МД. Выявление и идентификацию эффектов совместного действия ЛВ проводили путём сравнения значений ΔT_m , полученных при их индивидуальном и совместном введении в мембрану. Эффекты совместного действия оказались одинаковыми для гидрофобного азитромицина и гидрофильного сукцинилхолина в сочетаниях как с повидоном, так и с холестерином. При исследовании совместного действия основного и вспомогательного веществ препаратов установлено, что в парах азитромицин-лактоза и азитромицин-диметилсульфоксид имело место преимущество МД основного действующего вещества, тогда как в паре амиксин-гипромелоза наблюдалась аддитивность МД обоих ЛВ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лекарственные вещества, модельные липидные мембраны, мембранотропное действие, совместное действие, дифференциальная сканирующая калориметрия.

СУМІСНА ДІЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН У МОДЕЛЬНИХ ЛІПІДНИХ МЕМБРАНАХ: КАЛОРИМЕТРИЧНІ ЕФЕКТИ**О.В. Ващенко, Л.В. Будянська***Институт сцинтиляційних матеріалів НАНУ, пр. Науки, 60, Харків, 61001, Україна*

Досліджена сумісна дія лікарських речовин (ЛР) в мультибішарових модельних ліпідних мембранах *L*- α -дипальмітоїлфосфатидилхоліну. Зсув температури основного фазового переходу модельної мембрани у присутності ЛР (ΔT_m), визначений методом диференціальної скануючої калориметрії, був використаний як основний показник мембранотропної дії (МД) досліджуваних речовин. Були підібрані пари ЛР із різною ліпофільністю та характером мембранотропної дії; додатково був використаний холестерин як компонент біомембран з добре відомим МД. Встановлення та ідентифікацію ефектів сумісної дії ЛР було проведено шляхом порівняння значень ΔT_m , отриманих при їх індивідуальному та сумісному введенні в мембрану. Ефекти сумісної дії виявилися однаковими для гідрофобного азітроміцину та гідрофільного сукцинілхоліну у комбінаціях як із повідоном, так і з холестерином. При дослідженні сумісної дії основної та допоміжної речовин препаратів встановлено, що у парах азітроміцин-лактоза та азітроміцин-діметилсульфоксид спостерігалася перевага МД основної діючої речовини, тоді як у парі аміксин-гіпромелоза встановлено адитивність МД обох ЛР.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лікарські речовини, модельні ліпідні мембрани, мембранотропна дія, сумісна дія, диференціальна скануюча калориметрія.

JOINT ACTION OF PHARMACEUTICALS IN MODEL LIPID MEMBRANES: CALORIMETRIC EFFECTS**O.V. Vashchenko, L.V. Budianska***Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, 60 Nauky Ave., 61001 Kharkov, Ukraine*

Joint action of a number of pharmaceuticals has been studied in multibilayer model membranes of *L*- α -dipalmitoylphosphatidylcholine. Shift of the main phase transition temperature of the membrane under the pharmaceuticals introduction (ΔT_m) was determined by means of differential scanning calorimetry

and used as a basic factor of their membranotropic action (MA). Pairs of pharmaceuticals were selected with various character of lipophylicity and MA; cholesterol was used as the membrane compound with the well-known MA. Revelation and identification of the effects of joint action was performed by comparison of ΔT_m values under separate and joint introduction of the pharmaceuticals. Effects of joint action appear similar for hydrophobic azithromycin and hydrophilic succinyleholine in their combinations both with povidone and with cholesterol. Examination of joint action of an active pharmaceutical ingredient (API) and an excipient allowed us to establish a certain advantage of the API's MA in the pairs azithromycin-lactose and azithromycin-dimetylsulfoxide, and additivity of the MA in the pair amixin-hypromelose.

KEY WORDS: pharmaceuticals, model lipid membranes, membranotropic action, joint action, differential scanning calorimetry.

Подавляющее большинство современных фармпрепаратов являются многокомпонентными системами, состоящими из действующего вещества и набора вспомогательных веществ [1]. В последнее время особый интерес вызывают межкомпонентные взаимодействия в фармпрепаратах на разных этапах их применения, существенно влияющие на их эффективность [1-3]. Одним из важнейших этапов действия фармпрепарата является его транспорт через клеточную мембрану, что обуславливает дальнейшее его распределение в биологических жидкостях, органах и тканях [1,4]. Наиболее распространённым механизмом транспорта лекарственных веществ считается пассивная диффузия через липидный бислой [4,5]. Взаимодействие лекарственных веществ (ЛВ) с липидным бислоем может приводить к его уплотнению либо разрыхлению [6-10], что во многих случаях коррелирует с повышением либо понижением проницаемости бислоя и является составляющей общего действия фармпрепарата.

В качестве физического параметра, адекватно отражающего термодинамическое состояние липидного бислоя, в ряде работ выступает температура основного фазового перехода мембраны (T_m) [9, 11]. При введении какого-либо вещества в липидную мембрану значение T_m может повышаться ($\Delta T_m > 0$) либо снижаться ($\Delta T_m < 0$). Соответственно, можно говорить о положительном либо отрицательном знаке мембранотропного действия (МД) данного вещества.

Универсальная терминология всех эффектов совместного действия (взаимодействия) ЛВ на сегодняшний день не выработана. Принято выделять несколько принципиально разных случаев: общий эффект равен алгебраической сумме отдельных эффектов (аддитивность), больше неё (синергизм) или же меньше (антагонизм) [1, 2]. При этом под синергизмом (от греч. *συνέργεια* — сотрудничество, содействие, взаимодействие) подразумевается одновременное действие в одном направлении двух или нескольких веществ, а антагонизмом (от греч. *ανταγωνισμός* — спор, борьба, конкуренция) обозначают противоположное влияние. Эффекты совместного действия ЛВ были установлены в модельных липидных мембранах [12-14], хотя чаще, естественно, описываются в связи с их фармацевтическим действием [15, 16]. Описанные в литературе эффекты совместного действия ЛВ сведены в табл. 1, являющейся несколько расширенным вариантом по сравнению с [1, 2] на том основании, что МД, в отличие от терапевтического действия, разнонаправленно и характеризуется как положительными, так и отрицательными значениями.

В данной работе рассмотрен вопрос совместного действия нескольких попарно подобранных компонентов фармпрепаратов в условиях модельной липидной мембраны, являющейся широко используемой средой для моделирования лекарственных взаимодействий [7-11]. Для этого были подобраны и исследованы комбинации пар веществ с различным знаком МД, а также пары «действующее вещество – вспомогательное вещество».

Таблица 1

Эффекты совместного действия лекарственных средств (\mathcal{E}_A и \mathcal{E}_B — эффекты веществ А и Б в отдельности; \mathcal{E}_{AB} — их совместный эффект).

Название	Эффект	Условия
Синергизм	$\mathcal{E}_{AB} > \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B$	$\mathcal{E}_A \neq 0$ и $\mathcal{E}_B \neq 0$
Сенситизация	— " —	$\mathcal{E}_A = 0$ или $\mathcal{E}_B = 0$
Аддитивность (суммация)	$\mathcal{E}_{AB} = \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B$	\mathcal{E}_A и \mathcal{E}_B любые
Антагонизм	$\mathcal{E}_{AB} < \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B$	$\mathcal{E}_A \neq 0$ и $\mathcal{E}_B \neq 0$
Десенситизация	— " —	$\mathcal{E}_A = 0$ или $\mathcal{E}_B = 0$

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие химически чистые вещества: *L*- α -дипальмитоилфосфатидилхолин, ДПФХ («Avanti Polar Lipids», США), азитромицин дигидрат («Biochemie, S.A.», Испания), амиксин («Интерхим», Одесса), гипромелоза («Tian Ruitai cellulose», Китай), диметилсульфоксид обезвоженный («Gaylord Chemical», США), лактозы моногидрат («Molkerei MEGGLE Wasserburg», Германия), сукцинилохолин дигидрат («Enamine», Киев), холестерин («Sigma-Aldrich», Германия), повидон К-29/32 («International Speciality Products», Швейцария), вода бидистиллированная.

Для приготовления мультибислойных мембран ДПФХ, содержащих 65 % воды к ДПФХ в кристаллической форме добавляли требуемое количество воды либо такое же количество раствора исследуемых водорастворимых вещества. Нерастворимые в воде вещества предварительно растворяли в очищенном этиловом спирте вместе с ДПФХ, удаляли растворитель с помощью концентратора «Concentrator Plus» («Eppendorf») и далее готовили так, как описано выше. Концентрации индивидуальных веществ, вводимых в мембрану ДПФХ, представлены в табл. 2.

Исследования проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью калориметра «Mettler DSC 1». Для каждой из исследованных систем проводили 2 цикла охлаждение – нагревание со скоростью сканирования 2 К/мин. Были определены температуры основного фазового перехода (T_m) и предперехода (T_p), а также сдвиг этих параметров в присутствии ЛВ:

$$\Delta T_{m/p} = T_{m/p} - T_{m/p}^0, \quad (1)$$

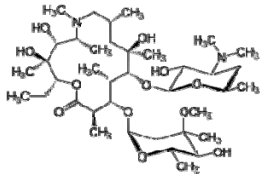
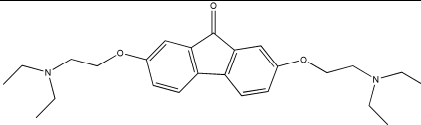
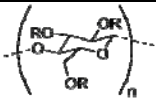
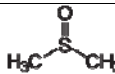
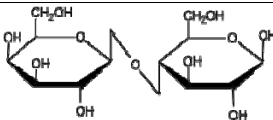
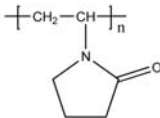
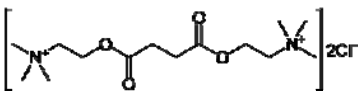
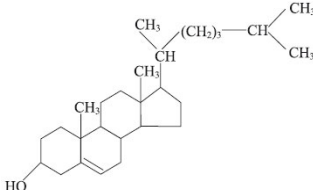
где $T_{m/p}$ — значения T_m и T_p для мембран с ЛВ; $T_{m/p}^0$ — соответствующие значения для чистой мембраны ДПФХ. Экспериментальная погрешность определения температур фазовых переходов составляла 0,1 °С.

Для более детального изучения эффектов совместного мембранотропного действия был применён метод квазибинарных диаграмм, предложенный в [17]. При исследовании методом квазибинарных диаграмм в каждой из исследованных систем сохранялось одинаковым общее содержание двух компонентов: 2,5 масс. % для системы «амиксин – гипромелоза» и 5,0 % для систем «амиксин – ДМСО» и «азитромицин – лактоза». Мольная доля каждого компонента варьировалась от 0,0 до 1,0. Такая постановка эксперимента, согласно [18], позволяла выявить эффекты совместного действия нитратов по отклонениям термодинамических параметров от аддитивности.

Некоторые из использованных ЛВ являются действующими веществами фармпрепаратов (ДВ), другие – вспомогательными (ВВ); холестерин был взят как компонент биомембран с хорошо изученным мембранотропным действием (табл. 2).

Таблица 2

Структура и некоторые характеристики используемых веществ.

Вещество	Структурная формула	Характеристика	Концентрация в ДПФХ, масс. %	Знак ΔT_m
Азитромицин		ДВ	5,0	-
Амиксин		ДВ	2,5	-
Гипромеллоза	 R = H или CH ₃ или CH ₂ CH(OH)CH ₃	ВВ	2,5	+
Диметилсульфоксид		ВВ	5,0	+
Лактозы моногидрат		ВВ	5,0	+
Повидон		ВВ	10,0	+
Сукцинилхолин		ДВ	5,0	+
Холестерин		компонент биомембран	10,0	-

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы нами был определён характер МД каждого из исследуемых ЛВ (см. табл. 2) по параметру ΔT_m , определённому по формуле (1). Были подобраны пары веществ с различным характером МД: оба ЛВ с $\Delta T_m > 0$ (сукцинилхолин и повидон), оба ЛВ с $\Delta T_m < 0$ (азитромицин и холестерин), а также ЛВ с противоположными знаками ΔT_m (сукцинилхолин и холестерин; азитромицин и повидон). Известно, что гидрофобные холестерин и азитромицин локализуются большей частью в объёме липидного бислоя [19, 20], тогда как дикатион сукцинилхолин и гидрофильный полимер повидон, по всей видимости, остаются на его поверхности. Таким образом, в подобранных парах были реализованы различные варианты взаимного расположения ЛВ в бислое. Значения ΔT_m мембраны, полученные в присутствии указанных веществ и их сочетаний, представлены на рис. 1. Эффекты совместного действия, определённые согласно табл. 1, представлены в табл. 3.

Таблица 3

Эффекты совместного действия пар ЛВ (А — азитромицин, С — сукцинилхолин, П — повидон, Х — холестерин).

Пара	Характер мембранотропного действия	Взаимная локализация ЛВ в бислое	Эффект
А + П	- / +	разная	Антагонизм
А + Х	- / -	одинаковая (объём)	Аддитивность
С + П	+ / +	одинаковая (поверхность)	Антагонизм
С + Х	+ / -	разная	Аддитивность

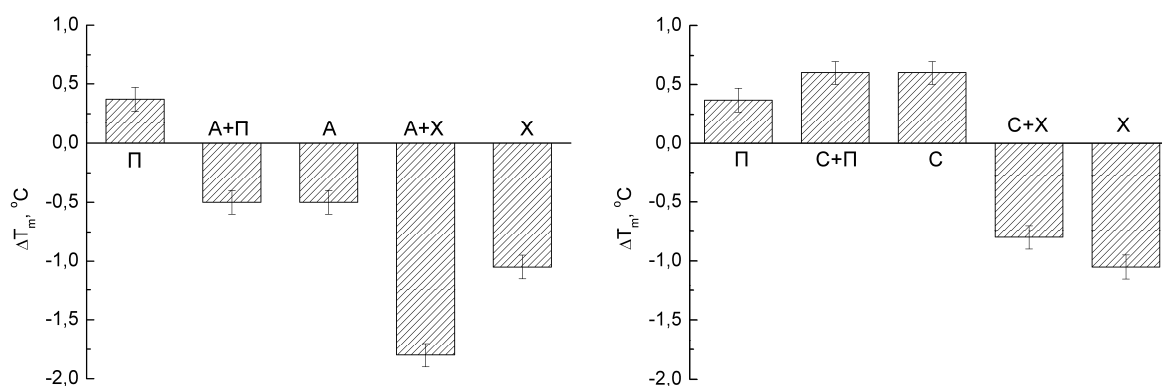


Рис. 1. Сдвиги температуры основного фазового перехода (ΔT_m) в присутствии азитромицина (А), сукцинилхолина (С), повидона (П), холестерина (Х) и их сочетаний.

Как можно видеть, эффекты совместного действия одинаковы для гидрофобного азитромицина и гидрофильного сукцинилхолина: в обоих парах с повидоном наблюдался антагонизм, а с холестерином — аддитивность МД. Таким образом, в выбранных сочетаниях ЛВ их совместное действие не зависело от взаимной локализации в бислое, а также от характера их мембранотропной активности.

Более тонко эффекты МД могут быть изучены с использованием метода квазибинарных диаграмм. Нами были подобраны вещества с ярко выраженным противоположным характером МД: амиксин и диметилсульфоксид (ДМСО). Диаграммы пары «амиксин – ДМСО» для сдвига основного фазового перехода (ΔT_m) и предперехода (ΔT_p) представлены на рис. 2. Как можно видеть, диаграммы обоих переходов в режимах нагревания и охлаждения нелинейны, т.е. совместное действие амиксина и ДМСО неаддитивно. Отклонение от линейности происходит в сторону мембранотропного эффекта амиксина во всём концентрационном диапазоне. Между тем, концентрационная зависимость ΔT_m для чистого амиксина в указанном диапазоне линейна (см. рис. 3, а), т. е. его МД аддитивно по концентрации.

Учитывая, что амиксин является действующим веществом препаратов, а ДМСО часто используется как вспомогательное вещество, способствующие усилению всасывания препарата, возникает закономерный вопрос об эффектах совместного действия основного и вспомогательного веществ, входящих в состав одного и того же препарата. В качестве таких систем нами были выбраны пары «амиксин – гипромеллоза» и «азитромицин – лактоза». Результаты, полученные в этих системах, представлены на рис. 4.

Полученные эффекты совместного действия оказались различными. Для пары

«амиксин – гипромелоза» (рис. 4, а) не наблюдалось существенного отклонения от линейности для ΔT_m , тогда как для пары «азитромицин – лактоза» (рис. 4, б) зарегистрировано отклонение ΔT_m в сторону МД азитромицина. В то же время зависимость $\Delta T_m(c)$ в этом диапазоне концентраций линейна (см. рис. 3, б), т. е. МД азитромицина является массово-аддитивным.

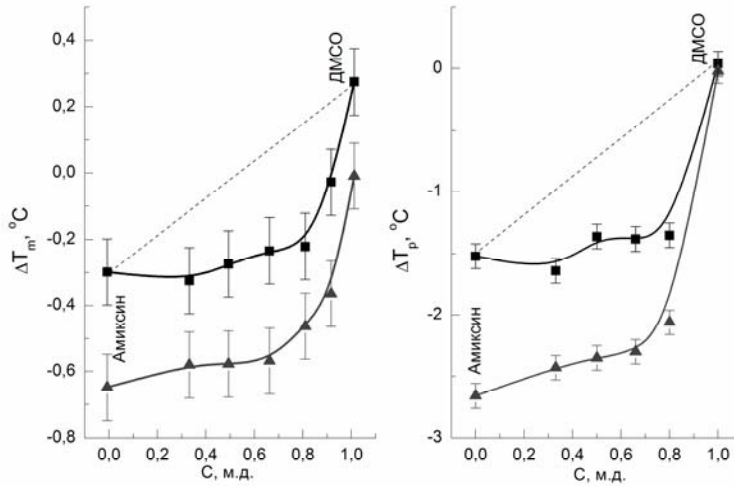


Рис. 2. Зависимости ΔT_m и ΔT_p от мольной доли ДМСО в паре «амиксин – ДМСО» при нагревании (■) и охлаждении (▲).

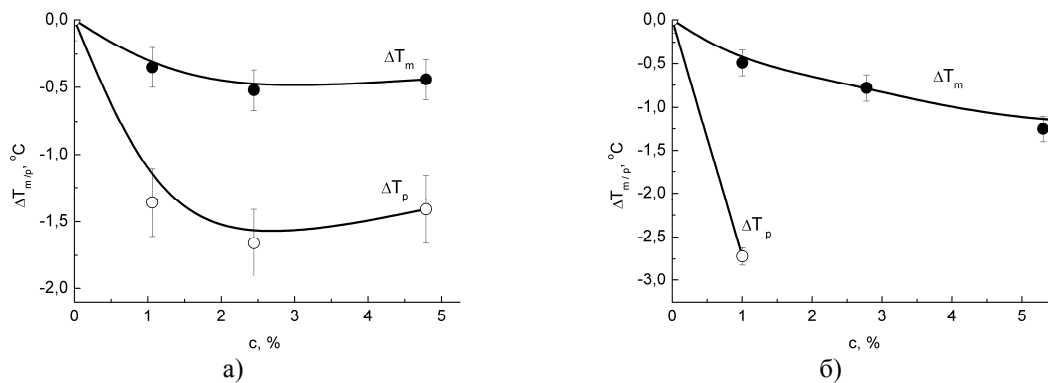


Рис. 3. Зависимости ΔT_m (●) и ΔT_p (○) от концентрации амиксина (а) и азитромицина (б) в мембране ДПФХ.

Удобно ввести параметр совместного действия J_{AB} , который одновременно отражает и тип, и величину эффекта совместного действия, позволяя сравнивать между собой однотипные эффекты:

$$J_{AB} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Delta T_m^{add} - \Delta T_m^i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (1 - c_i) \Delta T_m^A + c_i \Delta T_m^B - \Delta T_m^i, \quad (2)$$

где ΔT_m^A — МД вещества А; ΔT_m^B — МД вещества Б; ΔT_m^{add} — аддитивное МД веществ А и Б; ΔT_m^i — МД системы i , содержащей вещества А и Б; n — количество таких систем c_i — мольная доля компонента Б относительно суммарного количества А и Б.

Параметр J_{AB} означает среднее отклонение от аддитивного значения параметра ΔT_m в ту или иную сторону и имеет размерность температуры. Знак параметра J_{AB} в сопоставлении со знаками МД веществ А и Б отражает тип эффекта совместного действия А и Б (см. табл. 4). Случаи 1 и 6 представляют собой классические случаи синергизма, случаи 2 и 5 описывают антагонизм. Случаи 3 и 4 не являются, в строгом

смысле, ни антагонизмом, ни синергизмом и отражают преимущество МД одного из компонентов при их совместном введении. Рассчитанные по формуле (2) значения J_{AB} составили $-0,2^{\circ}\text{C}$ для пары «амиксин – ДМСО» и $-0,3^{\circ}\text{C}$ для пары «азитромицин – лактоза», что достоверно превышает погрешность измерения. На основании табл. 4 и 2 можно установить, что в первой паре преимущество имеет МД амиксина, во второй — МД азитромицина.

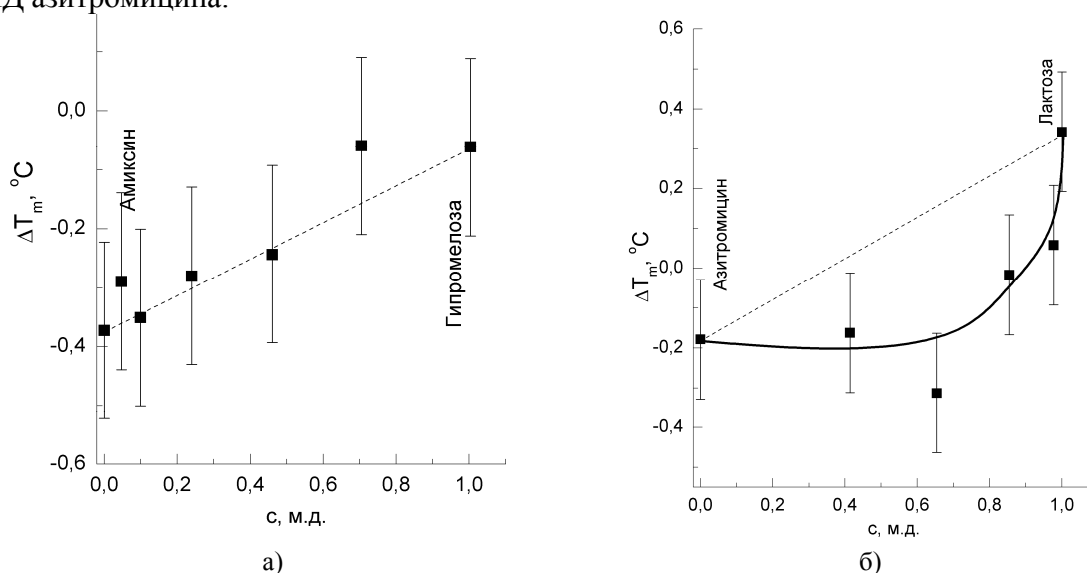


Рис. 4. Зависимости ΔT_m от мольной доли гипромеллозы в паре «амиксин – гипромеллоза» (а); от мольной доли лактозы в паре «азитромицин – лактоза» (б).

Таблица 4

Определение эффектов совместного действия по знакам ΔT_m^A ; J_{AB} ; ΔT_m^B .

№	Знаки ΔT_m^A ; J_{AB} ; ΔT_m^B	Эффект
1.	+++	синергизм
2.	+ - +	антагонизм
3.	--+, ++-	преимущество А
4.	- + +, + - -	преимущество Б
5.	- + -	антагонизм
6.	---	синергизм

Таким образом, в двух из трёх рассмотренных пар ЛВ установлено преимущество мембранотропного действия ДВ по сравнению с ВВ, а в третьей паре наблюдалась аддитивность МД. Наблюдаемый эффект можно рассматривать как не прямое (опосредованное мембраной) взаимодействие между различными ЛВ, в т. ч. и между компонентами одного и того же фармпрепарата.

ВЫВОДЫ

Показано, что при совместном введении в модельную липидную мембрану ДПФХ гидрофильных сукцинилхолина и повидона, а также гидрофобного холестерина и азитромицина в парах с повидоном наблюдался антагонизм, а с холестерином — аддитивность мембранотропного действия. Наблюдаемые эффекты совместного действия напрямую не зависели от характера мембранотропного действия индивидуальных веществ, от степени их липофильности, а также от взаимной локализации в бислое.

Установлены эффекты совместного мембранотропного действия компонентов фармпрепаратов в парах «действующее вещество – вспомогательное вещество». Так, в

парах «азитромицин – лактоза» и «азитромицин – ДМСО» имело место преимущество мембранотропного действия основного действующего вещества; в паре «амиксин – гипромелоза» наблюдалась аддитивность мембранотропного действия обоих веществ.

Благодарности. Авторы благодарят за сотрудничество компании «Интерхим» (Одесса), «Ename» (Киев) и «Biochemie» (Испания).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Викторов А.П. Взаимодействие лекарств и пищи / А.П. Викторов, В.Г. Передрий, А.В. Щербак. – К.: Здоровья, 1991. – 240 с. / Viktorov A.P. Vzaimodejstvie lekarstv i pishchi / A.P. Viktorov, V.G. Peredrij, A.V. Shcherbak. – K.: Zdrorov'ja, 1991. – 240 s.
2. Балткэйс Я.Я. Взаимодействие лекарственных веществ / Я.Я. Балткэйс, В.А. Фатеев. – М.: Медицина, 1991. – 304 с. / Baltkajs Ya.Ya. Vzaimodejstvie lekarstvenny veshchestv / Ya.Ya. Baltkajs, V.A. Fateev. – M.: Meditsina, 1991. – 304 s.
3. К вопросу взаимодействия лекарственных и вспомогательных веществ / И.М. Перцев, Г.С. Башура, М.Т. Алюшин [и др.] // Фармация. – 1973. – № 5. – С. 67. / K voprosu vzaimodeystviya lekarstvennykh i vspomogatel'nykh veshchestv / I.M. Pertsev, G.S. Bashura, M.T. Alyushin [et al.] // Farmatsiya. – 1973. – № 5. – S. 67.
4. Кукес В.Г. Взаимодействие лекарственных средств / В.Г. Кукес // Фармакол. и токсикол. – 1991. – № 2. – С. 82-85. / Kukes V.G. Vzaimodeystviye lekarstvennykh sredstv / V.G. Kukes // Farmakol. i toksikol. – 1991. – № 2. – S. 82-85.
5. Orme M. Drug absorption in the gut / M. Orme // Br. J. Anaesth. – 1984. – V. 56. – P. 59-67.
6. Interactions of isoniazid with membrane models: Implications for drug mechanism of action / M. Pinheiro, A.S. Silva, S. Pisco, S. Reis // Chemistry and Physics of Lipids. – 2014. – V. 183. – P. 184-190.
7. Comparative study of the antimicrobial activity of bis(Na-caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against Staphylococcus aureus and Escherichia coli / J.A. Castillo, P. Clapés, M. R. Infante [et al.] // J. of Antimicrobial Chemotherapy. – 2006. – V. 57. – P. 691-698.
8. Membrane-drug interactions studied using model membrane systems / J. Knobloch, D.K. Suhendro, J.L. Zieleniecki [et al.] // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2015. – V. 22, N 6. – P. 714-718.
9. The role of the anticancer drug vinorelbine in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular modeling / C. Koukoulitsa, I. Kyrikou, C. Demetzos, T. Mavromoustakos // Chemistry and Physics of Lipids. – 2006. – V. 144. – P. 85-95.
10. Correlations between thermostability of multibilayer lipid structure and molecular parameters of guest molecules / A.O. Sadchenko, O.V. Vashchenko, N.A. Kasian [et al.] // Funct. Mater. – 2016. – V. 23, N. 2. – P. 230-235.
11. Seydel J.K. Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling / J.K. Seydel, M. Wiese. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. – 2002. – 350 p.
12. 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. Garsía [et al.] // Cell Biochem. Biophys. – 2013. – V. 66. – P. 461-475.
13. 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.
14. Термодинамические параметры фазовых переходов модельных липидных мембран как маркер мембранотропного действия антибиотиков в препаратах-аналогах / А.О. Красникова, О.В. Ващенко, Н.А. Касян [и др.] // Біофізичний вісник. – 2014. – Вип. – 32 (2). – С. 27-38. / Termodinamicheskiye parametry fazovykh perekhodov model'nykh lipidnykh membran kak marker membranotropnogo deystviya antibiotikov v preparatakh-analogakh / A.O. Krasnikova, O.V. Vashchenko, N.A. Kasyan [i dr.] // Biophys. Bull. – 2014. – Vip. – 32 (2). – S. 27-38.
15. Binderup M.L. Combined Actions and Interactions of Chemicals in Mixtures / M.L. Binderup, M. Dalgaard, L.O. Dragsted [et al.] – Schultz. – 2003. – 158 p.
16. Toxicity and Drug Testing / Ed. W. Acree ; [concluded : A. Jouyban, A. Pesce, A. Eder [et al.]] — InTech, – 2012. – 528 p.
17. 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. – V. 10. – P. 3155-3162.
18. Фиалков Ю.Я. Физическая химия неводных растворов / Ю.Я. Фиалков, А.Н. Житомирский, Ю.А. Тарасенко. – Л.: Химия. – 1973. – 376 с. / Fialkov Yu.Ya. Fizicheskaya khimiya nevodnykh rastvorov / Yu.Ya. Fialkov, A.N. Zhitomirskiy, Yu.A. Tarasenko. – L.: Khimiya. – 1973. – 376 s.
19. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes / H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J.P. Slotte // Progress in Lipid Research. – 2002. – V. 41. – P. 66-97.
20. Effect of the antibiotic azithromycin on thermotropic behavior of DOPC or DPPC bilayers / N. Fa, S. Ronkart, A. Schanck [et al.] // Chem Phys Lipids. – 2006. – V. 144, N. 1. – P. 108-116.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

UDC 576.315.4

RESPONSE OF EXFOLIATED HUMAN BUCCAL EPITHELIUM CELLS TO COMBINED GAMMA RADIATION, MICROWAVES, AND MAGNETIC FIELD EXPOSURE ESTIMATED BY CHANGES IN CHROMATIN CONDENSATION AND CELL MEMBRANE PERMEABILITY**K.A. Kuznetsov, O.T. Nikolov, Y.G. Shckorbatov***V.N. Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv 61022, Ukraine*

konst.kuznets@gmail.com

Submitted October 31, 2016

Accepted November 7, 2016

Modulation of the biological effects produced by ionizing radiation (IR) using microwave and magnetic fields has important theoretical and practical applications. Response of human buccal epithelium cells to different physical agents (single and combined exposure to 0.5–5 Gy γ -radiation (^{60}Co); microwaves with the frequency of 36.64 GHz and power densities of 0.1 and 1 W/m², and static magnetic field with the intensity of 25 mT) has been investigated. The stress response of the cells was evaluated by counting heterochromatin granules quantity (HGQ) in the cell nuclei stained with orcein. Membrane permeability was assessed by the percentage of cells stained with indigocarmine (cells with damaged membrane). The increase of heterochromatin granules quantity (HGQ), i.e. chromatin condensation was detected at the doses of 2 Gy and higher. Changes in the cell membrane permeability to indigocarmine expressed the threshold effect. Membrane permeability reached the threshold at the doses of 2–3 Gy for the cells of different donors and did not change with the increase of the dose of γ -radiation. Cells obtained from different donors revealed some individual peculiarities in their reaction to γ -radiation. The static magnetic field and microwaves applied before or after γ -radiation decreased its impact, as revealed by means of HGQ assessment.

KEYWORDS: heterochromatin, cell stress, cell damage, hormesis, static magnetic field, electromagnetic field.

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА НА КОМБИНИРОВАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ, МИКРОВОЛН И МАГНИТНОГО ПОЛЯ, ОПРЕДЕЛЁННАЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ КОНДЕНСАЦИИ ХРОМАТИНА И ПРОНИЦАЕМОСТИ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ**К.А. Кузнецов, О.Т. Николов, Ю.Г. Шкорбатов***Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина*

Проблема модификации биологических эффектов ионизирующего излучения с помощью микроволн и магнитного поля имеет важные теоретические и практические аспекты. Рассматривается реакция клеток буккального эпителия человека на действие различных физических факторов (одиночные и комбинированные воздействия γ -излучения 0,5–5 Гр (^{60}Co); микроволн частотой 36,64 ГГц с поверхностной плотностью мощности излучения на уровне объекта 0,1 и 1 Вт/м² и постоянного магнитного поля с индукцией 25 мТл). Стрессовую реакцию клеток определяли путём подсчёта содержания гранул гетерохроматина (СГГ) в ядрах клеток, окрашенных орсеином. Проницаемость клеточных мембран определяли по проценту клеток, окрашенных индигокармином (т.е., имеющих повреждённую мембрану). Выявлено повышение степени конденсации хроматина по показателю СГГ при воздействии дозы γ -излучения 2 Гр и выше. Изменения в проницаемости мембран имеют чётко выраженный порог: проницаемость возрастает при дозе 2–3 Гр, однако при дальнейшем увеличении дозы рост проницаемости останавливается. Клетки, полученные от разных доноров, имели индивидуальные особенности в реакции на действие γ -излучения. Применение постоянного магнитного поля и микроволн перед или после обработки γ -излучением привело к снижению стрессовой реакции клеток по показателю СГГ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетерохроматин, клеточный стресс, клеточные повреждения, гормезис, постоянное магнитное поле, электромагнитное поле.

РЕАКЦІЯ КЛІТИН БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ ЛЮДИНИ НА КОМБІНОВАНИЙ ВПЛИВ ГАММА-ВИПРОМІНЮВАННЯ, МІКРОХВИЛЬ ТА МАГНІТНОГО ПОЛЯ, ВИЗНАЧЕНА ЗА ЗМІНОЮ КОНДЕНСАЦІЇ ХРОМАТИНУ ТА ПРОНИКНОСТІ КЛІТИННОЇ МЕМБРАНИ

К.А. Кузнецов, О.Т. Ніколов, Ю.Г. Шкорбатов

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

Проблема модифікації біологічних ефектів іонізуючого випромінювання за допомогою мікрохвиль і магнітного поля має важливі теоретичні і практичні аспекти. Розглядається реакція клітин букального епітелію людини на дію різних фізичних факторів (одиначні і комбіновані впливу γ -випромінювання 0,5–5 Гр (^{60}Co); мікрохвиль частотою 36,64 ГГц з поверхневою щільністю потужності випромінювання на рівні об'єкта 0,1 і 1 Вт/м² і постійного магнітного поля з індукцією 25 мТл). Стресову реакцію клітин визначали шляхом підрахунку вмісту гранул гетерохроматину (ВГГ) в ядрах клітин, забарвлених орсеїном. Проникність клітинних мембран визначали за відсотком клітин, забарвлених індигокарміном (тобто, мають пошкоджену мембрану). Виявлено підвищення ступеня конденсації хроматину за показником ВГГ при впливі дози γ -випромінювання 2 Гр і вище. Зміни в проникності мембран мають чітко виражений поріг: проникність зростає при дозі 2–3 Гр, однак при подальшому збільшенні дози зростання проникності зупиняється. Клітини, отримані від різних донорів, мали індивідуальні особливості реакції на дію γ -випромінювання. Застосування постійного магнітного поля і мікрохвиль перед або після обробки γ -випромінюванням призвело до зниження стресової реакції клітин за показником ВГГ.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гетерохроматин, клітинний стрес, клітинні пошкодження, гормезис, постійне магнітне поле, електромагнітне поле.

At present time a special attention is mostly given to the description of biological effects of low and medium doses of ionizing radiation (IR). These doses are defined at <0.5 Gy (low) and 0.5–5 Gy (medium) [1, 2]. There are reviews dedicated to the mechanisms of ionizing radiation-induced damage [1, 3–5] and possible hormetic effect or low doses [6]. Furthermore, the problem of modification of cell effects of γ -radiation by non-ionizing electromagnetic field attracts the attention of biologists and physicians in connection to the broad usage of treatment of cancer patients with ionizing radiation (about 50% of cancer patients receive ionizing radiation treatment) [7]. The possibility of enhancement of cancer cells damages produced by ionizing radiation by the combined ELF-EMF exposure was demonstrated [8] as well as the same ability of only magnetic field regarding the effects caused by ionizing radiation [9]. On the contrary, some of investigators report about damage-reducing effects of microwaves combined with γ -radiation [10, 11].

The non-thermal biological effects of any ionizing radiation and such effects in non-ionizing range can appear only at relatively low doses (or power densities). Due to a presence both of thermal and non-thermal effects of non-ionizing radiation there is a question about ability of even low doses to affect the cell structures. It is proved that radiofrequency range radiation can cause DNA strand breaks [12]. Also there are reports about epidemiological hazard of microwaves [13] for their indirect role in carcinogenesis and even the equality of long-term GSM-range irradiation and exposure to alpha-particles in their biological effectiveness [14]. However, there is a data about the absence of microwaves exposure effects on the reproductive organs [15] and about the increase of the cell growth rate to microwaves exposure [16].

One of the most easy-to-detect cell stress response character is the state of chromatin in cell nuclei. Having two functional states (euchromatin with high transcriptional activity and heterochromatin with low one) chromatin changes its conformation under exposure to different stress factors (heat shock, chemical agents, radiation etc.) [17, 18].

Changes in cell membranes are also important to evaluate the cell damage after exposure to stress factors. Increase of cell membrane permeability under exposure to electromagnetic field was shown theoretically [19] and experimentally [20, 21]. The problem of modification

of the biological effects produced by ionizing radiation (IR) by means of microwave and magnetic field has important theoretical and practical aspects. Early research data in this field are summarized in [22].

The aim of the present work was to investigate changes in cell membranes and chromatin in response to combined exposure by ionizing, non-ionizing radiation and magnetic field.

MATERIALS AND METHODS

Human buccal epithelium cells were chosen as an experimental object because of their large size (approximately 50 μm in diameter), having a large nucleus (about 10 μm in diameter), easy for microscopic analysis, and bloodless and painless procedure of obtaining. The cells were exfoliated by spatula from inner side of cheek of 2 goodwill men donors: 19 years old donor A, and 23 years old donor B. All of them were informed about purposes and course of experiment. During the experiments cells were stored in 3.03 mM phosphate buffer solution, pH=7.0 with addition of 2.89 mM CaCl_2 at a temperature of 20°C [23]. After 15 minutes of exfoliation the cells were suspended in described solution and then were exposed to γ -radiation and combinations of static magnetic field or microwaves with γ -rays. Magnetic field and microwaves exposure were applied directly before or after exposure to γ -radiation.

As the source of γ -radiation was used the setup using ^{60}Co emanation "Issledovatel-1" with power of absorbed dose 0.007 Gy/sec. The dose was estimated by ferrosulphate dosimetry method [24]. Cell samples (each of 100 μl in 200 μl Eppendorf test-tube) were exposed to 0.5 – 5 Gy doses (72 – 720 sec exposure time). The source of static magnetic field with 25mT magnetic induction was a magnet. Cell suspension in Eppendorf test-tube was placed on the north pole side of magnet and treated during 5 min. Microwaves were emitted by Gann diode-based setup, constructed by Professor V.N. Bykov at the Department of Theoretic Radiophysics of the V.N. Karazin Kharkiv National University. The authors express their gratitude to Professor V.N. Bykov. The frequency of microwaves produced by the setup was 36.64 GHz, power densities were 0.1 and 1 W/m^2 (accordingly to 0.15 and 0.55 m from the surface of object to the edge of the horn antenna). A thin layer (<1 mm) of cell suspension placed on a glass slide was exposed to both power values for 30 sec. Combined exposures were conducted by using the magnetic field and microwaves before and after γ -irradiation with 15 min interval between exposures. These exposure combinations proved their efficiency in modification of γ -radiation biological effects in human cells [25].

The cell samples were examined using the MIKMED-6 var.7 microscope (LOMO, Russia) at magnification of 400x. Heterochromatin granule quantity (HGQ) was counted for assessment of the chromatin state in cell nuclei. The 2% orcein (E. Merck, Germany) solution in 45% acetic acid [27] was used for staining of cell immediately after their exposure. HGQ mean values of every variant of exposure were assessed in 3 repeats of 100 cells. In Figures are presented mean values of HGQ and SEM. Permeability of cell membrane was evaluated by staining with 5 mM indigocarmine (Sigma-Aldrich, USA dissolved in described buffer solution. Percent of stained (i.e. damaged) cells was counted in 10 repeats of 100 cells for each variant. The mean values of stainability and SEM are presented.

All data obtained were processed by Student method with Bonferroni correction for multiple comparisons. The correlation analysis was performed by Spearman method.

RESULTS AND DISCUSSION

HGQ in control not differed in cells of Donors A and B. The data presented in Fig.1 shows the slight increase in HGQ in cells of donor B after exposure to relatively small doses of γ -radiation (0.5 Gy). For cells of donor A 1 Gy dose induced statistically significant

increase in HGQ. For cells of both donors the value of HGQ at 2–5 Gy was similar, forming so-called “plateau” which is described earlier [25]. The increase in HGQ in cells of both donors was about 25% (Fig. 1).

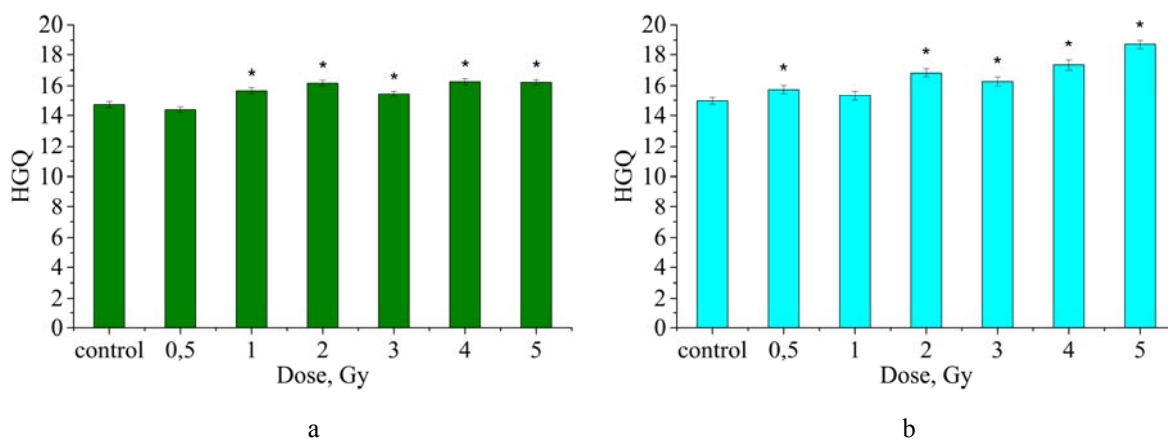


Fig. 1. Changes of chromatin state in human buccal epithelium cells nuclei after exposure to γ -radiation; a) – cells of Donor A, b) – cells of Donor; here and below the variants of experiment with significant difference ($p < 0.05$) from control are marked with “*”.

According to the experimental data the cells obtained from donors have variations in HGQ sensitivity to γ -radiation. The cells of Donor A revealed more sensitivity and answered by HGQ increase after the 1 Gy exposure. The cells of Donor B answered to a higher dose of IR – only to the 2 Gy exposure. Thus, the investigations of combined exposures were conducted with using the dose of 2 Gy because the significant changes of heterochromatin state at this dose were detected in cells of both donors.

Static magnetic field exposure (MF) combined with the γ -radiation exposure has led to decrease of HGQ in cell nuclei in case of pre-exposure with magnetic field (Fig. 2). Such response can be interpreted as lowering of the stress reaction caused by γ -radiation, because the increase of HGQ is connected with effects of different external stress factors [27].

These data are in a good agreement with the data demonstrating the decrease of harmful effects of IR after exposure to MF [26, 27] and contradict with results demonstrating synergetic effects of 60 Hz EMF with γ -radiation [28, 29].

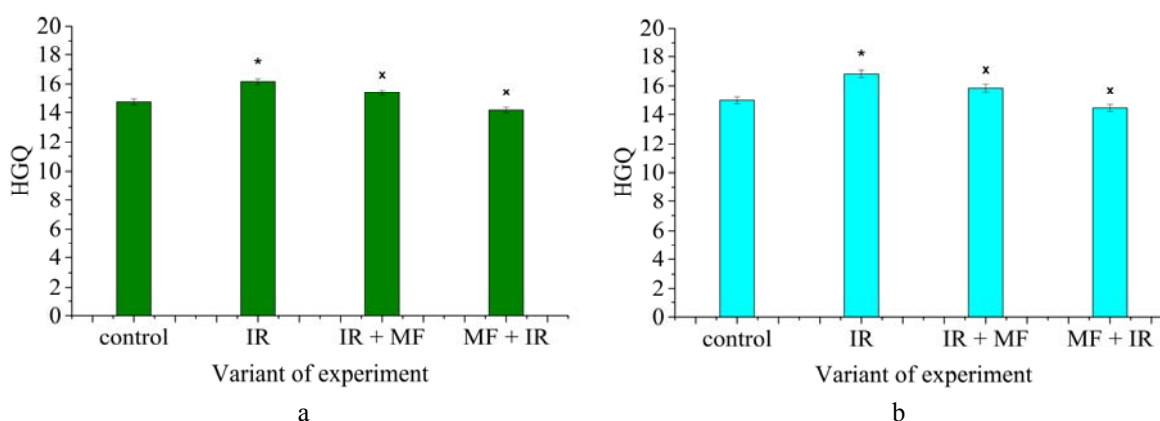


Fig. 2. Changes of chromatin state in human buccal epithelium cells nuclei after combined exposure to 2 Gy dose of γ -radiation (IR) and static magnetic field of 25 mT intensity (MF); a) – cells of Donor A, b) – cells of Donor B; here and below the difference of combined exposure variants from only γ -radiation exposure are marked with “x”.

The combined exposure to microwave and γ -radiation has also led to decrease in HGQ with both power densities (0.1 and 1 W/m²) regardless the order of exposure (Fig. 3). In cells of Donor A exposure to 1 W/m² microwaves before γ -radiation significantly lowered the HGQ even below the control. In cells of Donor B pre-exposure and post-exposure to both 0.1 and 1 W/m² microwaves of intensities reduced γ -radiation-induced HGQ elevation (Fig. 3b).

Our data are in good agreement with works [22, 30] but contradict to data of other researchers not detected synergetic or reparative effects of microwaves on DNA damage produced by γ -radiation [31, 32].

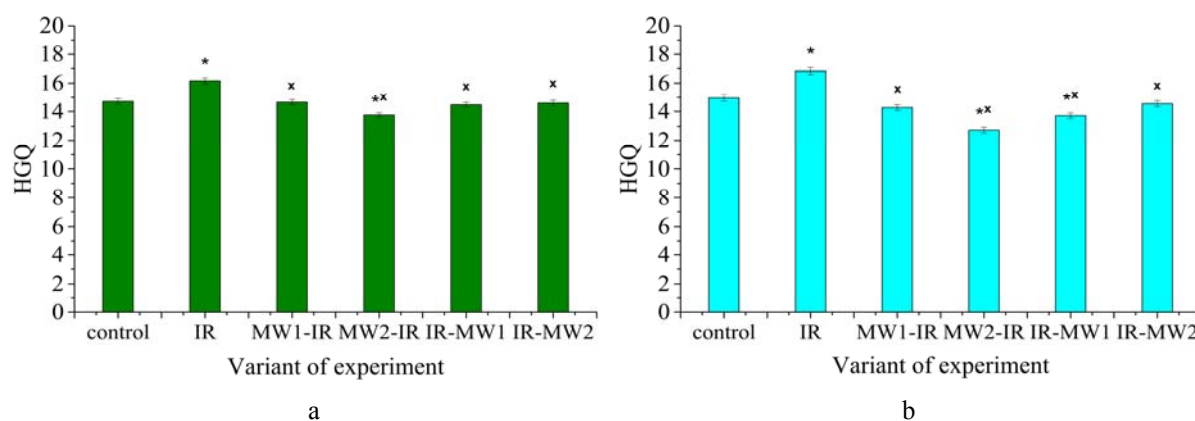


Fig. 3. Changes of chromatin state in human buccal epithelium cells nuclei after combined exposure to microwaves and gamma radiation (MW 0.1– exposure to microwave radiation of intensity 0.1 W/m²; MW 1 – exposure to microwave radiation of intensity 1 W/m²; and IR – exposure to gamma radiation in dose 2 Gy); a) – cells of Donor A, b) – cells of Donor B.

We demonstrated IR-induced increase of membrane permeability (increase of cell membrane permeability to indigocarmine) in cells of both donors. Changes in cell membrane permeability of donor A cells were significant only at dose of 3 Gy and above which is the evidence of reparation processes in cell membranes exposed up to 3 Gy (Fig. 4a). Changes in cell membrane permeability of donor B cells were detected at all applied doses from 0.5 to 5 Gy (Fig. 4b). The cell answer to γ -radiation by increase of membrane permeability had a threshold character. The correlation coefficient between changes in HGQ and membrane damage in cells of Donor B was 0.9.

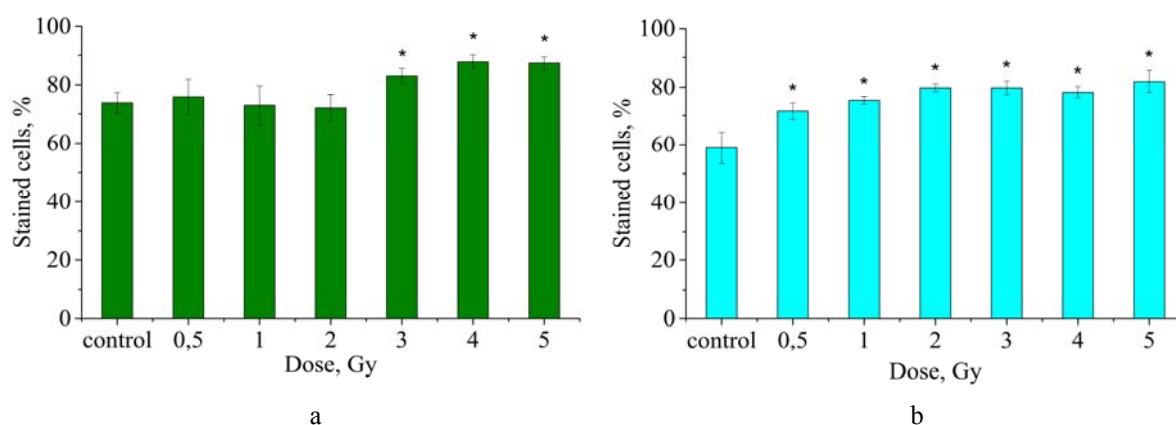


Fig. 4. Membrane permeability of human buccal epithelium cells after exposure to γ -radiation; a) – cells of Donor A, b) – cells of Donor B.

In spite of attenuating IR-induced effects detected in the HGQ, the combined exposure of γ -radiation and magnetic field led to increase of cells membrane damage (Fig. 5). The same picture was mostly observed in combination of γ -radiation with microwaves (Fig. 6). The only exception – decrease of IR-induced membrane permeability in cells of donor B by microwaves of intensity 1 W/m^2 applied before or after γ -radiation.

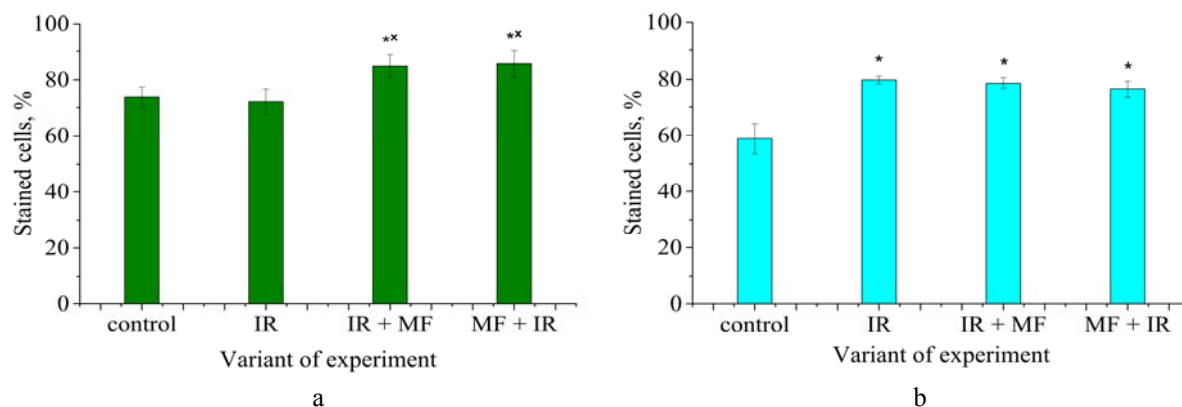


Fig. 5. Membrane permeability of human buccal epithelium cells after combined exposure to 2 Gy dose of γ -radiation (IR) and static magnetic field (MF); a) – cells of Donor A, b) – cells of Donor B.

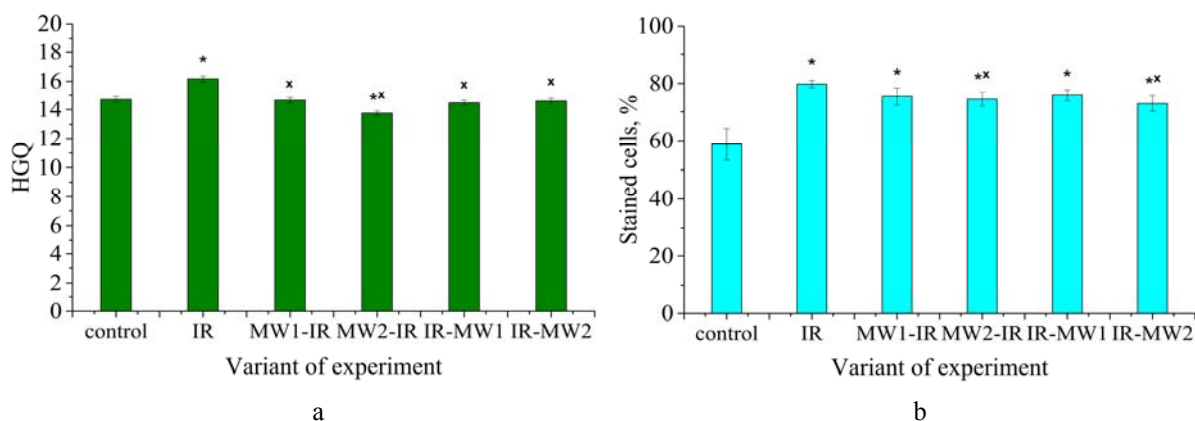


Fig. 6. Membrane permeability of human buccal epithelium cells after combined exposure to microwaves (MW – 0.1 W/m^2 and 1 W/m^2) and to γ -radiation of 2 Gy dose (IR); a) – cells of Donor A, b) – cells of Donor B.

Our experimental data demonstrate the distinct modifying effect of magnetic field/microwaves on γ -radiation induced cell response measured by chromatin condensation. This effect is in good agreement with cell responses to electromagnetic and magnetic field applied in combination with ionizing radiation [22, 26, 27, 30–32]. In our opinion, this is connected with the leading role of cell nucleus in cell resistance to stress factors.

CONCLUSIONS

The response of buccal epithelium cells to medium doses of ionizing radiation (0.5 – 5 Gy) results in changes of chromatin state. The increase of heterochromatin granules quantity (HGQ), i.e. chromatin condensation was detected at 2 Gy dose. Cell answer to γ -radiation revealed some donor-dependent peculiarities in sensitivity to applied factors. The cell response with the increase of dose to sub-lethal values (4 – 5 Gy) revealed the slowing-down or even absence of further HGQ increase after 2 Gy dose. Changes in cell membranes permeability to vital dye expressed the threshold effect. Membrane permeability reached threshold at the dose 2 – 3 Gy for cells of different donors. The γ -radiation-induced

heterochromatinization was less expressed under exposure both to static magnetic field or microwaves combined with γ -radiation exposure. In most cases the γ -radiation-induced cell membrane damage became even more expressed after combined exposure with magnetic field or microwaves. Only in cells of one donor the microwave irradiation (1 W/m^2) revealed protective effect on cell membranes. Thus, the effect of reversion the γ -radiation-induced effect on chromatin condensation by magnetic field and microwaves is shown. γ -radiation-induced increase of cell membranes permeability not demonstrate such distinct effects in the same experimental conditions.

REFERENCES

1. Low dose effects of ionizing radiation on normal tissue stem cells / K. Manda, J. Kavanagh, B. Dajana [et al.]. // *Rev. Mutat. Res.* – 2014. – V. 761. – P. 6–14.
2. Non-targeted effects of ionizing radiation—implications for low dose risk / M. Kadhim, S. Salomaa, E. Wright Dajana [et al.]. // *Mutat. Res.* – 2013. – V. 752. – No 1. – P. 84–98.
3. Review and evaluation of updated research on the health effects associated with low-dose ionising radiation / L. Dauer, A. Brooks, D. Hoel [et al.]. // *Radiation Protection Dosimetry.* – 2010. – V. 140. – No 2. – P. 103–136.
4. γ H2AX responses in human buccal cells exposed to ionizing radiation / M. Siddiqui, M. Francois, M. Fenech, W. Leifert. // *Cytometry.* – 2014. – V. 87, part A. – No 4. – P. 296–308.
5. Takahashi A. Molecular mechanisms involved in adaptive responses to radiation, UV light, and heat / A. Takahashi, T. Ohnishi. // *J. Radiat. Res.* – 2009. – V.50. – No 5. – P. 385–393.
6. Effect of low doses (5-40 cGy) of gamma irradiation on lifespan and stress-related genes expression profile in *Drosophila melanogaster* / S. Zhikrevetskaya, D. Peregudova, A. Danilov [et al.]. // *PLoS ONE.* – 2015. – V. 10. – No 8. – P. 1-19.
7. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions / R. Baskar, K.A. Lee, R. Yeo, K.-W. Yeoh // *Int. J. Med. Sci.* – 2012. – V.9. – No 3. – P. 193–199.
8. Could radiotherapy effectiveness be enhanced by electromagnetic field treatment? / F. Artacho-Cordón, M. Salinas-Asensio, I. Calvente [et al.]. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V.14. – No 7. – P. 14974–14995.
9. Combined exposure of ELF magnetic fields and X-rays increased mutant yields compared with X-rays alone in pTN89 plasmids/ S.Koyama, T. Nakahara, S. Tomonori, K. Yoshiki // *Journal of Radiation Research.* – 2005. – V. 6. – No 2. – P. 257–264.
10. Induction of adaptive response: Pre-exposure of mice to 900 MHz radiofrequency fields reduces hematopoietic damage caused by subsequent exposure to ionising radiation / Y. Cao, Q. Xu, Z. Jin [et al.]. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2011. – V. 87. – No 7. – P. 720–728.
11. Ispol'zovanie EMI KVCh kak korregirujushhego faktora narushenij v proteazno-antiproteaznoj systeme pri dejstvii ionizirujushhego izluchenija / Ju. V. Paljonaja, V. Z. Harchenko, N. A. Temur'janc, E. N. Chujan. // *Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo. Serija «Biologija, himija».* – 2006. – V. 19. – No4. – P. 167–172.
12. Blank M. Electromagnetic fields stress living cells / M. Blank, R. Goodman. // *Pathophysiology.* – 2009. – V.16. – No 2–3. – P. 71–78.
13. Hardel L. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases / L. Hardel, M. Carlberg, K. Mild. // *Pathophysiology.* – 2009. – V.16. – No 2–3. – P. 113–122.
14. Pesnya D. S. Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test / D. S. Pesnya, A. V. Romanovsky. // *Mutation Research.* – 2013. – V.750. – No 1–2. – P. 27–33.
15. Effect of whole-body 1800MHz GSM-like microwave exposure on testicular steroidogenesis and histology in mice / Z. Forgacs, Z. Somosy, G. Kubinyi [et al.]. // *Reproductive Toxicology.* – 2006. – V.22. – No 1. – P. 111–117.
16. Kwee S. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 2. Microwave radiation / S. Kwee, P. Raskmark. // *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* – 1998. – V.44. – No 2. – P. 251–255.
17. Chromatin in the Nuclear Landscape / D. Beck, R. Bonasio, S. Kaneko [et al.]. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.* – 2010. – V.75. – P. 11–22.
18. Shckorbatov Y. The state of chromatin as an integrative indicator of cell stress. / Y. Shckorbatov // *New Developments in Chromatin Research/ Nova Science Publishers, Inc.; [editors: Neil M. Simpson and Valerie J. Stewart].* – 2012. – P. 123–144.
19. Effects of exogenous electromagnetic fields on a simplified ion channel model / E. Cagni, D. Remondini, P. Mesirca [et al.]. // *J. Biol. Phys.* – 2007. – V.33. – No 3. – P. 183–194.

20. Vliyanie mikrovolnovogo izlucheniya na chasotah mobil'noi svyaziiseti WIMAX na pronicaemost' membran kletok bukkal'nogo epiteliya cheloveka / G. B. Skamrova, M. P. Evstigneev, A. O. Lantushenko [et al.]. // Uchenye zapiski Tavricheskogo nacional'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo, Serija «Biologija, himija». – 2011. – V. 24 (63). – No 4. – P. 282–291.
21. The effects of microwave radiation and weak magnetic field on state of pea (*Pisum sativum* L.) cell membrane and nuclei / O. S. Pasiuga, V. N. Pasiuga, S. S. Ryabuha, Y. G. Shckorbatov. // Bulletin of Kharkiv National Agrarian University, Biology series. – 2014. – V. 32. – No 2. – P. 38–45.
22. Presman A. S. Electromagnetic fields and life / Presman. – New York: Plenum Press, 1970. – 336 p. – (Springer Science+Business).
23. On age-related changes of cell membrane permeability in human buccal epithelium cells / Y. G. Shckorbatov, V. G. Shakhbazov, A. M. Bogoslavsky, A. O. Rudenko. // Mech. Ageing Develop. – 1995. – V. 83. – No 2. – P. 87–90.
24. Henley E. Radiation Chemistry / E. Henley, E. Johnson. – Moscow: Atomizdat, 1974. – 416 p. – (Washington University Press, 1969).
25. The effect of ionizing radiation in combination with static magnetic field and microwave radiation on chromatin state in isolated human buccal epithelium cells / K. Kuznetsov, D. Miroshnik, O. Nikolov, Y. Shckorbatov. // Bulletin of Lviv University, Biology series. – 2014. – No 68. – P. 197–205.
26. Effects of homogeneous and inhomogeneous static magnetic fields combined with gamma radiation on DNA and DNA repair / G. Kubinyi, Z. Zeitler, G. Thuróczy [et al.]. // Bioelectromagnetics. – 2010. – V. 31. – No 6. – P. 488–494.
27. Static magnetic fields modulate X-ray-induced DNA damage in human glioblastoma primary cells / L. Teodori, A. Giovanetti, M. Albertini [et al.]. // J Radiat Res. – 2014. – V. 55. – No 2. – P. 218–227.
28. Increase in X-Ray-induced mutations by exposure to magnetic field (60 Hz, 5 mT) in NF-kB-inhibited cells/ G. Ding, H. Yaguchi, M. Yoshida, J. Miyakoshi. // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2000. – V. 276. – No 1. – P. 238–243.
29. Effects on micronuclei formation of 60-Hz electromagnetic field exposure with ionizing radiation, hydrogen peroxide, or c-Myc overexpression / Y. Jin, G. Kang, J. Lee [et al.]. // Int J Radiat Biol. – 2012. – V. 88. – No 4. – P. 374–380.
30. Effects of 900-MHz microwave radiation on γ -ray-induced damage to mouse hematopoietic system / Y. Cao, Q. Xu, Z. Jin [et al.]. // Journal of Toxicology and Environmental Health. – 2010. – V. 73. – No 7. – P. 507 – 513.
31. Influence of 1.8-GHz (GSM) radiofrequency radiation (RFR) on DNA damage and repair induced by X-rays in human leukocytes in vitro / C. Zhijian, L. Xiaoxue, L. Yezhen [et al.]. // Mutat Res. – 2009. – V. 677. – No 1. – P. 100–104.
32. Effects of modulated microwave radiation at cellular telephone frequency (1.95 GHz) on X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes *in vitro* / L. Manti, H. Braselmann, M. Calabrese [et al.]. // Radiation Research. – 2008. – V. 169. – No 5. – P. 575–583.

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.112.6:[595.767.29 + 597.554.3]017.322:57.043

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕПТИДНОГО СОСТАВА СУПЕРНАТАНТОВ
ИЗ ЛИЧИНОК БОЛЬШОГО МУЧНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR*
И КАРАСЯ СЕРЕБРЯНОГО *CARASSIUS AURATUS* В ПРОЦЕССЕ ХОЛОДОВОЙ
АККЛИМАЦИИ****А. К. Гулевский, Д. В. Третьяк***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, Харьков, 61016,
Украина; Тел. +380573734135, e-mail: profgulevsky@gmail.com*

Поступила в редакцию 12 октября 2016 года

Принята 31 октября 2016 года

Хроматографическим методом исследовано молекулярно-массовое распределение пептидов из супернатантов, полученных из тканей личинок *Tenebrio molitor* и карася серебряного *Carassius auratus* при холодной акклимации. Установлено, что в процессе холодной акклимации пептидный спектр супернатантов из личинок *T. molitor* и *C. auratus* изменяется. Наибольшее количество пептидных фракций имеют супернатанты из неакклимированных личинок *T. molitor* и деакклимированной рыбы. Показано, что у холодоакклимированных личинок *T. molitor* наблюдаются низкомолекулярные пептидные фракции с M от $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ до $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$ Да, а у неакклимированных особей *T. molitor* отмечается значительное количество высокомолекулярных пептидов в диапазоне M от $(46,8 \pm 2,3) \cdot 10^2$ до $(66 \pm 6) \cdot 10^2$ Да. Обнаружено, что деакклимация карася серебряного в зимний период сопровождается органоспецифическими изменениями пептидного состава. После деакклимации в мышцах *C. auratus* выявлены низкомолекулярные пептиды $((14,1 \pm 0,3) \cdot 10^2$ и $(6,75 \pm 0,25) \cdot 10^2$ Да), а в печени – высокомолекулярные $((67,83 \pm 0,21) \cdot 10^2$ и $(64,16 \pm 0,26) \cdot 10^2$ Да) и низкомолекулярные $((34,1 \pm 1,0) \cdot 10^2$ и $(14,29 \pm 0,15) \cdot 10^2$ Да) пептиды. Количественные и качественные изменения пептидного спектра супернатантов из *T. molitor* и *C. auratus* при холодной акклимации могут быть одним из механизмов их естественной адаптации к низким температурам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: холодная акклимация, хроматография, пептиды.**ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕПТИДНОГО СКЛАДУ СУПЕРНАТАНТІВ ІЗ ЛИЧИНОК ВЕЛИКОГО
БОРОШНЯНОГО ХРУЩАКА *TENEBRIO MOLITOR* І КАРАСЯ СРІБНОГО *CARASSIUS
AURATUS* У ПРОЦЕСІ ХОЛОДОВОЇ АКЛІМАЦІЇ****О. К. Гулевський, Д. В. Третяк***Институт проблем криобиологии і криомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23,
Харків, 61016, Україна*

Хроматографічним методом досліджено молекулярно-масовий розподіл пептидів із супернатантів, отриманих із тканин личинок *Tenebrio molitor* і карася срібного *Carassius auratus* за холодової аклімації. Встановлено, що у процесі холодової аклімації пептидний спектр супернатантів із личинок *T. molitor* і *C. auratus* змінюється. Найбільшу кількість пептидних фракцій мають супернатанти із неаклімованих личинок *T. molitor* і деаклімованої риби. Показано, що у холодоаклімованих личинок *T. molitor* спостерігаються низкомолекулярні пептидні фракції з M від $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ до $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$ Да, а у неаклімованих особин *T. molitor* відзначається значна кількість високомолекулярних пептидів у діапазоні M від $(46,8 \pm 2,3) \cdot 10^2$ до $(66 \pm 6) \cdot 10^2$ Да. Виявлено, що деаклімація карася срібного у зимовий період супроводжується органоспецифічними змінами пептидного складу. Після деаклімації у м'язах *C. auratus* виявлені низкомолекулярні пептиди $((14,1 \pm 0,3) \cdot 10^2$ та $(6,75 \pm 0,25) \cdot 10^2$ Да), а у печінці – високомолекулярні $((67,83 \pm 0,21) \cdot 10^2$ і $(64,16 \pm 0,26) \cdot 10^2$ Да) та низкомолекулярні $((34,1 \pm 1,0) \cdot 10^2$ і $(14,29 \pm 0,15) \cdot 10^2$ Да) пептиди. Кількісні і якісні зміни пептидного спектру супернатантів із *T. molitor* і *C. auratus* за холодової аклімації можуть бути одним із механізмів їх природної адаптації до низьких температур.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: холодова аклімація, хроматографія, пептиди.**THE STUDY OF THE PEPTIDE COMPOSITION OF THE SUPERNATANTS FROM MEALWORM
TENEBRIO MOLITOR LARVAE AND GOLDFISH *CARASSIUS AURATUS* DURING COLD
ACCLIMATION****A. K. Gulevsky, D. V. Tretiak**

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

The molecular-mass distribution of peptides from supernatants, obtained from the tissues of larvae *Tenebrio molitor* and goldfish *Carassius auratus* during cold acclimation, has been determined by chromatography. The results showed that peptide spectrum of the supernatants from larvae *T. molitor* and *C. auratus* varied during cold acclimation. The supernatants from non-acclimated larvae of *T. molitor* and deacclimated fish possessed the highest number of peptide fractions. Furthermore, the cold-acclimated larvae of *T. molitor* had the peptide fractions of the low molecular weight (ca. $5.4 \cdot 10^2 \div 22.6 \cdot 10^2$ Da), and non-acclimated insects had the peptides of the high molecular weight (ca. $46.8 \cdot 10^2 \div 66 \cdot 10^2$ Da). Next, the organ-specific changes of the peptide composition of the goldfish during winter deacclimation have been revealed. Specifically, the low molecular weight peptides (ca. $(14.1 \pm 0.3) \cdot 10^2$ and $(6.75 \pm 0.25) \cdot 10^2$ Da), have been detected in the *C. auratus* muscles, and both the high (ca. $(67.83 \pm 0.21) \cdot 10^2$ (ca. $64.16 \pm 0.26) \cdot 10^2$ Da) and low (ca. $(34.1 \pm 1.0) \cdot 10^2$ and $(14.29 \pm 0.15) \cdot 10^2$ Da) molecular weight peptides have been detected in the liver. Quantitative and qualitative changes in the peptide spectra from supernatants of the *T. molitor* and *C. auratus* during cold acclimation could be one of the mechanisms of their natural adaptation to low temperatures.

KEY WORDS: cold acclimation, chromatography, peptides.

В настоящее время выяснение молекулярных механизмов низкотемпературной адаптации живых организмов является одной из актуальных проблем криобиологии. Известно, что холодоустойчивые биологические виды, а именно арктическая рыба [1-4], насекомые (*Meracantha contracta* [5], *Dendroides canadensis* [6], *Choristoneura fumiferana* [7] и *Cucujus clavipes* [8], *Tenebrio molitor* [9]) и бактерии [10-11], способны приспосабливаться к действию низких температур благодаря молекулярным механизмам адаптации, приобретенным в процессе эволюции, в частности за счет синтеза и аккумуляции специфических белков (антифризные белки, антифризные гликопротеины, белки-нуклеаторы, белки холодового шока) и пептидов. Кроме того, установлено, что при низкотемпературной адаптации наблюдаются конформационные изменения части белков холодоустойчивых организмов, которые приводят к увеличению гибкости [12] и стабильности белковых молекул [13, 14] и, в свою очередь, к уменьшению их гидрофобности [15], это способствует сохранению и оптимизации функционального состояния макромолекул при изменении температурных условий среды обитания. Таким образом, процесс адаптации биообъектов к действию низких температур, по-видимому, преимущественно, связан со структурными модификациями их белков и с качественными изменениями их белково-пептидного спектра. Для выяснения общих закономерностей изменений пептидного состава представляло интерес изучить этот процесс при холодной акклимации у представителей различных эволюционных ступеней развития, а именно у позвоночных (карась серебряный *Carassius auratus*) и беспозвоночных (личинки *Tenebrio molitor*) пойкилотермных животных. Целью данной работы было исследовать с помощью гель-проникающей хроматографии пептидный состав супернатантов из личинок *Tenebrio molitor* и тканей (мышцы и печень) карася серебряного *Carassius auratus* в процессе холодной акклимации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены в соответствии с Законом Украины № 3447-IV от 21.02.2006 г. «О защите животных от жестокого обращения», с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.), а также согласно принципам биоэтики и нормам биологической безопасности.

В работе были использованы акклимированные при 5–7°C в течение 3-х недель личинки большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Личинок последних возрастов

гомогенизували в 0,6% розстворі хлориду натрія на 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4) з додаванням інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (Sigma, США) із розрахунок 6 личинок на 2 мл буфера. Гомогенат центрифугували 10 хв при 1800g. Далі надосадочну рідину центрифугували в течение 60 хв при 100000g на центрифугі MSE Superspeed 65 (MSE Scientific Instruments, Великобританія). В дослідженнях використовували супернатант (100000g).

Також в роботі використовували карасей із прудов Валківського рибного господарства Харківської області, вилучених в зимній період (декабрь). Одну групу акліматованих особей *C. auratus* зберігали в холодильній камері при температурі води 4–5°C. Другу групу риб поміщали в аэрируемый акваріум при температурі 20°C в течение 3-х тижнів (процес деаклімации) з метою моделювання літнього режиму в зимній період. Для приготування проб ткани м'язів і печінки *C. auratus* гомогенізували в 0,6% розстворі хлориду натрія на 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4) з додаванням інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (Sigma, США) із розрахунок 0,3 г ткани на 2 мл буфера. Гомогенат центрифугували 10 хв при 1800g. Надосадочну рідину центрифугували в течение 60 хв при 100000g на центрифугі MSE Superspeed 65 (MSE Scientific Instruments, Великобританія). Для хроматографічних досліджень використовували супернатант (100000g). Кількість білка в пробах визначали по методу Бредфорда [16].

Кількісну і якісну оцінку пептидного складу супернатантів із личинок *T. molitor* і тканин м'язів і печінки *C. auratus* проводили з допомогою гелі-проникаючої хроматографії [17] на колонці розміром 400 × 16 мм, заповненій полівиніловим гелем TSK-Gel Toyopearl HW-40 Fine (Toyo Soda Manufacturing Co, Японія), який дає можливість розділити поліпептидні молекули з молекулярною масою від 100 до 12000 Да. Через петлевої інжектор в колонку вводили проби в об'ємі 0,2 мл і з допомогою перистальтичного насоса Microperplex LKB 2132 (Швеція) подавався елююючий фосфатно-солевої буферний розствор (18 мМ Na₂HPO₄, 12 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl (рН 7,4)). Швидкість потоку елюента складала 1,63 мл/хв. Отримані фракції низкомолекулярних речовин білково-пептидної природи реєстрували з допомогою ультрафіолетового оптичного монітора Uvicord SII LKB 2238 (Швеція) при довжині хвилі 280 нм. Сигнал монітора записувався в вигляді хроматограм 2-канальним самопишущим потенціометром Recorder LKB 2210 (Швеція) і подавався на інтегратор Waters 746 Data Module (США), записуючий час утримання фракції і площа під піком. В якості маркерів молекулярних мас використовували рибофлавін з М 376,40 Да (Sigma, США), ангіотензин II з М 1046,18 Да (Sigma, США), ціанокобаламін з М 1355,37 Да (Sigma, США), мелітин з М 2846,46 Да (Sigma, США), інсулін людини з М 5807,57 Да (Sigma, США). Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні. Значимими вважали різниця при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБСУЖДЕНИЕ

Все живі організми, які живуть в умовах зміни температурного режиму, повинні мати температурно-компенсаторні реакції, які можуть проявлятися на різному рівні біологічної організації (від поведінки виду до молекулярного рівня). Область знання адаптаційних процесів холодостійких організмів з кожним роком розширюється і все ж залишається до кінця не вивченою [18-20]. Процеси, що відбуваються на молекулярному рівні організації при низкотемпературній адаптації, є ключовими в розумінні виживання і збереження біологічного виду в несприятливих умовах, тому

изучение и расширение представлений о молекулярных механизмах адаптации биообъектов является актуальной проблемой современной криобиологии.

В данной работе нами был исследован состав пептидов двух представителей биологических видов *Tenebrio molitor* и *Carassius auratus* в процессе холодной акклимации. Следует отметить, что ранее с помощью SDS-электрофореза в ПААГ было показано, что личинки большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* при 2-недельной холодной акклимации продуцируют белки с М 5-10, 30 и 65 кДа [21], которые, в свою очередь, могут иметь шаперонную или антифризную природу. В работе [22] установлено, что в зимний период в красных мышцах и миокарде *Carassius auratus* появляются белки с М 205 кДа, а в печени – 172 кДа. Также автором [22] выявлено, что после 2-недельной деакклимации при 20-22°C спектр белков красных мышц, миокарда и печени *C. auratus* не отличался от тех, что были получены летом, а весной при 4-5°C характерный для зимних условий белок с М 205 кДа сохранялся только в красных мышцах. Вместе с тем большую роль в приобретении устойчивости к низким температурам в процессе холодной акклимации могут иметь изменения пептидного состава биологических сред живого организма, в частности, пептиды могут выступать в качестве регуляторов биосинтеза белков в этих условиях, а также иметь антифризную природу [23-25] или быть пептидами стрессового состояния [26].

С помощью гель-проникающей хроматографии получено распределение веществ белково-пептидной природы из супернатантов холодоакклимированных и неакклимированных личинок *T. molitor* (рис. 1 и табл. 1). В результате анализа экспериментальных данных, выявлено, что супернатанты из неакклимированных и акклимированных к холоду личинок *T. molitor* содержат 10 и 7 белково-пептидных фракций с М от $5,4 \cdot 10^2$ до $\geq 120 \cdot 10^2$ Да соответственно. Вещества с М $\leq 70 \cdot 10^2$ Да идентифицировали как пептиды, а вещества, которые имели М $\geq 120 \cdot 10^2$ Да – как белки. Основными пиками, которые были выявлены в результате анализа хроматографического разделения низкомолекулярных веществ белковой и пептидной природы из супернатантов акклимированных к холоду и неакклимированных личинок *T. molitor*, являются пики Pr, A_{4,2}, B₁, C, D и F с М $\geq 120 \cdot 10^2$, $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$, $(15,3 \pm 1,2) \cdot 10^2$, $(11,1 \pm 1,2) \cdot 10^2$, $(8,3 \pm 0,6) \cdot 10^2$ и $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ Да соответственно (рис. 1).

Как видно из рис. 1 качественный состав низкомолекулярных веществ пептидной природы супернатантов из личинок *T. molitor* в процессе низкотемпературной акклимации существенно изменяется. Следует отметить, что у акклимированных к холоду личинок *T. molitor* отсутствуют 4 высокомолекулярные пептидные фракции (пики A₁, A_{1,1}, A₂ и A₃) с М $(66 \pm 6) \cdot 10^2$, $(60,4 \pm 2,8) \cdot 10^2$, $(53,3 \pm 2,0) \cdot 10^2$ и $(46,8 \pm 2,3) \cdot 10^2$ Да, и отмечается появление низкомолекулярных пептидов с М $(13,0 \pm 0,8) \cdot 10^2$ Да (пик B₂). Для супернатантов из акклимированных *T. molitor* характерно наличие 6 низкомолекулярных пептидных фракций с М от $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ до $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$ Да.

Можно предположить, что полученные качественные изменения спектра низкомолекулярных веществ пептидной природы являются одним из проявлений низкотемпературных механизмов холодоустойчивости насекомых *T. molitor*, что способствует их выживанию в неблагоприятных условиях существования. Выявленная фракция пептидов с М $(13,0 \pm 0,8) \cdot 10^2$ Да у личинок *T. molitor* после акклимации может иметь антифризную природу, что позволяет насекомым переносить стрессовые условия. Фракции пептидов с М $(66 \pm 6) \cdot 10^2$, $(60,4 \pm 2,8) \cdot 10^2$, $(53,3 \pm 2,0) \cdot 10^2$ и $(46,8 \pm 2,3) \cdot 10^2$ Да, которые отсутствуют у акклимированных особей *T. molitor*, могут функционировать как нуклеаторы, т.е. инициировать процессы кристаллизации, а поскольку стратегия холодоустойчивости личинок *T. molitor* заключается в избегании замерзания, то естественно, что после холодной акклимации данные вещества исчезают.

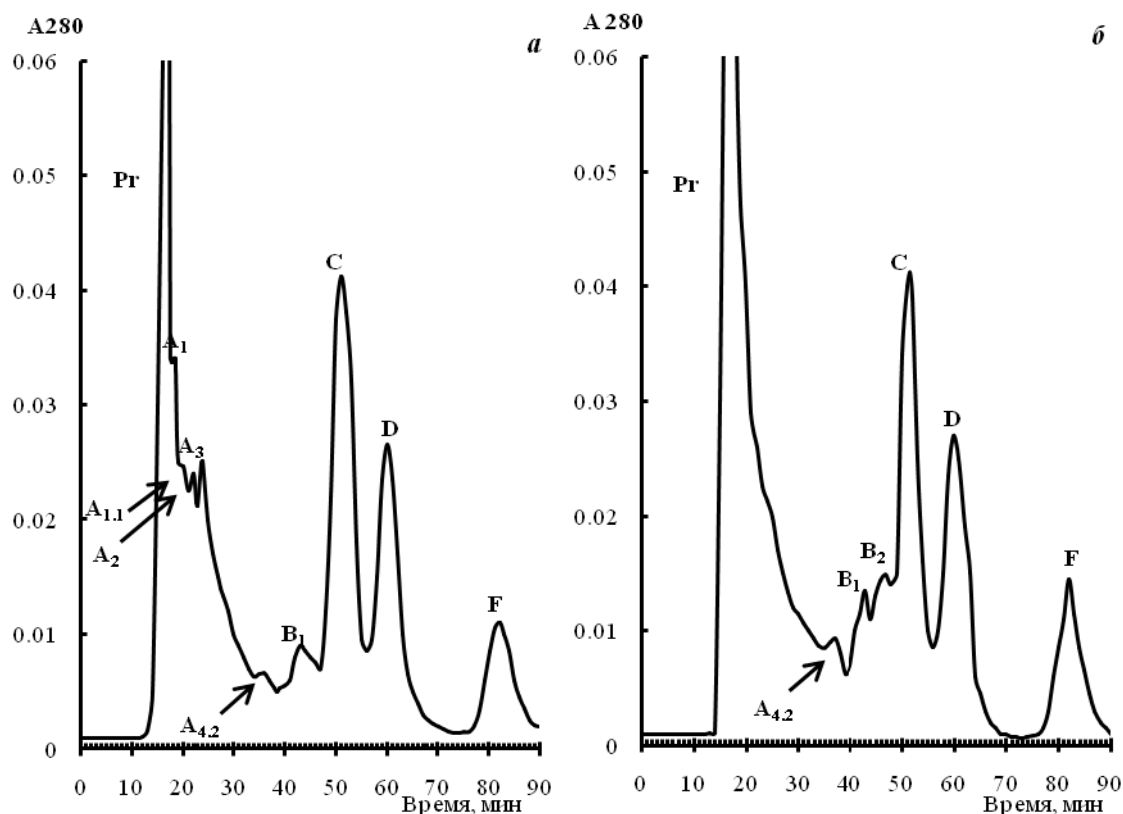


Рис. 1. Типичные хроматограммы распределения белково-пептидных фракций супернатантов из личинок *T. molitor*: а – неакклимированные личинки, б – акклимированные личинки.

Таблица 1

Средние значения хроматографических параметров белково-пептидных фракций супернатантов из личинок *T. molitor*

Пик	Средняя молекулярная масса фракции, 10^2 Да	Неакклимированные личинки		Акклимированные личинки	
		Средняя площадь пика, $\cdot 10^2$ мм ²	Площадь пика, %	Средняя площадь пика, $\cdot 10^2$ мм ²	Площадь пика, %
Pr	≥ 120	$14,5 \pm 2,1$	34 ± 5	33 ± 6	70 ± 12
A ₁	66 ± 6	$2,7 \pm 0,21$	$6,4 \pm 0,5$	-	-
A _{1.1}	$60,4 \pm 2,8$	$3,34 \pm 0,14$	$7,8 \pm 0,3$	-	-
A ₂	$53,3 \pm 2,0$	$4,83 \pm 0,29$	$11,3 \pm 0,7$	-	-
A ₃	$46,8 \pm 2,3$	$1,3 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,7$	-	-
A _{4.2}	$22,6 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,4$	$2,8 \pm 1,0$	$0,2 \pm 0,08^*$	$0,35 \pm 0,18^*$
B ₁	$15,3 \pm 1,2$	$1,45 \pm 0,28$	$3,4 \pm 0,7$	$0,63 \pm 0,22^*$	$1,5 \pm 0,5^*$
B ₂	$13,0 \pm 0,8$	-	-	$1,3 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,8$
C	$11,1 \pm 1,2$	$7,2 \pm 0,3$	$16,8 \pm 0,8$	$5,99 \pm 0,20^*$	$12,6 \pm 0,4^*$
D	$8,3 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,4$	$9,6 \pm 0,9$	$3,7 \pm 0,5$	$7,8 \pm 1,1$
F	$5,40 \pm 0,20$	$2,10 \pm 0,29$	$4,9 \pm 0,7$	$2,48 \pm 0,09$	$5,20 \pm 0,18$
Общий выход веществ		$42,6 \pm 1,8$		$47,6 \pm 2,3$	

Примечание: n = 6, * – статистически значимые различия по сравнению с неакклимированными насекомыми ($p < 0,05$).

Состав пептидных веществ из супернатантов холодоакклимированных и неакклимированных личинок *T. molitor* имеет количественные различия, в частности статистически значимые изменения наблюдаются во фракциях с М $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$, $(15,3 \pm 1,2) \cdot 10^2$ и $(11,1 \pm 1,2) \cdot 10^2$ Да, соответствующие пикам А_{4,2}, В₁ и С хроматограмм (рис. 1). В процессе холодовой акклимации личинок *T. molitor* отмечается уменьшение количества пептидов с М $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$ и $(15,3 \pm 1,2) \cdot 10^2$ в 8 и в 2,3 раза соответственно (пики А_{4,2} и В₁).

В результате сравнительного анализа хроматографических параметров белково-пептидных фракций супернатантов из личинок *T. molitor* выявлено, что количество белковой фракции (пик P_г) с М $\geq 120 \cdot 10^2$ Да у неакклимированных личинок в 2,3 раза ниже, чем у акклимированных особей. Процентное соотношение низкомолекулярных пептидных фракций с М от $(5,40 \pm 0,20) \cdot 10^2$ до $(22,5 \pm 0,9) \cdot 10^2$ Да в акклимированных к холоду личинок *T. molitor* составило 30,2%, тогда как у неакклимированных – 37,5%. Также следует отметить увеличение количества пептидов с М $(22,6 \pm 0,9) \cdot 10^2$, $(15,3 \pm 1,2) \cdot 10^2$, $(11,1 \pm 1,2) \cdot 10^2$ и $(8,3 \pm 0,6) \cdot 10^2$ Да в 8,0; 2,3; 1,3 и 1,2 раза у неакклимированных *T. molitor* соответственно.

Таким образом, было установлено, что состав низкомолекулярных веществ пептидной природы супернатантов, полученных из личинок *T. molitor*, после низкотемпературной адаптации претерпевает изменения. Обнаруженные количественные и качественные различия в пептидном составе супернатантов из акклимированных к холоду и неакклимированных личинок *T. molitor* могут иметь существенное значение в понимании роли этих компонентов в механизмах холодоустойчивости организмов. Выявленные пептидные фракции у холодоакклимированных личинок *T. molitor* могут иметь антифризную или шаперонную природу, что обеспечивает их устойчивость в условиях действия низких температур.

Также с помощью гель-проникающей хроматографии был изучен пептидный состав супернатантов из тканей мышц и печени карася серебряного *Carassius auratus* в процессе холодовой акклимации (рис. 2).

Молекулярно-массовое распределение белков и пептидов супернатантов, полученных из тканей мышц акклимированного и деакклимированного карася серебряного *C. auratus*, представлено на рис. 2. Качественный пептидный состав супернатантов из мышц акклимированных к холоду и деакклимированных *C. auratus* существенно отличается. При хроматографическом разделении белково-пептидных веществ супернатанты, полученные из мышц деакклимированных и акклимированных *C. auratus* (табл. 2), содержат 9 и 7 фракций. У акклимированных особей *C. auratus* отсутствуют низкомолекулярные пептиды (пики В₁ и Е) с М $(14,1 \pm 0,3) \cdot 10^2$ и $(6,75 \pm 0,25) \cdot 10^2$ Да, соответственно, что может быть связано с молекулярными механизмами адаптации представителей этого биологического вида к действию низких температур.

Следует отметить, что, кроме качественных модификаций, наблюдаются количественные изменения определенных фракций супернатантов из мышц карася серебряного *C. auratus* во время его акклимации и деакклимации (рис. 2). В частности сравнивая хроматографическое распределение низкомолекулярных пептидных веществ из мышц деакклимированных и акклимированных к холоду *C. auratus*, в последних отмечается существенное количественное увеличение (на 17,0 %) пика А₂ с М $(54,7 \pm 0,5) \cdot 10^2$ Да, что может быть связано с сезонными изменениями спектра пептидных веществ. Также следует отметить, что в процессе деакклимации карася серебряного *C.*

auratus наблюдается существенное увеличение количества пептидных фракций B₂ и D с M ($13,63 \pm 0,26$)·10² и ($8,69 \pm 0,21$)·10² Да на 9,6 и 15,1 % соответственно.

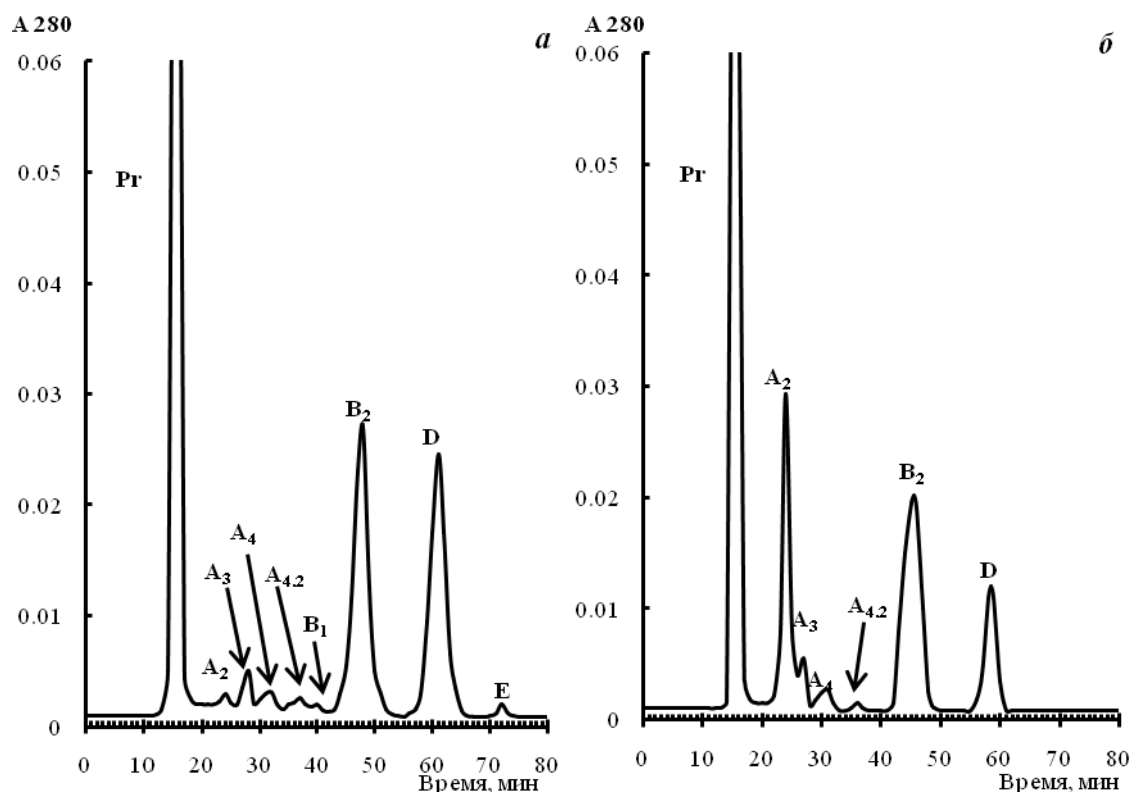


Рис. 2. Типичные хроматограммы разделения белково-пептидных фракций супернатантов из мышц *C. auratus*: а – деакклимированная рыба, б – акклимированная рыба.

Таблица 2

Средние значения хроматографических параметров белково-пептидных фракций супернатантов из мышц карася серебряного *C. auratus*

Пик	Средняя молекулярная масса фракции, ·10 ² Да	Деакклимированная рыба		Акклимированная рыба	
		Средняя площадь пика, ·10 ² мм ²	Площадь пика, %	Средняя площадь пика, ·10 ² мм ²	Площадь пика, %
Pr	≥ 120	2,2 ± 0,3	25 ± 4	2,90 ± 0,28	33 ± 3
A ₂	54,7 ± 0,5	0,1 ± 0,03	1,3 ± 0,4	1,59 ± 0,15*	18,3 ± 1,7*
A ₃	44,9 ± 0,4	0,2 ± 0,06	2,2 ± 0,7	0,2 ± 0,08	2,8 ± 0,9
A ₄	32,5 ± 1,4	0,1 ± 0,07	1,6 ± 0,8	0,1 ± 0,05	1,6 ± 0,6
A _{4.2}	23,15 ± 0,16	0,1 ± 0,04	1,2 ± 0,5	0,09 ± 0,03	1,1 ± 0,4
B ₁	14,1 ± 0,3	0,060 ± 0,021	0,71 ± 0,23	-	-
B ₂	13,63 ± 0,26	2,97 ± 0,21	35,6 ± 2,5	2,26 ± 0,13*	26,0 ± 1,5*
D	8,69 ± 0,21	2,68 ± 0,14	32,1 ± 1,7	1,48 ± 0,16*	17,0 ± 1,8*
E	6,75 ± 0,25	0,060 ± 0,021	0,72 ± 0,24	-	-
Общий выход веществ		8,3 ± 0,6		8,70 ± 0,27	

Примечание: n = 6, * – статистически значимые различия по сравнению с деакклимированной рыбой (p < 0,05).

При сравнительном анализе хроматографического разделения пептидов супернатантов из мышц *S. auratus* значительных количественных изменений пептидных фракций A_3 , A_4 и $A_{4,2}$ с $M(44,9 \pm 0,4) \cdot 10^2$, $(32,5 \pm 1,4) \cdot 10^2$ и $(23,15 \pm 0,16) \cdot 10^2$ Да не наблюдается (рис. 2).

Также были получены распределение белково-пептидных веществ супернатантов из печени карася серебряного *S. auratus* (рис. 3 и табл. 3). Качественный состав пептидных фракций супернатантов из печени холодоакклимированного и деакклимированного карася серебряного *S. auratus* имеет существенные отличия. При анализе молекулярно-массового распределения белково-пептидных веществ, установлено, что супернатанты из печени деакклимированных особей *S. auratus* содержат 8 фракций, а супернатанты из печени акклимированных *S. auratus* – 7 фракций. Основными фракциями, которые выявлены в акклимированных к холоду и деакклимированных *S. auratus*, являются фракции Pr, A_3 , C и E с $M \geq 120 \cdot 10^2$, $(46,7 \pm 1,5) \cdot 10^2$, $(11,5 \pm 0,4) \cdot 10^2$ и $(6,84 \pm 0,20) \cdot 10^2$ Да соответственно.

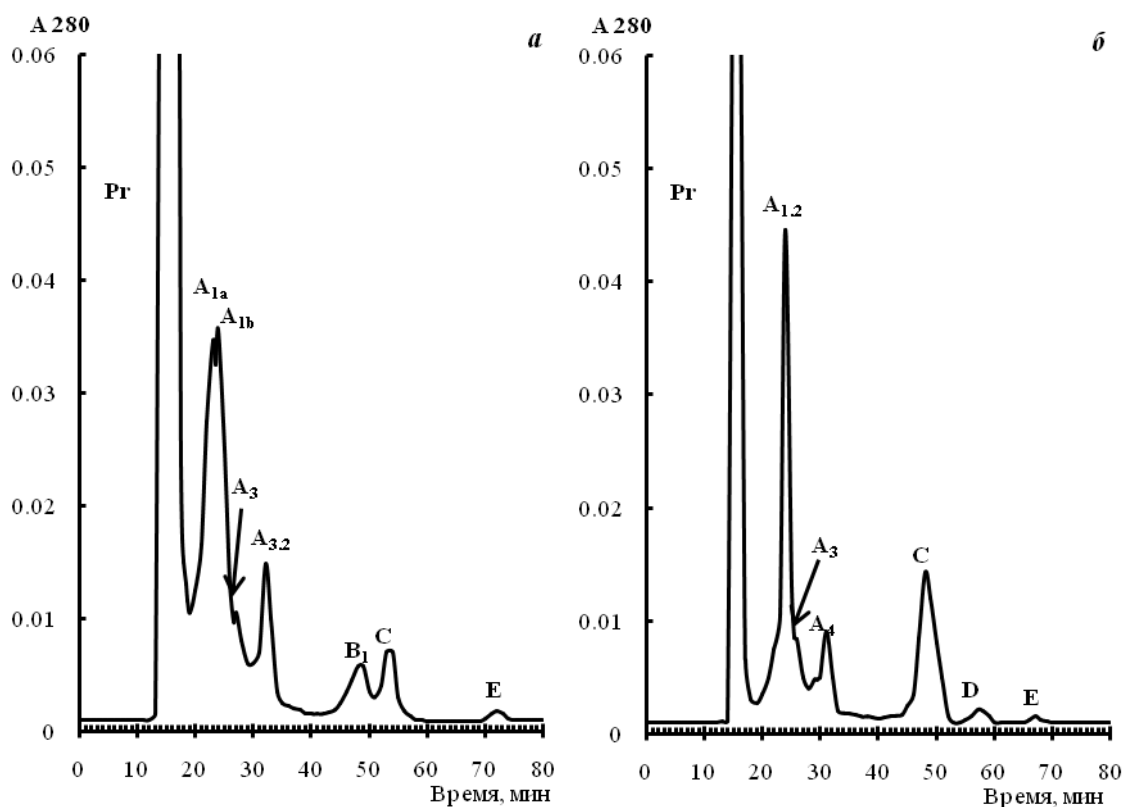


Рис. 3 Типичные хроматограммы разделения белково-пептидных фракций супернатантов из печени *S. auratus*: а – деакклимированная рыба, б – акклимированная рыба.

Следует отметить, что при деакклимации из спектра пептидных веществ печени *S. auratus* исчезают фракции $A_{1,2}$, A_4 и D с $M(56,9 \pm 0,7) \cdot 10^2$, $(31,2 \pm 1,5) \cdot 10^2$ и $(8,7 \pm 0,3) \cdot 10^2$ Да соответственно, которые присутствуют в акклимированных к холоду особей *S. auratus*. В свою очередь состав веществ пептидной природы из печени деакклимированных и акклимированных *S. auratus* отличается отсутствием в последних высокомолекулярных фракций A_{1a} , A_{1b} с $M(67,83 \pm 0,21) \cdot 10^2$ и $(64,2 \pm 0,3) \cdot 10^2$ Да и низкомолекулярных фракций $A_{3,2}$, B_1 с $M(34,1 \pm 1,0) \cdot 10^2$ и $(14,29 \pm 0,15) \cdot 10^2$ Да соответственно (рис. 3).

Таблица 3
Средние значения хроматографических параметров белково-пептидных фракций супернатантов из печени карася серебряного *C. auratus*

Пик	Средняя молекулярная масса фракции, $\cdot 10^2$ Да	Деакклимированная рыба		Акклимированная рыба	
		Средняя площадь пика, $\cdot 10^2$ мм ²	Площадь пика, %	Средняя площадь пика, $\cdot 10^2$ мм ²	Площадь пика, %
Pr	≥ 120	$27,2 \pm 2,4$	84 ± 7	$20,0 \pm 2,8$	77 ± 11
A _{1a}	$67,83 \pm 0,21$	$1,87 \pm 0,26$	$5,8 \pm 0,8$	-	-
A _{1b}	$64,16 \pm 0,26$	$1,76 \pm 0,19$	$5,4 \pm 0,6$	-	-
A _{1,2}	$56,9 \pm 0,7$	-	-	$3,45 \pm 0,24$	$13,3 \pm 0,9$
A ₃	$46,7 \pm 1,5$	$0,07 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,09$	$0,36 \pm 0,10^*$	$1,4 \pm 0,4^*$
A _{3,2}	$34,1 \pm 1,0$	$0,60 \pm 0,09$	$1,84 \pm 0,27$	-	-
A ₄	$31,2 \pm 1,5$	-	-	$0,41 \pm 0,11$	$1,6 \pm 0,4$
B ₁	$14,29 \pm 0,15$	$0,40 \pm 0,08$	$1,26 \pm 0,24$	-	-
C	$11,5 \pm 0,4$	$0,52 \pm 0,12$	$1,6 \pm 0,4$	$1,65 \pm 0,18^*$	$6,3 \pm 0,7^*$
D	$8,7 \pm 0,3$	-	-	$0,1 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,19$
E	$6,84 \pm 0,20$	$0,06 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,09$	$0,08 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,16$
Общий выход веществ		$32,5 \pm 1,2$		26 ± 3	

Примечание: n = 6, * – статистически значимые различия по сравнению с деакклимированной рыбой ($p < 0,05$).

В результате сравнительного анализа установлено, что в акклимированного к низким температурам карася серебряного *C. auratus* наблюдается увеличение количества пептидов с M ($11,5 \pm 0,4$) $\cdot 10^2$ Да в 4,0 раза по сравнению с деакклимированной рыбой.

Обнаруженные качественные и количественные изменения пептидного состава супернатантов, полученных из тканей мышц и печени карася серебряного *C. auratus* в процессе холодовой акклимации могут быть связаны с молекулярными механизмами адаптации данного биологического вида к неблагоприятным условиям среды обитания, а именно к изменению температурных условий.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящей работе на примере двух представителей различных видов животных, а именно карася серебряного *Carassius auratus* (Тип: Хордовые) и большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* (Тип: Членистоногие), показано, что спектр пептидов холодоустойчивых организмов при низкотемпературной адаптации претерпевает модификации, что является одной из молекулярных стратегий адаптации к холоду данных биообъектов.

Установлено, что в процессе холодовой адаптации личинок *T. molitor* происходит уменьшения общего содержания пептидов и количества пептидных фракций. В тоже время у более высокоорганизованных животных *C. auratus* при холодовой адаптации наблюдаются вариации пептидов в различных органах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biochemistry of fish antifreeze proteins / P. L. Davies, C. L. Hew // The FASEB J. – 1990. – V. 4, № 8. – P. 2460–2468.

2. Antifreeze glycopeptides and peptides in Antarctic fish species from the Weddell Sea and the Lazarev Sea / A. P. A. Wohrmann // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1996. – V. 130. – P. 47–59.
3. Compound ice-binding site of an antifreeze protein revealed by mutagenesis and fluorescent tagging / C. P. Garnham, A. Natarajan, A. J. Middleton [et al.] // *Biochemistry.* – 2010. – V. 49, № 42. – P. 9063–9071.
4. Functional validation of hydrophobic adaptation to physiological temperature in the small heat shock protein α A-crystallin / M. Posner, A. J. Kiss, J. Skiba [et al.] // *PLOS ONE.* – 2012. – V. 7, № 3. – e34438.
5. Environmental effects on antifreeze levels in larvae of the darkling beetle, *Meracantha contracta* / J. G. Duman // *J. Exp. Zool.* – 1977. – V. 201, № 2. – P. 333–337.
6. Factors involved in overwintering survival of the freeze tolerant beetle, *Dendroides Canadensis* / J. G. Duman // *J. Comp. Physiol.* – 1980. – V. 136, № 1. – P. 52–59.
7. Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect / S. P. Graether, M. J. Kuiper, S. M. Gagne [et al.] // *Nature.* – 2000. – V. 406, № 6793. – P. 325–328.
8. Comparative overwintering physiology of Alaska and Indiana populations of the beetle *Cucujus clavipes* (Fabricius): roles of antifreeze proteins, polyols, dehydration and diapauses / V. A. Bennett, T. Sformo, K. Walters [et al.] // *J. Exp. Biol.* – 2005. – V. 208, № 23. – P. 4467–4477.
9. Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth / Y. Celik, R. Drori, N. Pertaya-Braun [et al.] // *PNAS.* – 2013. – V. 110, № 4. – P. 1309–1314.
10. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria / J. A. Gilbert, P. J. Hill, C. E. Dodd [et al.] // *Microbiology.* – 2004. – V. 150, № 1. – P. 171–180.
11. Antifreeze protein activity in Arctic cryoconite bacteria / P. Singh, Y. Hanada, S. M. Singh [et al.] // *FEMS Microbiol Lett.* – 2014. – V. 351, № 1. – P. 14–22.
12. Activity–stability relationships in extremophilic enzymes / S. D’Amico, J. C. Marx, C. Gerday [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, № 10. – P. 7891–7896.
13. Protein destabilization at low temperatures / F. Franks // *Adv. Prot. Chem.* – 1995. – V. 46. – P. 105–139.
14. The stability of proteins in extreme environments / R. Jaenicke, G. Böhm // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1998. – V. 8, № 6. – P. 738–748.
15. Molecular characterization of cold adaptation of membrane proteins in the *Vibrionaceae* core–genome / T. Kahlke, S. Thorvaldsen // *PLOS ONE.* – 2012. – V. 7, № 12. – e51761.
16. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс [пер. с англ. проф. В. К. Антонова]. – М.: Мир, 1985. – 358 с. / Skoups R. Metody ochistki belkov / R. Skoups [per. s angl. prof. V. K. Antonova]. – М.: Mir, 1985. – 358 s.
17. Бидлингмейер Б. Препаративная жидкостная хроматография / Б. Бидлингмейер – М.: Мир, 1990. – 360 с. / Bidlingmejer B. Preparativnaya zhidkostnaya hromatografiya / B. Bidlingmejer. – М.: Mir, 1990. – 360 s.
18. Seasonal Adaptations in Arctic Insects / H.V. Danks // *Integr. Comp. Biol.* – 2004. – V. 44, № 2. – P. 85–94.
19. Cold adaptation in insects of Central Yakutia / N. G. Li, A. I. Averenskii // *Biophysics.* – 2007. – V. 52, № 4. – P. 436–439.
20. Amino Acid Substitutions in Cold-Adapted Proteins from *Halorubrum lacusprofundi*, an Extremely Halophilic Microbe from Antarctica / S. DasSarma, M. D. Capes, R. Karan [et al.] // *PLOS ONE.* – 2013. – V. 8, № 3. – e58587.
21. Вплив низьких температур на фенотипічні ознаки і білок-синтезуючий апарат холодостійких жуків *Tenebrio molitor* на різних стадіях розвитку: автореф дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.19 «Кріобіологія і кріомедицина» / Л. І. Реліна. – Харків, 1999. – 16 с. / Vplyv nyz'kykh temperatur na fenotypichni oznaky i bilok-syntezyuyuchyj aparat holodostijkykh zhukiv *Tenebrio molitor* na riznyh stadiyah rozvytku: avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stupenya kand. biol. nauk: spec. 03.00.19 «Kriobiologiya i kriomedycyna» / L. I. Relina. – Harkiv, 1999. – 16 s.
22. Структурні та метаболічні особливості тканин карася сріблястого *Carassius auratus* в умовах температурної аклімації: автореф дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.19 «Кріобіологія» / О. Г. Погожих. – Харків, 2010. – 17 с. / Strukturni ta metabolichni osoblyvosti tkanyn karasya sriblyastogo *Carassius auratus* v umovah temperaturnoi' aklimacii': avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stupenya kand. biol. nauk: spec. 03.00.19 «Kriobiologiya» / O. G. Pogozhyh. – Harkiv, 2010. – 17 s.
23. Synthesis of an antifreeze glycoprotein analogue: efficient preparation of sequential glycopeptide polymers / T. Tsuda, S.-I. Nishimura // *Chem. Commun.* – 1996. – P. 2779–2780.
24. Type I 'antifreeze' proteins - Structure-activity studies and mechanisms of ice growth inhibition / M. M. Harding, L. G. Ward, A. D. J. Haymet // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – V. 264. – P. 653–665.
25. 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish / M. M. Harding, P. I. Anderberg, A. D. Haymet // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V. 270, № 7. – P. 1381–1392.
26. Insect capa neuropeptides impact desiccation and cold tolerance / S. Terhzaz, N. M. Teetsb, P. Cabreroa [et al.] // *PNAS.* – 2015. – V. 112, № 9. – P. 2882–2887.

УДК 577.37

PHOSPHOLIPIDS AS INHIBITORS OF AMYLOID FIBRIL FORMATION**K.O. Vus¹, V.M. Trusova¹, G.P. Gorbenko¹, P. Kinnunen²**¹*V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine*²*Aalto University, 3 Otakaari, Espoo FI-00076, Finland**e-mail: kateryna_vus@yahoo.com, paavo.kinnunen@aalto.fi*

Submitted October 3, 2016

Accepted November 22, 2016

Amyloid fibrils are the protein aggregates, whose formation is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, systemic amyloidosis, etc. Since there is no effective ways to treat these diseases, developing the new anti-amyloid drugs is of great importance. In this study a series of phospholipids have been tested for their ability to inhibit lysozyme and insulin amyloid fibril formation at acidic or neutral pH and elevated temperature. The lag time, elongation rate and fibrillization extent were estimated using Thioflavin T fluorescence assay. It is found that the oxidized and charged phospholipids, included into the liposomes, were the most effective inhibitors of the protein fibrillization. By comparing the magnitude and direction of the lipid effect in different lipid-protein systems it was concluded that the reduction of the amyloid fibril formation is governed by hydrophobic and specific liposome-protein interactions. It is hypothesized that the presence of the surface formed by the lipid polar heads is critical for reducing the protein fibrillization extent.

KEY WORDS: amyloid fibrils of lysozyme/insulin, inhibition, nucleation, oxidized phospholipids, Thioflavin T.

ФОСФОЛІПІДИ ЯК ІНГІБІТОРИ ПРОЦЕСУ УТВОРЕННЯ АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛ**К.О. Вус^{1*}, В.М. Трусова¹, Г.П. Горбенко¹, П. Кіннунен²**¹*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Свободи, 4, Харків 61022, Україна*²*Університет Аальто, вул. Отакаарі, 3, Еспоо FI-00076, Фінляндія*

Амілоїдні фібрили – це білкові агрегати, формування яких пов'язане з патогенезом хвороби Альцгеймера, системного амілоїдозу, тощо. Через відсутність ефективних методів лікування цих захворювань, розробка нових анти-амілоїдних ліків є дуже важливою. У цій роботі серія фосфоліпідів була протестована щодо їх здатності інгібувати формування амілоїдних фібрил лізоциму та інсуліну за умов кислого чи нейтрального рН та підвищеної температури. Лаг-період, швидкість росту та рівень фібрилізації оцінювали, вимірюючи флуоресценцію тіофлавіну Т. Встановлено, що окислені та заряджені фосфоліпіди, що входили до складу ліпосом, були найбільш ефективними інгібіторами фібрилізації білка. При порівнянні величини та напрямку ефекту ліпідів у різних ліпід-білкових системах зроблено висновок про те, що зниження ступеня формування фібрил регулюється гідрофобними та специфічними взаємодіями між ліпосомами та білками. Висловлено припущення, що наявність поверхні, сформованої полярними головками ліпідів, є критичною для зниження рівня фібрилізації білка.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амілоїдні фібрили лізоциму/інсуліну, інгібування, нуклеація, окислені фосфоліпіди, тіофлавін Т.

ФОСФОЛИПИДЫ КАК ИНГИБИТОРЫ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ**К.О. Вус¹, В.М. Трусова¹, Г.П. Горбенко¹, П. Киннунен²**¹*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина*²*Университет Аальто, ул. Отакаари, 3, Эспоо FI-00076, Финляндия*

Амилоидные фибриллы – это белковые агрегаты, формирование которых связано с патогенезом заболевания Альцгеймера, системного амилоидоза, и т.д. Из-за отсутствия эффективных методов лечения этих заболеваний, разработка новых анти-амилоидных лекарств является очень важной. В этой работе серия фосфолипидов была протестирована относительно их способности ингибировать формирование амилоидных фибрилл лизоцима и инсулина в условиях кислого или нейтрального рН и повышенной температуры. Лаг-период, скорость роста и уровень фибриллизации оценивали, измеряя флуоресценцию тиофлавина Т. Обнаружено, что окисленные и заряженные фосфолипиды, входящие в состав липосом, были наиболее эффективными

ингибиторами фибриллизации белка. При сравнении величины и направления эффекта липидов в разных липид-белковых системах сделан вывод о том, что снижение степени формирования фибрилл регулируется гидрофобными и специфическими взаимодействиями между липосомами и белками. Высказано предположение, что наличие поверхности, сформированной полярными головками липидов, является критическим для снижения уровня фибриллизации белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амилоидные фибриллы лизоцима/инсулина, ингибирование, нуклеация, окисленные фосфолипиды, тиофлавин Т.

Amyloid fibrils are protein aggregates with a core cross- β structure implicated into the etiology of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's diseases, etc. [1, 2]. The treatment of these human disorders has become an urgent biomedical problem. In recent years, two main strategies for inhibition of the protein fibrillization have been proposed, viz.: i) developing inhibitors of β - and γ -secretases that prevent A β -peptide cleavage from the amyloid precursor protein; ii) inhibition or reversing protein aggregation itself by the ligands strongly associating with the core regions of the amyloidogenic proteins [3]. The latter is more reasonable, because protein aggregation into amyloid fibrils is not associated with certain biological functions. Despite the presence of some therapy approaches, the majority of drugs possess high toxicity and can only slow the disease progression [4]. Therefore, much attention is paid to development of biocompatible and effective inhibitors of the fibrillogenesis. In particular, natural polyphenols, possessing antioxidant properties, appeared to be superior inhibitors of A β 42 and α -synuclein fibrillization [5, 6], while deoxydoxorubicin and tetracyclines induced disruption of transthyretin amyloid fibrils with the production of nontoxic species [7]. Notably, small molecules seem to inhibit protein fibrillization via stacking between β -strands and preventing β -sheet elongation [8] or by creating protein-resistant coatings on the fibril surface [9]. Of these, very interesting objects to be tested for their applicability as biocompatible anti-amyloid drugs are surfactants and phospholipids. Indeed, ionic surfactants, sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide, exerted inhibiting effects on lysozyme fibrillization due to the strong protein-surfactant electrostatic complex formation, while hydrophobic interactions raised the lag time of amyloid fibril formation [10]. Furthermore, amphiphilic 1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine reduced the extent of insulin fibril formation [11]. However, lipids have also been frequently reported to promote amyloid nucleation, because the protein molecules accumulated on the bilayer could adopt specific aggregation-competent conformation and orientation [12, 13]. For instance, the oxidized phospholipids involved in the oxidative stress, have been reported to accelerate A β 42 and gelsolin fibrillization [14]. In order to solve the above discrepancies, the present study was aimed at testing the ability of the phospholipids to reduce insulin and lysozyme amyloid fibril formation. Specifically, our goal was twofold: i) to analyze the kinetic parameters for the protein aggregation in the presence and absence of lipids using fluorescent amyloid marker Thioflavin T; ii) to evaluate the inhibiting effects of lipid dispersions and vesicles on the extent of amyloid fibril formation.

MATERIALS AND METHODS

Insulin from bovine pancreas and hen egg white lysozyme were purchased from Sigma. Thioflavin T (ThT) concentration was determined using the extinction coefficient $\epsilon_{412}=23800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. 1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PazePC) (Fig. 1A), 1-palmitoyl-2-(9'-oxononanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (PoxnoPC) (Fig. 1B), 1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (PG) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PC) lipids were from Avanti Polar Lipids. Lipid chloroform solutions were dried under a stream of nitrogen, followed by their hydration in buffer. Next, PazePC and PoxnoPC samples were placed in a bath sonicator for 1 h to obtain optically clear lipid dispersions. Liposomes of the following composition: PC:PazePC

(4:1, mol:mol); PC:PoxnoPC (4:1, mol:mol); PC:PG (4:1, mol:mol); PC, below referred to as PazePC₂₀, PoxnoPC₂₀, PG₂₀ and PC, respectively, were prepared by the extrusion technique.

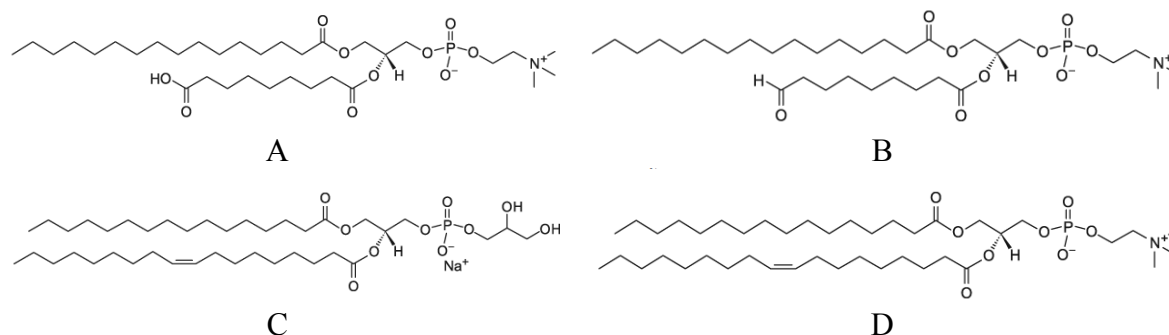


Fig. 1. Structure of the oxidized – PazePC (A), PoxnoPC (B), and nonoxidized phospholipids – PG (C), PC (D)

Amyloid fibril formation in control samples was initiated at varying pH (2 or 7.4), lipid concentration (0, 1.6 and 16.4 μM) under constant stirring at 60 °C. Amyloid nature of the obtained aggregates was confirmed by TEM (Fig. 2). As seen in Fig. 2, protein aggregates are rod-like, unbranched and about 0.2–1.5 μm in length and 10–30 nm in width that is typical for amyloid fibrils [15]. Quantitative characteristics of the fibrillization process were obtained by approximation of the time (t) dependence of the ThT fluorescence intensity at 480 nm (F) with the sigmoidal curve, yielding the lag time, apparent rate constant for the fibril growth (k) and maximal fluorescence of the dye after the saturation has been reached (F_{max}) [16]. Steady-state fluorescence measurements were performed using Varian Cary Eclipse (Varian Instruments, Walnut Creek, CA) spectrofluorimeter. ThT fluorescence was excited at 430 nm.

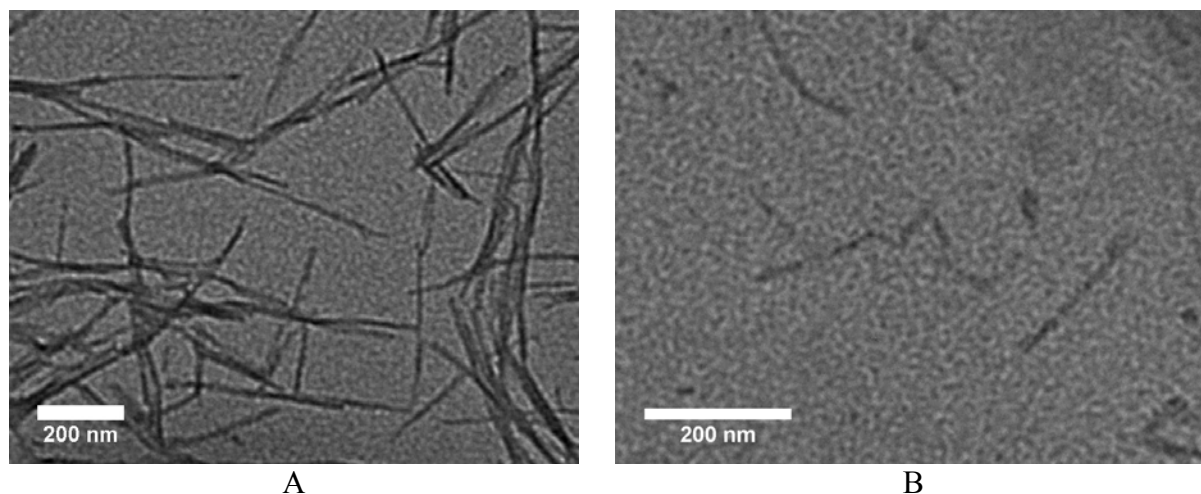


Fig. 2. TEM images of lysozyme fibrils formed at pH 2, 60 °C (A) and insulin fibrils obtained at pH 7.4, 60 °C (B)

RESULTS AND DISCUSSION

As seen in Fig. 3A-C, ThT fluorescence in the presence of PazePC₂₀, PoxnoPC₂₀, PG₂₀ and PC vesicles is reduced as compared to that in control samples. Specifically, the F_{max} values were 19 (for insulin fibrils grown in the presence of PazePC₂₀, pH 2, 60 °C) – 48% (for insulin fibrils grown in the presence of PG₂₀, pH 2, 60 °C) lower for the fibrils grown in the presence of lipids (Table 1). The observed effects can be attributed to decrease in the extent of lysozyme and insulin fibrillization. This interpretation is corroborated by the fact that fibril

morphology was similar for the lipid-modulated and control samples, being suggestive of similar binding sites for ThT [16].

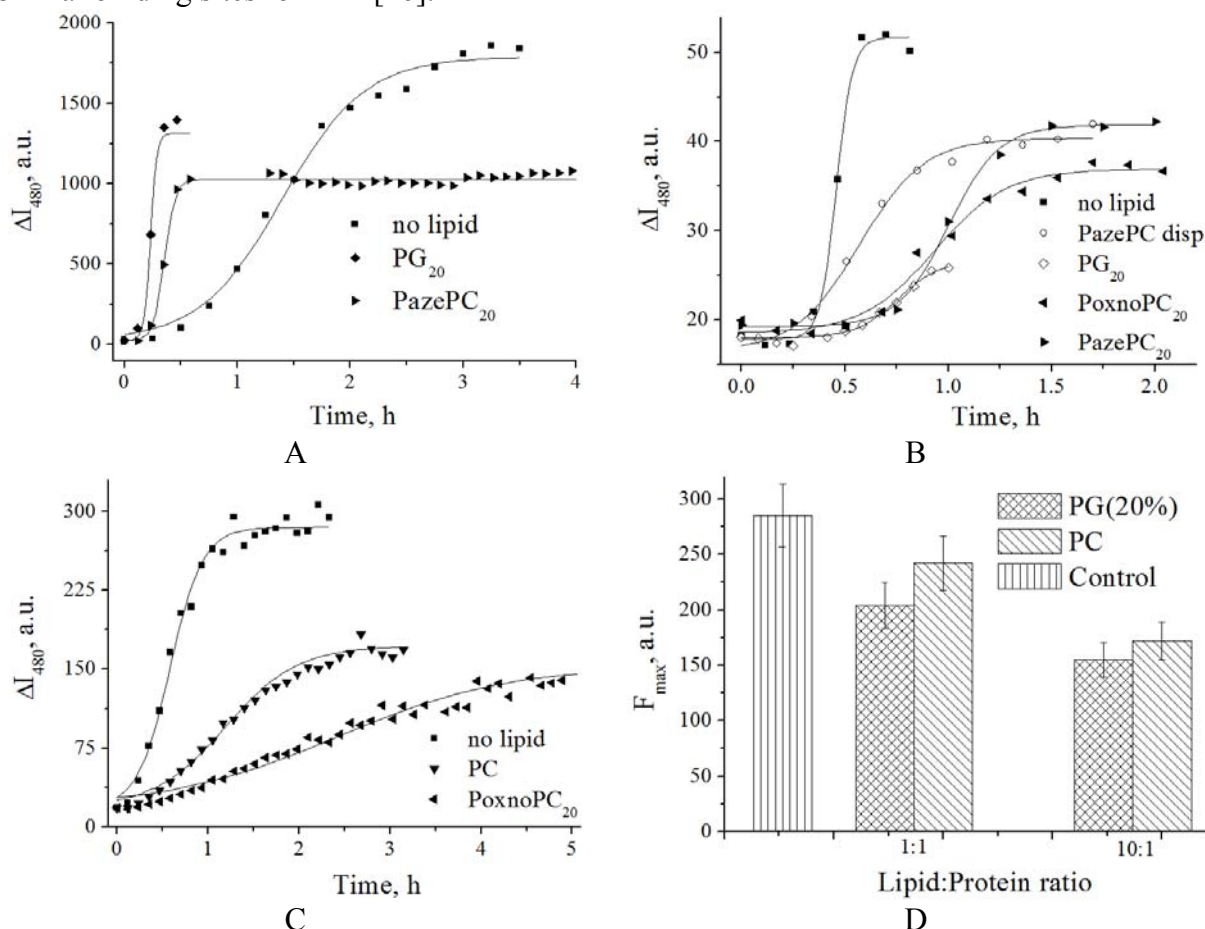


Fig. 3. Kinetics of lysozyme (A) and insulin (B, C) fibrillization at pH 2, 60 °C (A, B), and pH 7.4, 60 °C (C), and dependence of insulin fibrillization rate on lipid-to-protein molar ratio. Lysozyme (insulin), lipid and ThT concentrations were 16.4 (1.6), 16.4 and 14 μ M, respectively

Analysis of the results obtained have shown that: i) lipid vesicles inhibited the amyloid fibril formation more effectively than lipid dispersions; ii) PazePC₂₀ and PoxnoPC₂₀ were the most remarkable species, which led to a significant attenuation of lysozyme and insulin fibril growth, respectively; iii) PG₂₀ and PC reduced insulin fibrillization at acidic and neutral pH, respectively; iv) inhibition of lysozyme fibril formation was accompanied by the reduction of the lag time and increase of the elongation rate, while the opposite effect was observed for insulin. Interestingly, more substantial inhibition of insulin fibrillization was revealed in the presence of liposomes as compared to that caused by the amphiphilic surfactants above the CMC [11]. Despite the fact that hydrophobic interactions are the key driving force for insulin fibrillization, the more pronounced effect of the lipid vesicles on the protein aggregation is due to the hydrophobic effects and lipid structural specificity. For example, higher amount of the exposed hydrophobic patches of insulin at pH 2 led to the faster fibril elongation than at pH 7.4, while lipid-protein hydrophobic interactions attenuated this process (Table 1).

In turn, at pH 7.4, inhibiting effect could be evoked by specific lipid-protein interactions: e.g., protein monomers could be embedded into the PoxnoPC₂₀ domains of the lipid vesicles due to the Schiff base formation, stabilizing an aggregation-resistant protein conformation. Furthermore, liposomes could induce a decrease of the nucleation phase of insulin fibrillization due to the presence of the charged surfaces, inhibiting protein-protein

interactions [10]. In turn, ionic surfactants reduced the lag phase of lysozyme fibrillization at high concentrations where surfactant-protein hydrophobic interactions are predominant, due to complete charge neutralization [10]. The opposite effects of the ionic surfactants and PG₂₀ on lysozyme and insulin lag phases and aggregation rates could result from the stabilization of the lysozyme aggregation-prone conformation. Interestingly, the decrease of the insulin fibrillization extent by 25–40% was observed at the increased lipid-to-protein molar ratio (Fig.1 D) due to the more pronounced protein-lipid hydrophobic and specific interactions.

Table 1

Kinetic parameters of lysozyme and insulin fibrillization in the presence of phospholipids

Protein	Lysozyme (pH 2, 60 °C)			Insulin (pH 2, 60 °C)			Insulin (pH 7.4, 60 °C)		
	k , h ⁻¹	lag time, h	F_{\max} , a.u.	k , h ⁻¹	lag time, h	F_{\max} , a.u.	k , h ⁻¹	lag time, h	F_{\max} , a.u.
Control	2.7	0.7	1788	26	0.4	52	5.5	0.2	285
PG ₂₀	35	0.2	1315	10	0.6	27	5.3	0.5	293
PC	6.3	0.2	2500	18	1.4	77	2.5	0.4	172
PazePC ₂₀	21.5	0.3	1029	8	0.8	42	4.4	0.3	303
PoxnoPC ₂₀	3	0.2	1750	6	0.6	37	1.1	0.5	153
PoxnoPC dispersions	1.1	0.4	4935	7	0.2	50	1.9	0.5	334
PazePC dispersions	3.5	0.7	5331	6	0.3	40	2.9	0.5	457

It should be noted that a number of lipids exerted triggering effect on amyloid formation that is in accordance with the data reported elsewhere (Table 1) [13, 14]. Furthermore, their inhibiting effects were modulated by the environmental conditions: e.g. PG₂₀ reduced insulin fibrillization at pH 2, but had no effect at pH 7.4. The above results confirm the hypothesis emphasizing a significant role of the lipid-protein hydrophobic interactions in the inhibition of fibrillogenesis. Furthermore, specific lipid-protein interactions modulate the influence of vesicles on lysozyme and insulin aggregation: e.g., PoxnoPC₂₀ induced the decrease of insulin fibrillization extent at pH 2, while lysozyme aggregation extent did not change as compared to the control sample (Table 1). Notably, lysozyme fibrillization was not studied at pH 7.4, because this protein usually forms amorphous aggregates at neutral pH and high temperature [17]. Interestingly, lipid vesicles appeared to be the most reliable form of the potential anti-amyloid drugs, as compared to the dispersions of the oxidized phospholipids (Table 1). This finding highlights the important role of the polar surfaces of the lipids in the reduction of protein fibrillization extent. Similarly, non-ionic surfactants above the critical micelle concentration inhibited lysozyme aggregation due to the hydrophobic interactions between their hydrophobic tails and protein hydrophobic surfaces, while the surfaces of the surfactants reduced the interaction between the individual protein chains [10].

In conclusion, liposomes composed of the phosphatidylcholine and its mixtures with charged or oxidized phospholipids reduced lysozyme and/or insulin fibrillization at pH 2 and/or 7.4. The direction of the lipid effect was governed by the protein amino-acid sequence, lipid type and pH, pointing to the important role of lipid-protein hydrophobic and specific interactions in the inhibition of the fibrillization process. Furthermore, the potential of phospholipids as prospective anti-amyloid drugs could be tested *in vivo*, as well, because they are nontoxic to biological systems. This work was supported by the Ministry of Education and

Science of Ukraine (the Young Scientist project “Design of the novel methods of fluorescence diagnostics of amyloid pathologies”).

REFERENCES

1. Caughey B. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders / B. Caughey, P.T. Lansbury // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2003. – V. 26. – P. 267–298.
2. Selkoe D. J. Folding proteins in fatal ways / D.J. Selkoe // *Nature.* – 2003. – V. 426. – P. 900–904.
3. Mason J.M. Design strategies for anti-amyloid agents / J.M. Mason, N. Kokkoni, K. Stott, A.J. Doig // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2003. – V. 13. – P. 526–532.
4. Macht D.I. Experimental studies on heparin and its influence on toxicity of digitaloids, congo red, cobra venom and other drugs / D.I. Macht // *Ann. Intern. Med.* – 1943. – Vol. 18. – P. 772–791.
5. Amini R. Apigenin reduces human insulin fibrillation in vitro and protects SK-N-MC cells against insulin amyloids / R. Amini, R. Yazdanparast, S. Bahramikia // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – V. 60. – P. 334–40.
6. Small molecule inhibitors of α -synuclein filament assembly / M. Masuda, N. Suzuki, S. Taniguchi [et al.] // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45. – P. 6085–6094.
7. Cardoso I. 4-iodo-4-Deoxydoxorubicin and tetracyclines disrupt transthyretin amyloid fibrils in vitro producing noncytotoxic species: screening for TTR fibril disrupters / I. Cardoso, G. Merlini, M.J. Saraiva // *FASEB J.* – 2003. – V. 17. – P. 803–809.
8. Studies of anti-fibrillogenic activity of phthalocyanines of zirconium containing out-of-plane ligands / V. Kovalska, M. Losytskyy, V. Chernii [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2012. – V. 20. – P. 330–334.
9. Oligo(ethylene glycol) Derivatives of Thioflavin T as inhibitors of protein–amyloid interactions / P. Inbar, C.Q. Li, S.A. Takayama [et al.] // *Chem. Bio. Chem.* – 2006. – V. 7. – P. 1563–1566.
10. Kumar E.K. Differential effects of ionic and non-ionic surfactants on lysozyme fibrillation / E.K. Kumar, N.P. Prabhu // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2014. – V. 16. – P. 24076–24088.
11. Wang S.S.-S. Amyloid fibrillation and cytotoxicity of insulin are inhibited by the amphiphilic surfactants / S.S.-S. Wang, K.-N. Liu, T.-C. Han // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – V. 1802. – P. 519–530.
12. Stefani M. Protein folding and misfolding on surfaces / M. Stefani // *Int J Mol Sci.* – 2008. – V. 9. – P. 2515–2542.
13. How is protein aggregation in amyloidogenic diseases modulated by biological membranes / C. Aisenbrey, T. Borowik, R. Byström [et al.] // *Eur. Biophys. J.* – 2008. – V. 37. – P. 247–255.
14. Kinnunen P.K. Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: from biophysics to clinical correlations / P.K. Kinnunen, K. Kaarniranta, A.K. Mahalka // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1818. – P. 2446–2455.
15. Uversky V.N. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded / V.N. Uversky, A.L. Fink // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1698. – P. 131–153.
16. Fluorescence monitoring of the effect of oxidized lipids on the process of protein fibrillization / K. Vus, R. Sood, G. Gorbenko [et al.] // *Method. Appl. Fluor.* – 2016. – V. 4. – P. 034008.
17. Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants / L.A. Morozova-Roche, J. Zurdo, A. Spencer [et al.] // *J. Struct. Biol.* – 2000. – V. 130. – P. 339–351.

УДК 577.323

КОНКУРЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ХЛОРОФИЛЛИНА И ПРОФЛАВИНА С ДНК**А.А. Герус, Н.А. Гладковская, Е.Г. Березняк, Е.В. Духопельников***Институт радиопластики и электроники НАН Украины имени А.Я. Усикова, ул. Ак. Проскуры, 12, Харьков, 61085, Украина*
e-mail: nastyona.ger@gmail.com

Поступила в редакцию 15 ноября 2016 года

Принята 18 ноября 2016 года

Методом спектрофотометрии исследовано влияние хлорофиллина (Chln) на взаимодействие профлафина (Pf) с ДНК. С помощью метода выделения главных компонент проведена декомпозиция спектров систем Chln-Pf, Pf-ДНК и Chln-Pf-ДНК, полученных при различных относительных концентрациях ДНК и лигандов. Это позволило определить концентрации поглощающих частиц в растворах. По данным спектрофотометрии взаимодействие Chln с ДНК отсутствует. Константа гетероассоциации Chln с Pf, рассчитанная из изотермы Скотчарда, составляет 9×10^4 М. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в тройной системе Chln-Pf-ДНК хлорофиллин проявляет только интерцепторные свойства. Также проведены спектрофотометрические исследования двойных и тройных систем при нагревании растворов от 20 до 90 °С. Получены температурные зависимости концентраций поглощающих частиц в системе Chln-Pf-ДНК. Показано, что с ростом температуры интерцепторные свойства Chln усиливаются. Это связано с тем, что константа связывания Pf с ДНК при нагревании уменьшается, в то время как константа гетероассоциации Chln-Pf практически не зависит от температуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, хлорофиллин, профлафин, конкурентное связывание, протекторный механизм, интерцепторный механизм, спектрофотометрия.

COMPETITIVE BINDING OF CHLOROPHYLLIN AND PROFLAVINE TO DNA**A.A. Herus, N.A. Gladkovskaya, E.G. Bereznyak, E.V. Dukhopelnikov***O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of NASU, 12 Ak. Proskura Str., Kharkov, 61085, Ukraine*

The effect of chlorophyllin (Chln) on the DNA-proflavine (Pf) interactions has been investigated by spectrophotometry. The absorption spectra were recorded at different DNA-to-ligand molar ratios. Decomposition of the spectra of the Chln-Pf, Pf-DNA and Chln-Pf-DNA mixtures was performed by the principal component analysis, allowing determining the concentrations of the absorbing particles in solutions. The results indicated that chlorophyllin did not interact with DNA. The Chln-Pf heteroassociation constant ($K=9 \times 10^4$ M) was calculated using Scatchard isotherm analysis. Furthermore, Chln showed only the interceptor properties in the ternary Chln-Pf-DNA system. Next, spectrophotometric studies of binary and ternary systems were carried out under heating of the solutions from 20 to 90 °C. Temperature dependences of the particle concentrations were obtained for Chln-Pf-DNA system. It appeared that Chln interceptor properties increased with the temperature. This is due to the fact that Pf-DNA binding constant decreased under heating, while Chln-Pf heteroassociation constant did not vary significantly with the temperature.

KEY WORDS: DNA, chlorophyllin, proflavine, competitive binding, protector mechanism, interceptor mechanism, spectrophotometry.

КОНКУРЕНТНЕ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ХЛОРОФІЛІНУ ТА ПРОФЛАВІНУ З ДНК**А.А. Герус, Н.О. Гладковська, К.Г. Березняк, Є.В. Духопельников***Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я.Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, Харків, 61085, Україна*

Методом спектрофотометрії досліджено вплив хлорофіліну (Chln) на взаємодію профлавіну (Pf) з ДНК. За допомогою методу виділення головних компонент проведено декомпозицію спектрів систем Chln-Pf, Pf-ДНК та Chln-Pf-ДНК, які було отримано при різних концентраціях ДНК і лігандів. Це дозволило визначити концентрації поглинаючих частинок у розчинах. За даними спектрофотометрії взаємодія Chln з ДНК відсутня. Константа гетероасоціації Chln з Pf, що розрахована з ізотерми Скотчарда, становить 9×10^4 М. Отримані результати свідчать про те, що у потрійній системі Chln-Pf-ДНК хлорофілін виявляє тільки інтерцепторні властивості. Також було проведено спектрофотометричні дослідження подвійних і потрійних систем при нагріванні розчинів від 20 до

90 °С. Отримано температурні залежності концентрацій поглинаючих частинок у системі Chln-Pf-ДНК. Показано, що зі зростанням температури інтерцепторні властивості Chln посилюються. Це пов'язано з тим, що константа зв'язування Pf з ДНК при нагріванні зменшується, тоді як константа гетероасоціації Chln-Pf практично не залежить від температури.

КЛЮЧЕВІ СЛОВА: ДНК, хлорофілін, профлавін, конкурентне зв'язування, протекторний механізм, інтерцепторний механізм, спектрофотометрія.

Лекарственные препараты наряду с желательным фармакологическим действием могут проявлять побочные эффекты, возникающие вследствие их накопления в организме и передозировки. Также серьезную проблему для фармакологии и медицины представляют попадающие в организм из окружающей среды мутагены и высокотоксичные соединения. Перспективным способом снижения токсичности является введение в организм лигандов-конкурентов, молекулярные механизмы действия которых основаны на интерцепторных и/или протекторных свойствах. Интерцепторный механизм заключается в способности лиганда-конкурента снижать концентрацию токсичного соединения, образуя с ним стабильные гетерокомплексы. Суть протекторного механизма состоит в конкуренции двух лигандов за места посадки на молекуле-мишени, в частности ДНК, приводящей к вытеснению мутагена лигандом-конкурентом. В результате оба процесса приводят к уменьшению доли токсичного препарата, связанного с молекулой-мишенью, и, соответственно, к снижению его негативного действия.

В данной работе исследовано конкурентное действие хлорофиллина (Chln) на связывание профлафина (Pf) с ДНК.

Мутаген акридинового ряда профлафин обладает антибактериальной и противовирусной активностью, которая связана с ДНК-связывающей способностью [1, 2]. В то же время интеркаляция Pf в ДНК индуцирует мутации, приводя к ошибкам при ее рекомбинации и генетической репарации.

Хлорофиллин представляет собой нетоксичное водорастворимое производное хлорофилла, которое является объектом многочисленных исследований вследствие его антимутагенных и антиоксидантных свойств [3-5]. Показано, что Chln защищает клетки от мутагенных эффектов бензо- α -пирена [4, 6], циклофосамида [6], гетероциклических аминов [7, 8], афлатоксина [9], тяжелых металлов [10] и ионизирующего излучения [11]. Для нейтрализации действия мутагенов Chln способен проявлять разные механизмы, в том числе и реализовывать конкурентные свойства в системах Chln-мутаген-ДНК. Интерцепторный механизм конкуренции Chln обусловлен взаимодействием между его пиррольным ядром и ароматической системой молекул мутагенов [12-14]. Показано, что Chln образует стойкие гетерокомплексы с акридиновым оранжевым, ICR-191 и доксорубицином с константами ассоциации $7,0 \times 10^5$, $3,0 \times 10^5$ и $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, соответственно [15, 16]. Способность хлорофиллина связываться с ДНК и проявлять протекторные свойства является предметом дискуссий [17-19]. В работах [17, 19] была получена величина константы связывания Chln с ДНК, равная $(10^3-10^4) \text{ M}^{-1}$, при этом другие авторы [18] указывали на очень слабое взаимодействие хлорофиллина с ДНК и на невозможность определения константы взаимодействия в рамках того концентрационного диапазона, в котором проводился эксперимент по титрованию.

Целью данной работы было исследование механизмов конкурентного действия хлорофиллина в системе Chln-Pf-ДНК. Исследования двойных систем Chln-Pf, Chln-ДНК, Pf-ДНК и тройной системы Chln-Pf-ДНК проводились методом спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы коммерческая ДНК из молок лосося фирмы "Serva", а также профлавин и хлорофиллин фирмы "Sigma" без дополнительной очистки. Структурные формулы Pf и Chln приведены на рис. 1.

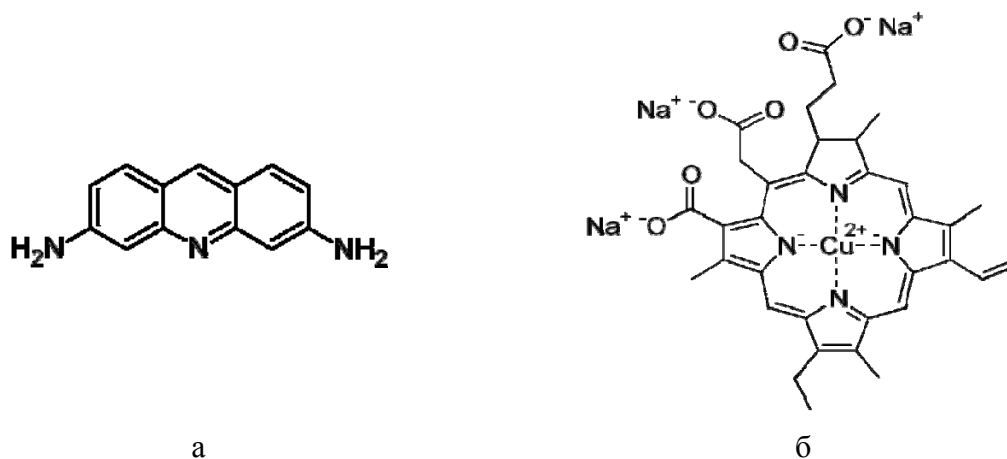


Рис. 1. Структурные формулы профлавина (а) и хлорофиллина (б).

Измерения проводились в видимой области спектра на спектрофотометре "Specord M40" (Германия) в фосфатном буферном растворе ($2,5 \times 10^{-3}$ М KH_2PO_4 , $2,5 \times 10^{-3}$ М Na_2HPO_4 , pH = 6,86) при значении ионной силы $I = 0,025$ М.

Система Chln-ДНК исследовалась методом спектрофотометрического титрования в широком диапазоне соотношения концентраций реагирующих компонентов ($C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Chln}} = 0,5 \div 70$) при постоянной концентрации лиганда.

Спектры системы Chln-Pf были получены как при постоянной концентрации Chln, так и при постоянной концентрации Pf (прямое и обратное титрование).

Температурные исследования двойных и тройных систем ДНК-лиганд(ы) проводились при следующих значениях соотношений концентраций реагирующих компонентов: $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Chln}} = 10$, $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Chln}} = 15$, $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Pf}} = 10$, $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Pf}} = 15$, $C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Pf}} = 20$. При исследовании влияния температуры на устойчивость гетерокомплексов использовались растворы с соотношениями концентраций компонентов: $C_{\text{Pf}}/C_{\text{Chln}} = 1$, $C_{\text{Pf}}/C_{\text{Chln}} = 0,75$, $C_{\text{Pf}}/C_{\text{Chln}} = 0,5$.

Спектры поглощения исследованных смесей были получены в температурном интервале 20-90 °С с использованием проточного термостатируемого 6-ти позиционного кюветодержателя. Для достижения равновесия исследуемые растворы выдерживались в каждой температурной точке в течение 10 минут. Точность измерения температур составляет 0,5 °С.

При определении концентраций ДНК и лигандов использовались следующие значения молярных коэффициентов экстинкции: для ДНК (в молях фосфатов) $\epsilon_{260} = 6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20], для профлавина $\epsilon_{445} = 4,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [21], для хлорофиллина $\epsilon_{402} = 3,34 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [18]. Точность измерения поглощения составляет 0,005 оптических единиц.

Для анализа полученных экспериментальных данных был использован метод выделения главных компонент SVD-ALS [22]. Этот метод позволяет получить базовые спектры всех поглощающих частиц в исследуемой системе и определить их относительные вклады в результирующий спектр [23]. Декомпозиция была реализована в программе "The Unscrambler".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимым условием существования протекторного механизма является способность конкурента образовывать комплексы с нуклеиновыми кислотами. Интерцепторный механизм проявляется при наличии гетероассоциации между лигандами. Преобладание того или другого механизма конкуренции в тройной системе определяется величинами констант взаимодействия лигандов с ДНК и константой гетероассоциации.

Ранее из кривых спектрофотометрического титрования нами была рассчитана константа комплексообразования Pf с ДНК ($5,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) [24]. Это значение коррелирует с данными, полученными в работе [25].

Результаты спектрофотометрических титрований в системе Chln-ДНК, проведенных в широком диапазоне соотношения концентраций реагирующих компонентов, показали, что даже при высоких относительных концентрациях хлорофиллина ($C_{\text{ДНК}}/C_{\text{Chln}} = 0,5$) добавление ДНК не приводит к изменению спектра лиганда (данные не приведены). Полученные результаты подтверждают вывод, сделанный авторами работы [18], об отсутствии взаимодействия хлорофиллина с ДНК. Таким образом, хлорофиллин не конкурирует с профлавином за места посадки на ДНК и не проявляет протекторные свойства.

Для того, чтобы оценить интерцепторные свойства Chln за счет образования гетерокомплексов с молекулами Pf, нами были проведены эксперименты по прямому и обратному титрованию в системе Chln-Pf. На рис. 2, а представлены спектры, полученные при следующих значениях концентраций реагирующих компонентов: $C_{\text{Pf}} = 2,02 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Chln}} = (0 \div 0,84) \times 10^{-5} \text{ M}$ и $C_{\text{Chln}} = 1,51 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{Pf}} = (0 \div 1,13) \times 10^{-5} \text{ M}$. Видно, что изменение соотношения концентрации лигандов приводит к существенным изменениям в спектрах. При этом результирующие спектры поглощения не являются суперпозицией спектров отдельных лигандов, взятых в соответствующих концентрациях, что свидетельствует о взаимодействии Chln с Pf.

Для определения константы гетероассоциации была проведена декомпозиция спектров системы Chln-Pf (рис. 2, б) и получены базовые спектры трех по-разному поглощающих частиц: 1 – чистый Chln ($\lambda_{\text{max}} = 402 \text{ нм}$), 2 – чистый Pf ($\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ нм}$), 3 – гетерокомплекс Chln-Pf ($\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ нм}$).

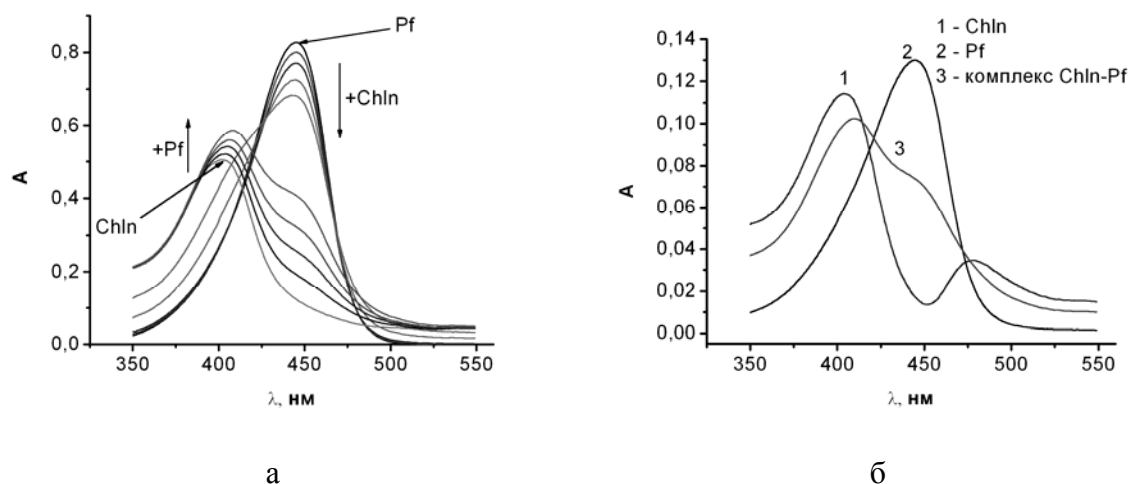


Рис. 2. Спектры поглощения системы Chln-Pf при различных соотношениях концентраций реагирующих компонентов (а). Базовые спектры поглощающих частиц в системе Chln-Pf (б).

Также были определены относительные вклады спектров этих частиц в экспериментальные спектры, что позволило построить изотерму связывания в координатах Скетчарда (рис. 3). Аппроксимация полученной зависимости проводилась по уравнению:

$$\frac{r}{C_{Pf, free}} = K_{bind} (1 - nr) \quad (1)$$

где K_{bind} – константа связывания лигандов; r – количество связанных молекул Chln на одну молекулу Pf; $C_{Pf, free}$ – равновесная концентрация свободного Pf; n – величина места связывания.

Рассчитанная величина константы связывания в системе Chln-Pf составила $\sim 9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Образование гетерокомплекса происходит со стехиометрией 1:1.

Таким образом, в системе Chln-Pf-ДНК преобладает интерцепторный механизм конкуренции, что обусловлено высоким значением константы гетероассоциации Chln-Pf и малым сродством Chln к ДНК по сравнению с таковым для Pf.

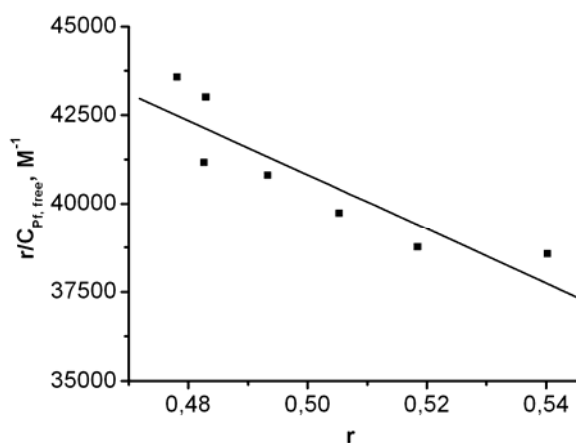


Рис. 3. Изотерма связывания хлорофиллина с профлавином в координатах Скетчарда.

Для детального исследования механизма интерцепторного действия хлорофиллина в работе было проведено спектрофотометрическое исследование влияния температуры на двойные системы Chln-ДНК, Chln-Pf, Pf-ДНК и тройную систему Chln-Pf-ДНК.

Установлено, что повышение температуры не приводит к спектральным изменениям в системе Chln-ДНК, где, как было показано выше, отсутствует взаимодействие между компонентами. При нагревании раствора Chln-Pf также не наблюдаются значимые изменения в спектрах. Это свидетельствует о том, что при повышении температуры гетерокомплекс не разрушается. Таким образом, константа связывания Chln с Pf практически не зависит от температуры, следовательно, энтальпия образования данного комплекса близка к нулю.

На рис. 4, а представлены спектры поглощения системы Pf-ДНК ($C_{ДНК}/C_{Pf} = 10$) в интервале температур 20-90 °С. Спектр поглощения системы Pf-ДНК при увеличении температуры приближается к спектру чистого Pf и при 90 °С практически с ним совпадает. Следовательно, комплекс Pf-ДНК при нагревании разрушается.

Форма спектра поглощения тройной системы Chln-Pf-ДНК существенно изменяется при нагревании. Это видно из рис. 4, б, где для примера приведены результаты температурных измерений при следующих относительных концентрациях компонентов в системе: ($C_{ДНК}/C_{Pf} = 10$, $C_{ДНК}/C_{Chln} = 15$). Наблюдаемые изменения могут быть вызваны температурным разрушением присутствующих в растворе комплексов и/или перераспределением лигандов между ними.

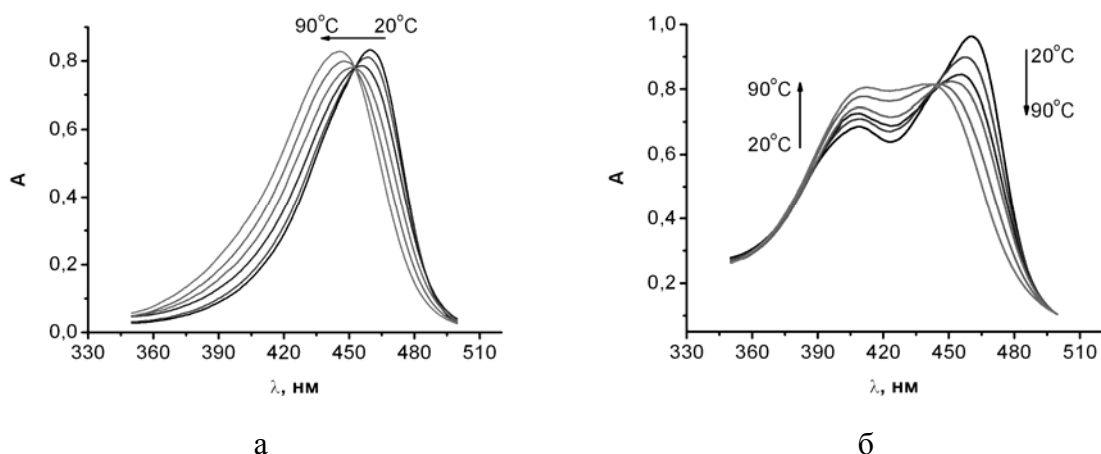


Рис. 4. Спектры поглощения систем Pf-ДНК (а) и Chln-Pf-ДНК (б), полученные в температурном интервале 20-90 °С. Измерения проводились при следующих значениях концентраций: $C_{\text{ДНК}}=2,47 \times 10^{-4}$ М, $C_{\text{Pf}}=2,43 \times 10^{-5}$ М, $C_{\text{Chln}}=1,61 \times 10^{-5}$ М.

Для систем Pf-ДНК и Chln-Pf-ДНК была проведена декомпозиция спектров, полученных при различных соотношениях концентраций реагирующих компонентов в интервале температур 20-90 °С. Использование широкого набора экспериментальных данных позволило однозначно определить базовые спектры поглощающих частиц.

В системе Pf-ДНК в исследованном температурном диапазоне присутствуют две частицы – свободный профлавин ($\lambda_{\text{max}} = 445$ нм) и комплекс Pf-ДНК ($\lambda_{\text{max}} = 465$ нм) (рис. 5, а). В системе Chln-Pf-ДНК выделены базовые спектры четырех частиц (рис. 5, б). Кривые 1, 2 и 3 практически совпадают по длинам волн с базовыми спектрами Chln, Pf и гетерокомплекса Chln-Pf, полученными при анализе результатов титрования в системе Chln-Pf (рис. 2, б). Кривая 4 имеет максимум поглощения $\lambda_{\text{max}} = 465$ нм, что соответствует базовому спектру комплекса Pf-ДНК (рис. 5, а, кривая 2).

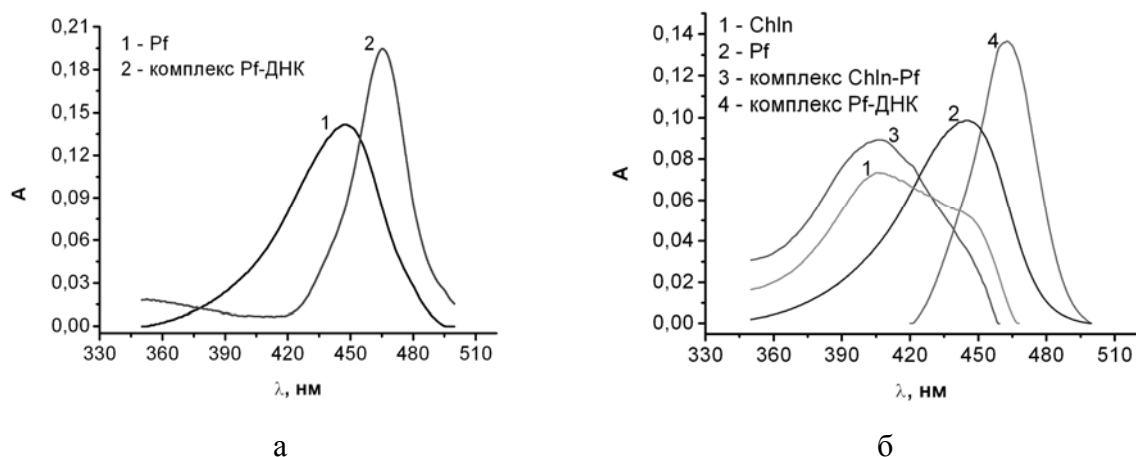


Рис. 5. Базовые спектры поглощающих частиц в системах Pf-ДНК (а) и Chln-Pf-ДНК (б).

Для того, чтобы проследить за поведением тройной системы Chln-Pf-ДНК при нагревании, были получены зависимости концентраций поглощающих частиц от температуры (рис. 6). Видно, что при комнатной температуре Pf преимущественно связывается с ДНК – концентрация комплекса Pf-ДНК практически в 5 раз выше, чем гетерокомплекса. Соотношение концентраций комплексов Pf-ДНК и Chln-Pf

коррелирует с соотношением констант их образования. Также в суммарный спектр вносит существенный вклад поглощение свободного Chln.

При нагревании разрушение комплекса Pf-ДНК сопровождается увеличением концентрации комплекса Chln-Pf. В температурном интервале до 70 °С такие процессы вызваны различиями в температурных зависимостях констант связывания – константа связывания Pf с ДНК уменьшается при нагревании, а константа гетероассоциации практически не зависит от температуры. Таким образом, при повышении температуры интерцепторные свойства Chln усиливаются.

При температурах 70-90 °С наклон кривых резко увеличивается (рис. 6). В этом температурном интервале происходит кооперативный процесс плавления ДНК, сопровождающийся разрушением комплекса Pf-ДНК и переходом связанного лиганда в свободное состояние [26]. Из рис. 6 наглядно видно, что освободившийся Pf связывается с Chln, что приводит к уменьшению концентрации свободного Chln (рис. 6, кривая 1) и увеличению концентрации гетерокомплекса (рис. 6, кривая 3). При избытке профлавина (соотношение концентраций лигандов в исследованной системе составляло $C_{Pf}/C_{Chln} = 1,5$) концентрация свободного Pf также возрастает (рис. 6, кривая 2).

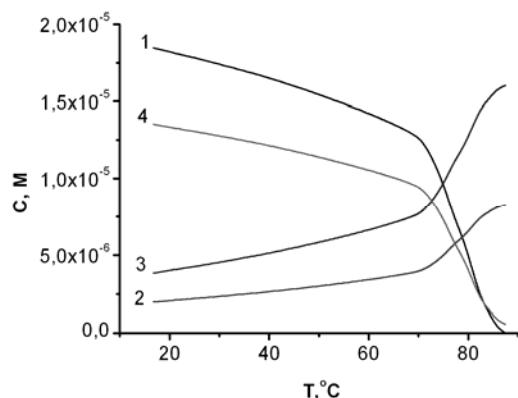


Рис. 6. Зависимости от температуры концентраций поглощающих частиц в системе Chln-Pf-ДНК: 1 - Chln, 2 - Pf, 3 - гетерокомплекс Chln-Pf, 4 - комплекс Pf-ДНК. Соотношение концентраций в системе Chln-Pf-ДНК: $C_{ДНК}/C_{Chln}=15$, $C_{ДНК}/C_{Pf}=10$.

ВЫВОДЫ

Методом спектрофотометрии исследовано влияние хлорофиллина на взаимодействие профлавина с ДНК. Показано, что Chln не взаимодействует с ДНК, а константа гетероассоциации Chln с Pf, рассчитанная из изотермы Скетчарда, составляет 9×10^4 М. Это свидетельствует о том, что основным механизмом конкурентного действия хлорофиллина в тройной системе Chln-Pf-ДНК является интерцепция. Протекторные свойства хлорофиллин практически не проявляет.

При повышении температуры наблюдается усиление интерцепторных свойств Chln, поскольку константа связывания Pf с ДНК уменьшается при нагревании, а константа гетероассоциации не зависит от температуры.

Таким образом, наши данные подтверждают перспективность использования хлорофиллина в качестве интерцептора, который способен снижать негативное действие мутагенов и токсичных веществ на ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antimicrobial activity of 9-oxo and 9-thio acridines: correlation with intercalation into DNA and effects on macromolecular biosynthesis / A. Cremieux, J. Chevalier, D. Sharples [et al.] // *Res Microbiol.* – 1995. – V. 146. – № 1. – P. 73-83.
2. Carlson C. B. Solid-phase synthesis of acridine-based threading intercalator peptides / C. B. Carlson, P. A. Beal // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2000. – V. 10, N 17. – P. 1979-1982.
3. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer / P. A. Egner, J. B. Wang, Y. R. Zhu [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – V. 98, N 25. – P. 14601-14606.

4. The importance of carcinogen dose in chemoprevention studies: quantitative interrelationships between, dibenzo[a,l]pyrene dose, chlorophyllin dose, target organ DNA adduct biomarkers and final tumor outcome / M. M. Pratt, A. P. Reddy, J. D. Hendricks [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2007. – V. 28, N 3. – P. 611-624.
5. Chlorophyllin Antimutagenesis Mechanisms under Different Treatment Conditions in the Micronucleus Assay in V79 Cells / L. G. L. Rampazo, B. Q. Jordao, V. E. P. Vicentini, M. S. Mantovani // *Cytologia*. – 2002. – V. 67, N 3. – P. 323-327.
6. Protective effect of curcumin and chlorophyllin against DNA mutation induced by cyclophosphamide or benzo[a]pyrene / M. A. Ibrahim, A. M. Elbehairy, M. A. Ghoneim, H. A. Amer // *Z Naturforsch C*. – 2007. – V. 62, N 3-4. – P. 215-222.
7. Hernaez J. Effects of tea and chlorophyllin on the mutagenicity of N-hydroxy-IQ: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation, and degradation/scavenging of the active metabolites / J. Hernaez, M. Xu, R. Dashwood // *Environ Mol Mutagen*. – 1997. – V. 30, N 4. – P. 468-474.
8. Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines / C. E. Schwab, W. W. Huber, W. Parzefall [et al.] // *Crit Rev Toxicol*. – 2000. – V. 30. - №1. – P. 1-69.
9. Egner P. A. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin / P. A. Egner, A. Munoz, T. W. Kensler // *Mutat Res*. – 2003. – V. 523-524. – P. 209-216.
10. Garcia-Rodriguez M. C. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood / M. C. Garcia-Rodriguez, V. Lopez-Santiago, M. Altamirano-Lozano // *Mutat Res*. – 2001. – V. 496, N 1-2. – P. 145-151.
11. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action / S. S. Kumar, R. C. Chaubey, T. P. Devasagayam [et al.] // *Mutat Res*. – 1999. – V. 425, N 1. – P. 71-79.
12. Adsorption of mutagens to chlorophyllin-chitosan, an insoluble form of chlorophyllin / S. Arimoto-Kobayashi, N. Harada, R. Tokunaga [et al.] // *Mutat Res*. – 1997. – V. 381, N 2. – P. 243-249.
13. Porphyrins as possible preventers of heterocyclic amine carcinogenesis / H. Hayatsu, C. Sugiyama, S. Arimoto-Kobayashi, T. Negishi // *Cancer Lett*. – 1999. – V. 143, N 2. – P. 185-187.
14. Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity / S. Arimoto, S. Fukuoka, C. Itome [et al.] // *Mutat Res*. – 1993. – V. 287, N 2. – P. 293-305.
15. Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy / M. Pietrzak, Z. Wieczorek, A. Stachelska, Z. Darzynkiewicz // *Biophys Chem*. – 2003. – V. 104, N 1. – P. 305-313.
16. Attenuation of acridine mutagen ICR-191--DNA interactions and DNA damage by the mutagen interceptor chlorophyllin / M. Pietrzak, H. D. Halicka, Z. Wieczorek [et al.] // *Biophys Chem*. – 2008. – V. 135, N 1-3. – P. 69-75.
17. Neault J. F. Structural analysis of DNA-chlorophyll complexes by Fourier transform infrared difference spectroscopy / J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi // *Biophys J*. – 1999. – V. 76, N 4. – P. 2177-2182.
18. The "interceptor" properties of chlorophyllin measured within the three-component system: intercalator-DNA-chlorophyllin / M. Pietrzak, Z. Wieczorek, J. Wieczorek, Z. Darzynkiewicz // *Biophys Chem*. – 2006. – V. 123, N 1. – P. 11-19.
19. Tajmir-Riahi H. A. DNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin as antimutagenic agents: synthesis, stability, and structural features / H. A. Tajmir-Riahi, J. F. Neault, S. Diamantoglou // *Methods Mol Biol*. – 2004. – V. 274. – P. 159-171.
20. Barcelo F. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA / F. Barcelo, D. Capo, J. Portugal // *Nucleic Acids Res*. – 2002. – V. 30, N 20. – P. 4567-4573.
21. Dourlent M. A quantitative analysis of proflavine binding to polyadenylic acid, polyuridylic acid, and transfer RNA / M. Dourlent, C. Helene // *Eur J Biochem*. – 1971. – V. 23, N 1. – P. 86-95.
22. *Multivariate Data Analysis: In Practice : an Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design* / K. H. Esbensen, D. Guyot, F. Westad, L. P. Houmoller: CAMO Software, 2002. – 598 p.
23. Traganos F. Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs in vitro: a flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novantrone, doxorubicin, ellipticine, and the doxorubicin analogue AD198 / F. Traganos, J. Kapuscinski, Z. Darzynkiewicz // *Cancer Res*. – 1991. – V. 51, N 14. – P. 3682-3689.
24. Peculiarities of DNA-proflavine binding under different concentration ratios / E. G. Bereznyak, N. A. Gladkovskaya, A. S. Khrebtova [et al.] // *Biophysics*. – 2009. – V. 54, N 5. – P. 574-580.
25. Basu A. Thermodynamic characterization of proflavine–DNA binding through microcalorimetric studies / A. Basu, G. Suresh Kumar // *The Journal of Chemical Thermodynamics*. – 2015. – V. 87. – P. 1-7.
26. Determination of ligand to DNA binding parameters from two-dimensional DSC curves / E. V. Dukhopelnikov, E. G. Bereznyak, A. S. Khrebtova [et al.] // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2013. – V. 111, N 3. – P. 1817-1827.

УДК 577.336:[547.789:543.426+615.277.3]

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВИХ ПОХІДНИХ 4-ТІАЗОЛІДИНОНІВ: СПЕКТРИ ЛЮМІНЕСЦЕНЦІЇ ТА ОЦІНКА ПОТЕНЦІЙНОЇ ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ

Л.І. Кобилінська¹, Т.С. Малий³, С.В. Апуневич³, І.Г. Маньковська³,
А.С. Волошиновський³, О.Ю. Ключівська⁴, Р.С. Стойка⁴, Р.Б. Лесик²,
Б.С. Зіменковський²

¹Кафедра біологічної хімії, ²кафедра фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії,
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69,
Львів, 79010, Україна
e-mail: lesya8@gmail.com

³Кафедра експериментальної фізики, Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Кирила і Мефодія, 8а, Львів, 79005, Україна

⁴Відділ регуляції проліферації клітин та апоптозу, Інститут біології клітини НАН України,
вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

Надійшла до редакції 31 жовтня 2016 року

Прийнята 25 листопада 2016 року

Метою роботи було вимірювання спектрів пропускання та дослідження спектрів люмінесценції і збудження люмінесценції трьох нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів (ID 3288, ID 3882, ID 3833) для характеристики їх здатності виявляти фотоіндуковану цитотоксичність щодо пухлинних клітин лінії L1210 лейкозу миші. Встановлено, що спектри збудження люмінесценції і спектри люмінесценції порошкових зразків ID 3288, ID 3882 та ID 3833 суттєво відрізняються від таких спектрів, визначених у їхніх водних розчинах. Спектр люмінесценції порошкового зразка сполуки ID 3288 має нижчу інтенсивність від спектрів сполук ID 3882 і ID 3833. Спектр люмінесценції розчину сполуки ID 3882 має найнижчу інтенсивність, а спектр люмінесценції розчину сполуки ID 3833 виявляє найвищу інтенсивність. В статті обговорені перспективи використання одержаних результатів щодо спектрів збудженої люмінесценції сполук ID 3833, ID 3882 та ID 3288 у фотодинамічній протипухлинній хіміотерапії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 4-тіазолідинони, спектри люмінесценції, збудження люмінесценції, цитотоксична дія.

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 4-ТИАЗОЛИДИНОНОВ: СПЕКТРЫ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ

Л.И. Кобылинская¹, Т.С. Малий³, С.В. Апуневич³, И. Маньковская³,
А.С. Волошиновский³, А.Ю. Ключивская⁴, Р.С. Стойка⁴, Р.Б. Лесик²,
Б.С. Зименковский²

¹Кафедра биологической химии, ²Кафедра фармацевтической, органической и биологической химии,
Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, ул. Пекарская, 69,
Львов, 79010, Украина

³Кафедра экспериментальной физики, Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Кирилла и Мефодия, 8а Львов, 79005, Украина

⁴Отдел регуляции пролиферации клеток и апоптоза, Институт биологии клетки НАН Украины, ул.
Драгоманова, 14/16, Львов, 79005, Украина

Целью работы было измерение спектров пропускания и исследование спектров люминесценции и возбуждения люминесценции трех новых противоопухолевых производных 4-тиазолидинонов (ID 3288, ID 3882, ID 3833) для характеристики их способности проявлять фотоиндуцированную цитотоксичность на опухолевые клетки линии L1210 лейкоза мыши. Установлено, что спектры возбуждения люминесценции и спектры люминесценции порошковых образцов ID 3288, ID 3882 и ID 3833 существенно отличаются от таких спектров, определяемых в водных растворах этих образцов. Спектр люминесценции порошкового образца соединения ID 3288 имеет более низкую интенсивность по сравнению со спектрами соединений ID 3882 и ID 3833. Спектр люминесценции

раствора соединения ID 3882 имеет самую низкую интенсивность, а спектр люминесценции раствора соединения ID 3833 характеризуется наивысшей интенсивностью. В статье обсуждены перспективы использования результатов, полученных при измерении спектров возбужденной люминесценции соединений ID 3833, ID 3882 и ID 3288, в фотодинамической противоопухолевой химиотерапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 4-тиазолидиноны, спектры люминесценции, возбуждения люминесценции, цитотоксическое действие.

CHARACTERIZATION OF THE NOVEL 4-THIAZOLIDINONE DERIVATIVES: LUMINESCENCE SPECTRA AND POTENTIAL ANTITUMOR ACTIVITY

L.I. Kobylinska¹, T.S. Malyi³, S.V. Apunevych³, I.G. Mankovska³,
A.S. Voloshynovsky³, O.M. Klyuchivska⁴, R.S. Stoika⁴, R.B. Lesyk²,
B.S. Zimenkovsky²

¹Department of Biochemistry, ²Department of Pharmaceutical Chemistry, Danylo Halitsky Lviv National Medical University, Pekarska str., 69, Lviv, 79010, Ukraine

³Department of Experimental Physics, Ivan Franko Lviv National University, Kyrylo and Methodiy str., 8a, Lviv, 79005, Ukraine

⁴Department of Regulation of Cell Proliferation and Apoptosis, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov str., 14/16, Lviv, 79005, Ukraine

This study was aimed at measurement of the transmission, luminescence spectra, and luminescence excitation spectra of three novel anticancer 4-thiazolidinone derivatives (ID 3288, ID 3882, ID 3833) in order to characterize the photoinduced cytotoxicity of these compounds against murine leukemia L1210 cell line. The luminescence and luminescence excitation spectra of the ID 3288, ID 3882 and ID 3833 powders differed significantly from those measured in aqueous solution. Furthermore, the luminescence of the ID 3288 powder had lower intensity as compared to that of the ID 3882 and ID 3833 powders. The luminescence of the ID 3882 aqueous solution showed the lowest intensity, while the ID 3833 demonstrated the highest intensity. The potential of application of the obtained results in the photodynamic anticancer chemotherapy has been discussed.

KEY WORDS: 4-thiazolidinone, spectrum of luminescence, luminescence excitation, cytotoxic effect.

Фотодинамічна терапія пухлин – це метод лікування онкологічних хворих, що ґрунтується на вибіркового нагромадженні фотосенсибілізатора у пухлині з наступним опроміненням її джерелом світла з довжиною хвилі, відповідної спектру поглинання цього фотосенсибілізатора [1, 2]. За присутності кисню відбувається фотохімічна реакція з генерацією активних форм кисню, які пошкоджують пухлинні клітини, викликаючи їх загибель [1-3]. Окрім прямого впливу вільнорадикальних форм кисню на пухлинні клітини під час фотодинамічної терапії, важливу роль тут відіграють такі процеси, як: деструкція ендотелію кровоносних судин в зоні опромінення, внаслідок якої має місце тромбоз судин і порушення живлення пухлини, а також цитокінова реакція, обумовлена стимуляцією продукції фактора некрозу пухлини, активацією макрофагів, лейкоцитів і лімфоцитів [2, 4, 5]. Фотосенсибілізатори, які нагромаджуються у пухлинних клітинах, не токсичні без світлової експозиції, тому, поступаючи у нормальні тканини, завдяки випромінюванню світла у певній ділянці, не спричиняють токсичного ефекту. Окрім цього, в організмі також існують природні сполуки, здатні до люмінесценції після їх опромінення хвилями певної довжини [4, 7]. Наприклад, лімфоцити чи гранулоцити здатні після активації включати тригерні механізми продукції активних форм кисню за участю хемілюмінесценції [4, 5]. Перевагами фотодинамічної терапії є локальність ураження злоякісних пухлин, відсутність токсичних реакцій в організмі, імуносупресивної дії, місцевих і системних ускладнень, а також можливість проводити лікування в амбулаторних умовах [1, 2, 8]. Фотодинамічну терапію часто поєднують з хіміотерапією, коли реалізація цитотоксичного впливу протипухлинних сполук відбувається за участю АФК, під впливом збудження люмінесценції [2, 3, 6-8]. Тому актуальною є розробка хіміопрепаратів нового покоління, які не лише вбивають пухлинні клітини, не

пошкоджуючи при цьому здорові клітини тканин і органів, але й володіють додатково певними спектральними характеристиками.

З метою скринінгу нових протипухлинних препаратів у рамках міжнародної програми Development Therapeutic Program при Національному Інституті Раку США як потенційні протипухлинні чинники нами були запропоновані нові синтетичні гетероциклічні похідні 4-тіазолідинону [9]. За вказаною програмою досліджено їх цитотоксичну дію на людські пухлинні клітини 60-ти різних ліній [10]. Показано, що поєднання тіазолідинового, піразолінового і 2-оксоіндолінового фрагментів у більш «жорстку» трициклічну систему 3-[2-(3,5-діарил-4,5-дигідропіразол-1-іл)-4-оксо-4*H*-тіазол-5-іліден]-1,3-дигідроіндол-2-он дозволяє досягнути цитостатичного ефекту в багатьох із цих ліній пухлинних клітин [11]. За результатами попередніх досліджень нами встановлено, що найбільш перспективними для подальшого використання можуть бути піразолін-тіазолідинон-індолінові кон'югати, серед них найактивнішими є сполуки, позначені як ID 3288, ID 3833 і ID 3882 [12]. Структурні формули цих потенційних протипухлинних сполук наведені на рис. 1. Разом з тим, структурно-функціональні взаємозв'язки для цих субстанцій охарактеризовані недостатньо. Відповіді на питання про такі взаємозв'язки є важливими для подальшого вдосконалення структури цих речовин з метою посилення їх потенційної протипухлинної активності.

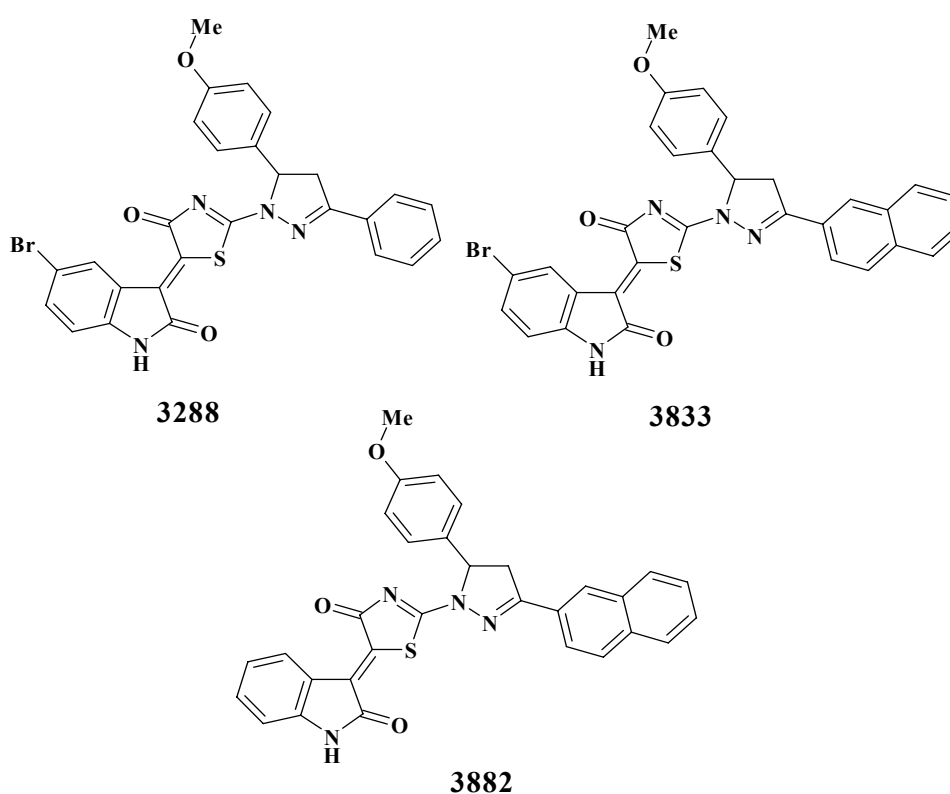


Рис. 1. Структура нових синтетичних похідних 4-тіазолідинонів – сполук ID3882, ID3288 і ID3833.

Раніше нами встановлено, що нові похідні 4-тіазолідинонів – сполуки ID 3288, ID 3882, ID 3833 – володіють різною за силою токсичною дією на пухлинні клітини тварин і людини [13]. Ми намагалися виявити можливість візуально відстежувати ці синтетичні протипухлинні сполуки за допомогою мікроскопічних методів після їх додавання до культури клітин, як це відбувається у випадку з доксорубіцином [14]. Метою даної роботи було дослідити спектри люмінесценції збудження та

люмінесценції 3-ох перспективних похідних 4-тіазолідинонів для характеристики здатності досліджуваних сполук виявляти фотоіндуковану цитотоксичність щодо пухлинних клітин. Це дозволить збуджувати їхню люмінесценцію в пухлинних клітинах за допомогою опромінення лазером з певною довжиною хвилі, щоб підвищити їхню цитотоксичну активність. Як експериментальну модель у роботі використовували клітини лінії L1210 лейкозу миші.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Синтез похідних 4-тіазолідинону. Похідні 4-тіазолідинону синтезували на кафедрі фармацевтичної, органічної та біоорганічної хімії Львівського Національного медичного університету імені Данила Галицького [9]. Хімічні назви досліджуваних похідних: ID 3288 – 5-бромо-3-{2-[5-(4-метоксифеніл)-3-феніл-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4,5-дигідро-1,3-тіазол-5-іліден}-2,3-дигідро-1*H*-індол-2-он, ID 3833 – 5-бромо-3-{2-[5-(4-метоксифеніл)-3-нафтален-2-іл-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4,5-дигідро-1,3-тіазол-5-іліден}-2,3-дигідро-1*H*-індол-2-он, ID 3882 – 3-{2-[5-(4-метоксифеніл)-3-нафтален-2-іл-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4,5-дигідро-1,3-тіазол-5-іліден}-2,3-дигідро-1*H*-індол-2-он (рис. 1). Хімічну структуру синтезованих похідних 4-тіазолідинону підтверджували за допомогою методів спектроскопії та елементарного аналізу ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ і LCMS). Синтез піразолін-тіазолідинон-ізатинових похідних проводили в одній реакційній системі відповідно до описаного протоколу [11], де вихідною речовиною слугував – 3,5-діарил-1-тіокарбамоїл-2-піразолін, який отримували у реакції:

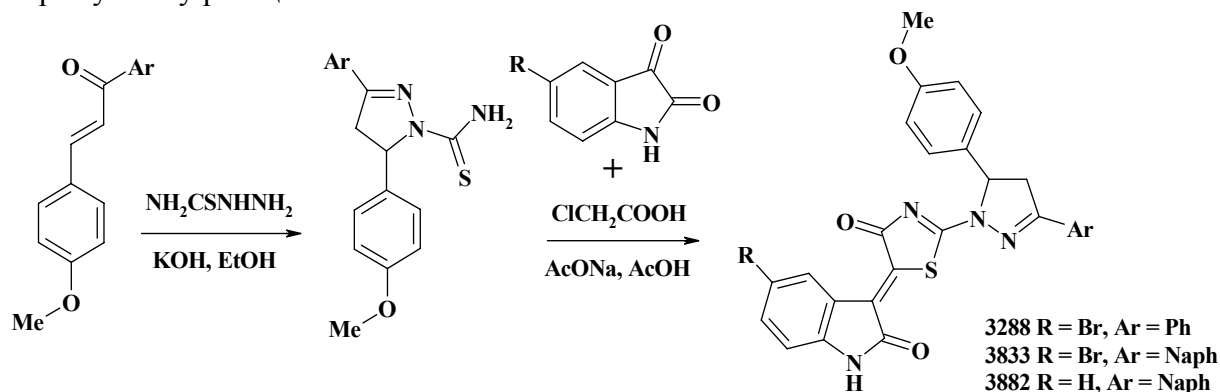


Рис.2. Схема синтезу похідних 4-тіазолідинонів - сполук ID3288, ID3833 і ID3882.

Вимірювання спектрів пропускання здійснювали на автоматизованій спектральній установці КСВУ-12. У спектральному діапазоні 200 – 800 нм застосовували дифракційні ґратки 1200 штр./мм з оберненою лінійною дисперсією в першому порядку 2,4 нм/мм. Як джерело випромінювання використовували дейтерієву лампу ДДС-30 і лампу розжарення ОП-33-0,3.

Дослідження спектрів люмінесценції і збудження люмінесценції водневою лампою. Джерелом збудження слугувала воднева лампа із неперервним спектром випромінювання в області 200-400 нм. Окремі довжини хвиль збуджуючого світла виділялися за допомогою монохроматора МДР-12. Світло зі зразка потрапляло на монохроматор МДР-12. Реєстрацію світла здійснювали зі допомогою фотопомножувача ФЭУ-100. Схема лабораторної установки для вимірювання спектрів люмінесценції та спектрів збудження люмінесценції представлена на рис. 3.

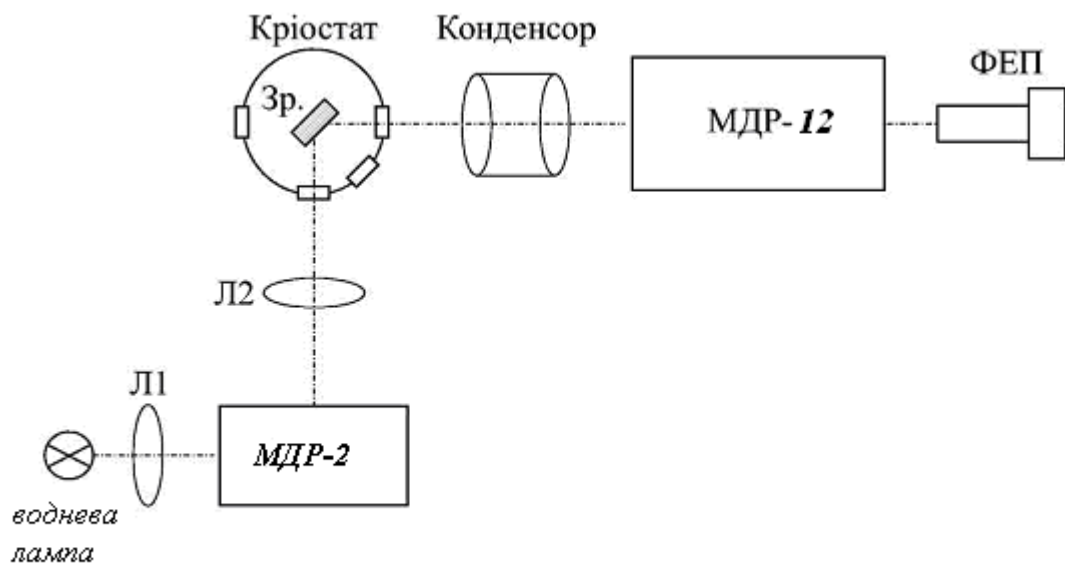


Рис.3. Схема експериментальної установки для дослідження спектрів люмінесценції та спектрів збудження люмінесценції. Скорочення розшифровані в тексті статті.

Спектри збудження люмінесценції нормувалися за умови постійного числа падаючих на кристал квантів світла по спектру. Для цього використовували коригувальний коефіцієнт, побудований за допомогою вимірювання спектру збудження фотолюмінесценції натрію саліцилату, який має постійний квантовий вихід у широкому діапазоні спектру. Охоплюваний діапазон довжин хвиль люмінесценції становив 200-750 нм.

Клітини та їх культивування. У досліджах використовували суспензійні (субстрат-незалежні) клітини лінії L1210 лейкозу миші. Клітини були одержані у рамках науково-технічної співпраці з колекції Інституту ракових досліджень Віденського медичного університету (Відень, Австрія). Клітини культивували у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM, Sigma, США) із додаванням 10 % сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби (Sigma, США). Клітини вирощували у CO₂-інкубаторі при температурі 37 °С, 5 % CO₂ і 95 % вологості. Пересів клітин проводили у співвідношенні 1:5 через 2-3 доби інкубації. Для дослідів клітини висівали в 24-лункові пластикові планшети (Greiner Bio-One, Німеччина). Цитотоксичний ефект протипухлинних препаратів на лейкозні клітини вивчали через 72 год, використовуючи тест з барвником МТТ (Sigma, США). Протипухлинні сполуки були додані в різних концентраціях відразу ж після посіву клітин без періоду адаптації. Після дії протипухлинних похідних визначали частку життєздатних клітин за допомогою аналізу з реагентом МТТ відповідно до рекомендацій його виробника (Sigma, США). Принцип визначення полягає у здатності ензимів дегідрогеназ мітохондрій живих клітин відновлювати незабарвлені форми 3-4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифенілтетразолію (реагент МТТ) до формазану пурпурного кольору. Фіолетовий продукт реакції (кристали формазану, розчинені у диметилсульфоксиді (ДМСО)), кількісно визначали у багатоканальному Мікрофотометрі BioTek 76 883 (BioTek, США) при 490 нм. Оптична густина формазанового похідного МТТ барвника прямо пропорційна до ступеня життєздатності клітин (за функціональною активністю мітохондрій). Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали загально прийнятими методами

варіаційної статистики із використанням програм ANOVA GraphPad Prism (версія 5.00) із визначенням SD та P. Статистично вірогідною вважали різницю, коли $p \leq 0,05$

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження спектрів люмінесценції збудження та люмінесценції протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів (ID 3288, ID 3882, ID 3833)

На першому етапі дослідження було визначено спектри пропускання нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинону – сполук ID 3288, ID 3882, ID 3833. Результати експерименту показали, що ці спектри зразків ID 3882 і ID3833 в діапазоні 250–400 нм подібні між собою і характеризуються двома смугами з максимумами в області 295-305 нм і 340 нм. Тоді як для зразка ID 3288 спостерігається одна смуга пропускання з максимумом при 330 нм. За результатами такого аналізу не виявлено особливостей спектральних характеристик цих сполук, які б могли вказувати на ефективність їх біологічної (цитотоксичної) дії щодо пухлинних клітин тварин і людини.

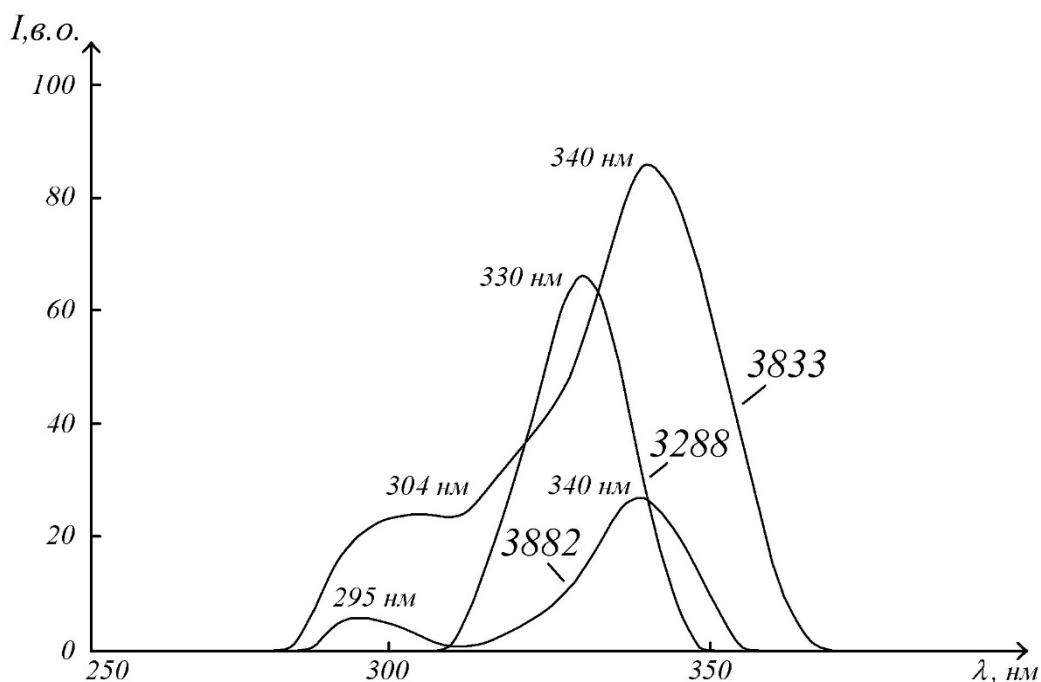


Рис. 4. Спектри пропускання водних розчинів нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону (ID 3288, ID 3882 і ID 3833).

Наступним етапом було дослідження спектрів люмінесценції і збудження люмінесценції експериментальних протипухлинних сполук ID 3288, ID 3882 і ID 3833 водневою лампою. На рис. 5-8 наведені спектри люмінесценції і збудження люмінесценції порошкових зразків (рис. 5-6) і розчинів досліджуваних сполук (рис. 7-8), відповідно. Як видно з рис. 5 і 6, збудження люмінесценції порошоків похідних ID 3288, ID 3882 і ID 3833 має місце за 2-х максимумів довжини хвилі – приблизно при 330 нм і 400 нм. Збудження люмінесценції ID 3288 при обох цих довжинах хвилі має меншу інтенсивність, а максимум довжини хвилі збудження при 330 нм зміщений на кілька нм в бік меншої довжини хвилі. Значних відмінностей за цими показниками між спектрами збудження люмінесценції ID 3882 і ID 3833 не виявлено. Що стосується спектрів люмінесценції порошкових зразків сполук ID 3288, ID 3882 та ID 3833, то найбільш відмінним є такий спектр ID 3288, а саме: значно нижча інтенсивність

люмінесценції ID 3288 при обох виявлених максимумах довжини хвилі – 372 нм і 456 нм, тоді як в ID 3882 і ID 3833 ці спектри практично співпадали. Також знайдено зміщення в більший бік максимуму довжини хвилі при 372 нм в спектрі люмінесценції порошкового зразка ID 3288.

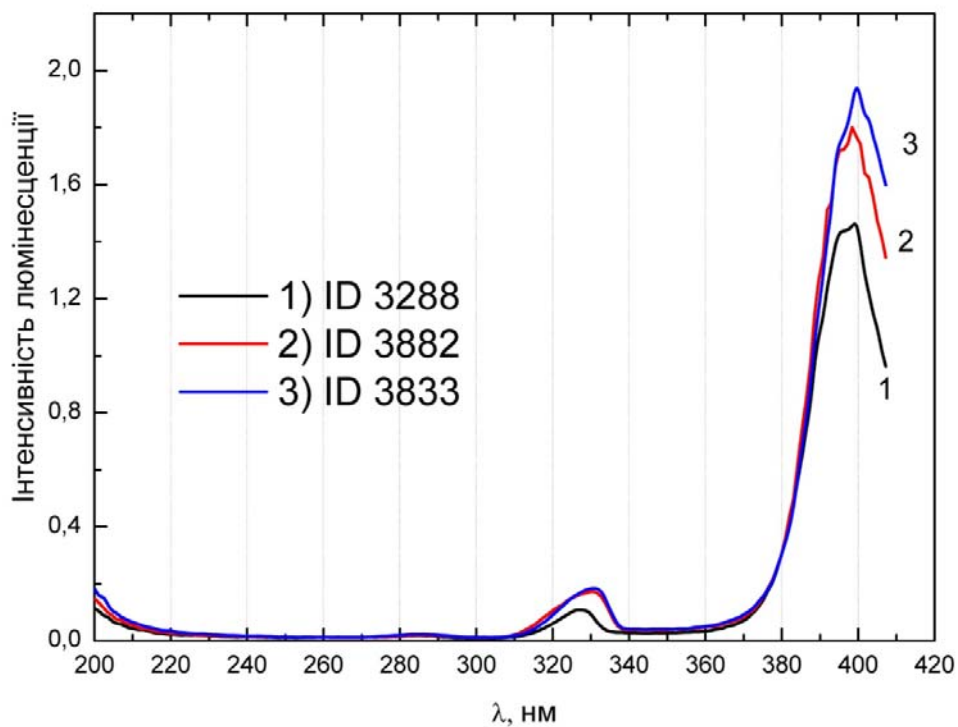


Рис. 5. Спектри збудження люмінесценції порошкових зразків ID 3288 (крива 1), ID 3882 (крива 2) та ID 3833 (крива 3) для довжини випромінювання $\lambda_{\text{люм}}=455$ нм. В спектрі можна виділити дві широкі смуги з максимумами при 330 та 400 нм.

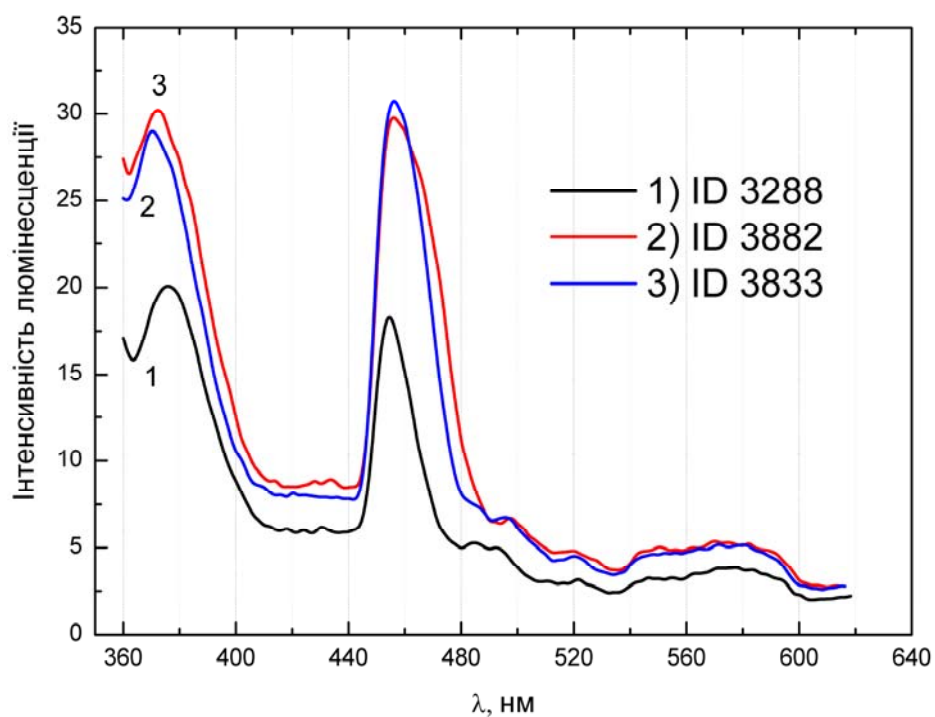


Рис. 6. Спектри люмінесценції порошкових зразків ID 3288 (крива 1), ID 3882 (крива 2) та ID 3833 (крива 3) при збудженні довжиною хвилі $\lambda_{\text{збуд}}=330$ нм ($E_{\text{збуд}}=3.75$ eV).

У наступній серії експериментів зі спектральної характеристики сполук ID 3288, ID 3882 та ID 3833 вивчали спектри збудження і люмінесценції водних розчинів цих зразків. Результати такого аналізу наведені на рис. 7 і 8, відповідно.

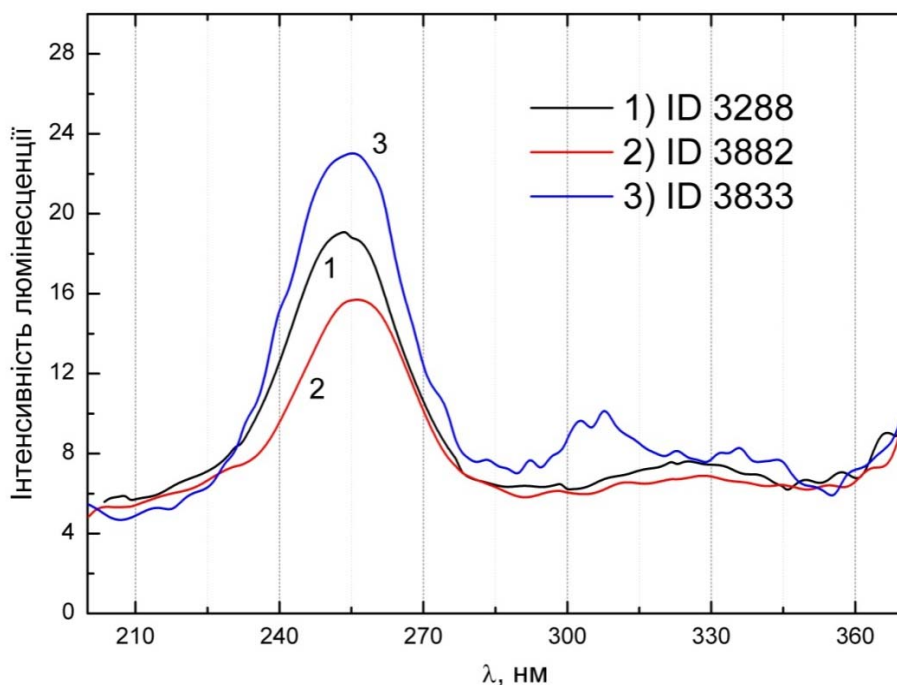


Рис. 7. Спектри збудження люмінесценції розчинів ID 3288, ID 3882 та ID 3833 під час реєстрації довжини випромінювання люмінесценції $\lambda_{\text{люм}}=390$ нм. В спектрі спостерігали широку смугу з максимумом при 260 нм.

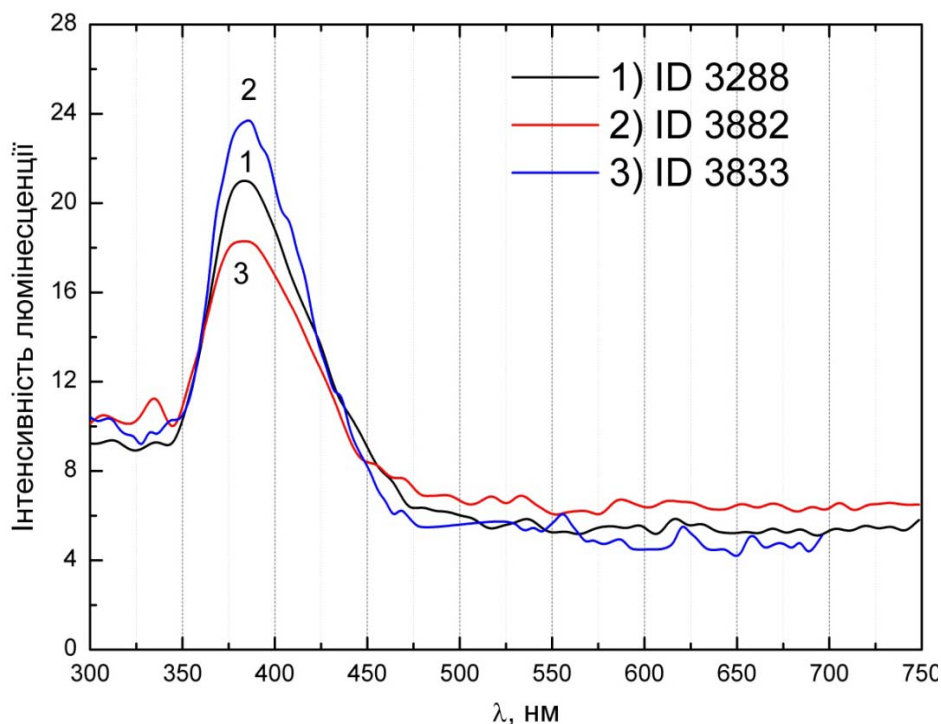


Рис. 8. Спектри люмінесценції розчинів ID 3288, ID 3882 та ID 3833 при збудженні $\lambda_{\text{збуд}}=260$ нм ($E_{\text{збуд}}=4,95$ eV). В спектрі можна широку випромінювання з максимумом при 390 нм.

У випадку дослідження люмінесценції розчинів усіх використаних зразків виявлено одну широку смугу довжини хвилі збудження з максимумом приблизно при 260 нм. Що стосується спектру люмінесценції зразків ID 3288, ID 3882 і ID 3833, то після збудження світлом із цією довжиною хвилі для всіх зразків виявлено широку смугу випромінювання з максимумом при 390 нм. Інтенсивність люмінесценції тут була найвищою у випадку використання сполуки ID 3833 і найнижчою – для сполуки ID 3882.

Підсумовуючи результати спектрального аналізу (люмінесценції) сполук ID 3288, ID 3882 та ID 3833, які є перспективними для використання як протипухлинні чинники, можна сформулювати такі висновки: 1) спектри збудження люмінесценції і спектри люмінесценції порошкових зразків ID 3288, ID 3882 та ID 3833 відрізняються від таких спектрів цих сполук у водному розчині; 2) за інтенсивністю спектр люмінесценції порошкового зразка сполуки ID 3288 відрізняється від таких спектрів сполук ID 3882 і ID 3833; 3) спектри люмінесценції розчинів сполук ID 3833 і ID 3288 за інтенсивністю відрізняються від такого спектру сполуки ID 3882. Враховуючи ці дані, можна запропонувати оптимальні режими опромінення досліджуваних сполук після їх поглинання пухлинними клітинами.

Дослідження цитотоксичної дії похідних 4-тіазолідинонів (сполуки ID 3833, ID 3288, ID 3882) щодо пухлинних клітин лінії L1210 лейкозу миші *in vitro*

Біологічну (цитотоксичну) активність сполук ID 3833, ID 3288 і ID 3882 вивчали, досліджуючи життєздатність клітин лінії L1210 лейкозу миші. Для оцінки такого впливу використовували тест із реагентом МТТ. Для цього у середовище інкубації клітин вносили досліджувані сполуки у концентраціях 0,01, 0,1 і 1 мкг/мл. Як позитивний контроль, у таких самих концентраціях використовували доксорубіцин, який вважають «золотим стандартом» у протипухлинній хіміотерапії. Загиблі клітини поглинають формазановий барвник через ушкодження їхньої плазматичної мембрани. На рис. 9 представлені результати застосування МТТ-тесту через 72 год дії сполук ID 3288, ID 3882 та ID 3833 на лейкозні клітини лінії L1210.

Згідно одержаних результатів, цитотоксична активність сполук ID 3833 та ID 3882 була високою лише у концентрації 1 мкг/мл, тоді як сполука ID 3288 за жодної концентрації не впливає на життєздатність клітин лінії L1210 лейкозу миші (рис.9). Ми не спостерігали достовірних змін у життєздатності клітин за дії досліджуваних похідних у концентрації 0,01 мкг/мл. Проте доксорубіцин і сполука ID 3833 вже у концентрації 0,1 мкг/мл достовірно пригнічували життєздатність лейкозних клітин (рис. 9).

Дослідження цитотоксичної дії похідних 4-тіазолідинону – сполук ID 3288, ID 3833 і ID 3882 – на клітини лінії L1210 лейкозу миші було скероване на те, щоб встановити, яка з цих сполук володіє найвищою токсичністю для вказаних клітин. У наступних дослідах ми плануємо підсилити дію протипухлинних похідних 4-тіазолідинону шляхом опромінення клітин, оброблених досліджуваними сполуками, лазером з певною довжиною хвилі збудження її люмінесценції (див. рис. 7 і 8). Як видно з рис. 9, сполука ID 3288 володіла найнижчою токсичною дією на лейкозні клітини, які ростуть у вигляді суспензії. Разом з тим варто відзначити, що ця ж сполука володіла найвищим цитотоксичним потенціалом за дії на злоякісні клітини С6 гліоми щура, що нормально ростуть у стані прикріплення до субстрату-підкладки [13]. Тобто ця сполука не діє на лейкозні клітини, але ефективно діє на клітини гліоми. Нами також встановлено, що після введення сполуки ID 3288 лабораторним щурам у їхній крові зростає рівень певних активних форм кисню [13]. Механізм дії похідних 4-тіазолідинонів може

полягати у запуску в клітині каскаду ензиматичних реакцій за участю низки каспаз й активних форм кисню, що призводить до руйнування ДНК, а також важливих регуляторних білків клітини і, як наслідок, до її апоптозу. Збудження люмінесценції ID 3288 та індукованої цим продукції активних форм кисню може підвищити токсичність цієї сполуки щодо лейкозних клітин тварин і людини. Дослідження з метою підтвердження цього припущення продовжуються.

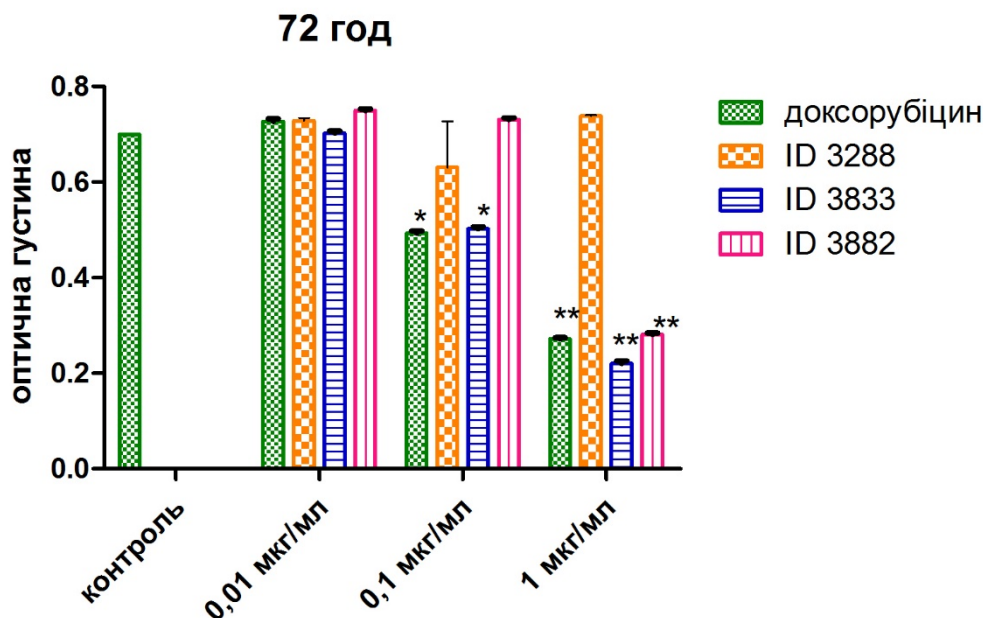


Рис. 9. Вплив досліджуваних похідних 4-тіазолідинону на клітини лінії *L1210* лейкозу миші через 72 год інкубації цих клітин. * – $P \leq 0,05$; ** – $P \leq 0,01$.

Інший напрям наших досліджень полягає у використанні «фармакофор-гібридного» підходу, а також аналізу кореляції «структура – дія» та підходів *in silico* для створення нових похідних 4-тіазолідинону та в експериментальному підтвердженні їхнього протипухлинного потенціалу. Вибір для подальшого нашого дослідження гетерил-заміщених похідних 4-тіазолідинону був зумовлений результатами їхнього тестування *in vitro* у Національному Інституті Раку (США). Аналіз взаємозв'язків між структурою і протипухлинною активністю (SAR-аналіз) показав, що введення атома галогену в 5-те положення структури індолінового фрагменту суттєво підсилює протипухлинну активність похідних 4-тіазолідинонів [10,11]. У гетероциклічних сполуках ID 3288 і ID 3833 у це положення було введено атом Брому й, окрім цього, здійснено заміну фенільного радикалу у 3-му положенні піразолінового циклу (ID 3288) на нафтильний фрагмент (ID 3833 і ID 3882). На нашу думку, ці структурні фрагменти можуть мати суттєвий вплив на показники цитотоксичної дії вищеназваних сполук. Ці дані також будуть враховані нами під час використання люмінесцентних властивостей нових похідних 4-тіазолідинону для підсилення їхнього цитотоксичного ефекту під час фотодинамічної хіміотерапії тварин із експериментальними пухлинами.

ВИСНОВКИ

Спектри збудження люмінесценції і спектри люмінесценції порошкових зразків ID 3288, ID 3882 та ID 3833 суттєво відрізняються від таких спектрів даних сполук у водних розчинах. Люмінесценція порошкового зразка сполуки ID 3288 має нижчу

інтенсивність від люмінесценції сполук ID 3882 і ID 3833. Люмінесценція розчину сполуки ID 3882 має найнижчу інтенсивність, а люмінесценція розчину сполуки ID 3833 виявляє найвищу інтенсивність. Разом з вищою інтенсивністю люмінесценції ID 3833 та ID 3882, порівняно з люмінесценцією ID 3288, спостерігається вища цитотоксична активність сполук ID 3833 та ID 3882 щодо клітин лінії L1210 лейкозу миші. Механізми дії похідних 4-тіазолідинонів для характеристики їхньої здатності виявляти фотоіндуковану цитотоксичність і шляхи її використання для фотодинамічної хіміотерапії пухлин зараз вивчаються.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Голдман М.П. Фотодинамическая терапия / Под ред. М.П. Голдмана. – М.: Рид Элсивер, 2010. – 181 с. / Goldman M.P. Fotodinamicheskaia terapija / Pod red. M.P. Goldmana. – M.: Rid Jelsiver, 2010. – 181 s.
2. Застосування фотодинамічної терапії в онкології (сучасні можливості і перспективи). / Л.І.Сімонова-Пушкар, Гертман В.З., Білогурова Л.В. та ін. // Експ. і клін. медицина. – 2014. – Т. 4, № 65. – С. 85-96. / Zastosuvannja fotodynamichnoi' terapii' v onkologii' (suchasni mozhlyvosti i perspektyvy). / L.I.Simonova-Pushkar, Gertman V.Z., Bilogurova L.V. et al. // Eksp. i klin. medycyna. – 2014. – T. 4, № 65. – S. 85-96.
3. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388. / Vladimirov Ju.A. Svobodnye radikaly i kletochnaja hemiljuminescencija / Ju.A. Vladimirov, E.V. Proskurnina // Uspehi biologicheskoi himii. – 2009. – T. 49. – S. 341-388.
4. Frederick A. Villamena Reactive Species Detection in Biology: From Fluorescence to Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy / A. Frederick. – Elsevier, 2016. – 330 p.
5. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. / Y. Yang, S. Karakhanova, J. Werner, A.V. Bazhin // Curr Med Chem. – 2013. – V. 20, N 30. – P. 3677-3692.
6. Противоопухолевая химиотерапия: Руководство / Под ред. Роланда Т. Скила; [пер.с англ. В.С. Покровского]; под ред. С.В. Орлова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 1032 с. / Protivoopuholevaja himioterapija: Rukovodstvo / Pod red. Rolanda T. Skila; [per.s angl. V.S. Pokrovskogo]; pod red. S.V. Orlova. – M.: GJeOTAR-Media, 2011. – 1032 s.
7. Микитюк О.Ю. Хемілюмінесцентний аналіз у біології та медицині / О.Ю. Микитюк // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2016. – Т. 16, Вип. 1 (53). – С. 299-303. / Mykytjuk O.Ju. Hemiljuminescentnyj analiz u biologii' ta medycyni / O.Ju. Mykytjuk // Aktual'ni problemy suchasnoi' medycyny: Visnyk Ukrai'ns'koi' medychnoi' stomatologichnoi' akademii'. – 2016. – T. 16, Vyp. 1 (53). – S. 299-303.
8. Владимиров Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал - 2001. – Т. 7, № 1. – С. 16-23. / Vladimirov Ju.A. Aktivirovannaja hemiljuminescencija i bioluminescencija kak instrument v mediko-biologicheskikh issledovanijah / Ju.A. Vladimirov // Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal. – 2001. – T. 7, N 1. – S. 16-23.
9. Патент на корисну модель №69857. 3-{2-[5-(3,5-діарил)-4,5-дигідропіразол-1-іл]-4-оксо-4Н-тіазол-5-іліден}-1,3-дигідроіндол-2-они, що виявляють протипухлинну активність / Д.Я. Гаврилюк, Б.С. Зіменковський, Р.Б. Лесик, О.М. Роман; власник ЛНМУ імені Д.Галицького. – № u201114202. – Опубл. 10.05.2012, Бюл. №19. / Patent na korysnu model' №69857. 3-{2-[5-(3,5-diaryl)-4,5-dygidropirazol-1-il]-4-okso-4H-tiazol-5-iliden}-1,3-dygidroindol-2-ony, shho vyjavljajut' protypuhlynnu aktyvnist' / D.Ja. Gavryljuk, B.S. Zimenkovs'kyj, R.B. Lesyk, O.M. Roman; vlasnyk LNMU imeni D.Galyc'kogo. – № u201114202. – Opubl. 10.05.2012, Bjul. №19.
10. Synthesis, anticancer and antiviral activity of new 2-pyrazoline substituted 4-thiazolidinones / D. Havrylyuk, B. Zimenkovsky, O. Vasylenko, R. Lesyk // J. Heterocyclic Chem. – 2013. – V.50, Iss. S1. – P. E55-E62.
11. Synthesis of New 4-Thiazolidinone-, Pyrazoline-, and Isatin-Based Conjugates with Promising Antitumor Activity. / D. Havrylyuk, B. Zimenkovsky, O. Vasylenko et al. // J. Med. Chem. – 2012. – V. 55 (20). – P. 8630-8641.
12. Дослідження біохімічних показників кардіотоксичної дії нових протипухлинних похідних 4-тіазолідинонів і доксорубіцину у комплексах із поліетилентглікольвмісним полімерним носієм у сироватці крові щурів / Л.І. Кобилінська, Д.Я. Гаврилюк, А.О. Рябцева та ін. // Укр. біохім. журн. – Т. 86, №6. – 2014. – С. 84-95. / Doslidzhennja biohimichnyh pokaznykiv kardiotoksychnoi' dii' novyh protypuhlynyh pohidnyh 4-tiazolidynoniv i doksorubicynu u kompleksah iz polietylenglikol'vmsnym polimernym nosijem u syrovatci krovi shhuriv / L.I. Kobylins'ka, D.Ja. Gavryljuk, A.O. Rjabceva ta in. // Ukr. biohim. zhurn. – T. 86, №6. – 2014. – S. 84-95.

13. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidinone derivatives: cytotoxicity towards rat C6 glioma in vitro and correlation of general toxicity with balance of free radical oxidation in rats / L. Kobylinska, N. Boiko, R. Panchuk et al. // *Croatian Med. J.* – V. 57, N 2. – 2016. – P.150-163.
14. Вплив випромінювання діодного лазера у мікроімпульсному та безперервному режимі на проліферативну активність і життєздатність клітин сполучної тканини / Л.М. Рудавська, О.Ю. Ключівська, О.І. Годована та ін. // *Експ. та клін. фізіологія і біохімія.* – 2014. – № 1. – С. 18-27. / *Vplyv vyprominjuvannja diodnogo lazera u mikroimpul'snomu ta bezperervnomu rezhymi na proliferatyvnu aktyvnist' i zhyttjezdatnist' klityn spoluchnoi' tkanyny* / L.M. Rudavs'ka, O.Ju. Kljuchivs'ka, O.I. Godovana ta in. // *Eksp. ta klin. fiziologija i biohimija.* – 2014. – № 1. – S. 18-27.

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 577.352.336 + 57.087

СПОСІБ АНАЛІЗУ КІНЕТИКИ ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ

Д.Ф. Астаповіч¹, В.П. Берест¹, Л.В. Батюк², О.А. Муравейник³¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна²Харківський національний медичний університет, пр. Науки, 4, Харків, 61022, Україна³Комунальний заклад охорони здоров'я «Харківська міська клінічна лікарня № 7», Салтівське шосе, 266, Харків, 61178, Україна

e-mail: astapovich.4225@gmail.com

Надійшла до редакції 9 листопада 2016 року

Прийнята 24 листопада 2016 року

Дослідження гемолітичної стійкості еритроцитів проводиться при різних патологічних станах, включаючи ішемії і ускладнення після інфаркту міокарда. Для опису гемолізу використовують великий набір параметрів, серед яких: тривалості етапів, швидкості стадій, відсоток гемолізованих клітин тощо. Діагностична інтерпретація таких результатів ускладнена і є малоінформативною для клініцистів. Характеристиками гемолізу часто виступають кінетичні параметри. Запропоновано спосіб аналізу кінетики гемолізу, який дозволяє отримувати додаткову інформацію про розподіл еритроцитів за стійкістю. Метод легко реалізується програмно і дозволяє отримувати статистично значущі результати, придатні для автоматизованого діагностування. Розробка була застосована для аналізу кислотних еритрограм здорових добровольців і хворих з серцево-судинною патологією. Описаний підхід до аналізу процесу гемолізу еритроцитів дозволив виявити зміни стійкості еритроцитів до кислотного гемолізу у людей з ішемічною хворобою серця і зареєструвати зміни в співвідношенні кількості еритроцитів з різною тривалістю циркуляції у кровообігу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еритроцити, кислотний гемоліз, ішемічна хвороба серця, гемолітична стійкість, диференційна еритрограма.

СПОСОБ АНАЛИЗА КИНЕТИКИ ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

Д.Ф. Астапович, В.П. Берест, Л.В. Батюк, О.А. Муравейник*Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61022, Украина**Харьковский национальный медицинский университет, пр. Науки, 4, Харьков, 61022, Украина**Коммунальное учреждение охраны здоровья «Харьковская городская клиническая больница № 7», Салтовское шоссе, 266, Харьков, 61178, Украина*

Исследование гемолитической устойчивости эритроцитов проводится при различных патологических состояниях, включая ишемии и осложнения после инфаркта миокарда. Для описания гемоллиза используют большой набор параметров, среди которых: длительности этапов, скорости стадий, процент гемоллизированных клеток и другие. Диагностическая интерпретация таких результатов затруднена и малоинформативна для клиницистов. Характеристиками гемоллиза часто выступают кинетические параметры. Предложен способ анализа кинетики гемоллиза, позволяющий получать дополнительную информацию о распределении эритроцитов по стойкости. Метод легко реализуется программно и позволяет получать статистически значимые результаты, пригодные для автоматизированного диагностирования. Разработка была применена к анализу кислотных эритрограмм здоровых добровольцев и больных с сердечно-сосудистой патологией. Описанный подход к анализу процесса гемоллиза эритроцитов позволил выявить изменения устойчивости эритроцитов к кислотному гемоллизу у людей с ишемической болезнью сердца и обнаружить изменение в соотношении количества эритроцитов с разной продолжительностью циркуляции в кровотоке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, кислотный гемоллиз, ишемическая болезнь сердца, гемолитическая стойкость, дифференциальная эритрограма.

APPROACH TO ANALYSE KINETICS OF ERYTHROCYTE HEMOLYSIS

D.F. Astapovich, V.P. Berest, L.V. Batiuk, O.A. Muraveynik*V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine**Kharkiv National Medical University, 4 Nauky Ave., Kharkiv, 61022, Ukraine**Kharkiv municipal clinical hospital № 7, 266 Saltivske highway, Kharkiv, 61178, Ukraine*

The hemolytic stability of erythrocytes is studied under various pathological conditions, including ischemia and complications after myocardial infarction. A large set of parameters are used to describe hemolysis, among which the duration of stages, the rate of stage, the percentage of hemolysed cells and others. Diagnostic interpretation of such results is difficult and is of little purpose for clinicians. The characteristics of hemolysis often are the kinetic parameters. A method for analyzing the kinetics of hemolysis is proposed, which makes it possible to obtain additional information on the distribution of erythrocytes by their hemolytic resistance. The method is easily implemented and allows obtaining statistically significant results suitable for automated diagnosis. The developed methodology was applied to the analysis of acid hemolysis of healthy volunteers and patients with cardiovascular pathology. The described approach to the analysis of the process of hemolysis of erythrocytes made it possible to reveal changes in the resistance of erythrocytes to acid-induced hemolysis in people with coronary heart disease and to detect a change in the ratio of the number of erythrocytes with different life span in the circulation.

KEY WORDS: erythrocytes, acid hemolysis, ischemic stroke, hemolytic resistance, differential erythrogram.

Автоматизація рутинних лабораторних досліджень - важливий крок на шляху впровадження комп'ютеризованої діагностики (CAD) в медичну практику. Поряд з широким використанням CAD-систем в цифровій медичній візуалізації рентгенівських, ЯМР і ультразвукових досліджень попередній аналіз і типування клінічних лабораторних діагностичних даних стає актуальним завданням, зокрема для створення лабораторій на чипі та впровадження експрес-діагностики «біля ліжка хворого» (point-of-care testing) [1, 2, 18]. Серед безлічі показників, що характеризують властивості еритроцитів, найбільш важливим є їх резистентність - стійкість до ушкоджуючої дії різних факторів, яка є інтегральним показником структурно-функціонального стану еритроцитів.

Дослідження резистентності еритроцитів до кислотного гемолізу є досить простим і поширеним в дослідницькому середовищі методом оцінки їх структурного стану, фізико-хімічних властивостей. Метод кислотних еритрограм дозволяє диференціювати еритроцити за гемолітичною стійкістю. На цей час для опису еритрограм використовують параметри, що відображають кінетику процесу або апаратні особливості реєстрації гемолізу, а не стан клітин: максимуми світлопропускання, константи швидкостей і тривалості окремих стадій процесу гемолізу [3-7, 19]. Проте, параметри резистентності еритроцитів можуть бути використані серед інших еритроцитарних показників в панелі загальноклінічних досліджень [2]. Для цього потрібен новий підхід для аналізу кінетики гемолізу, який дозволяв би інтерпретувати типові особливості протікання процесу гемолізу виходячи із властивостей еритроцитів в гематологічних термінах, які мали б діагностичну цінність для клініцистів та були б придатні для комп'ютеризованої постановки діагнозів.

Зміна мутності суспензії еритроцитів впродовж гемолізу найповніше аналізується за допомогою апаратного або програмного диференціювання часового ходу оптичної густини [6, 7, 10]. На отримуваних таким чином диференційних еритрограмах спостерігають кілька екстремумів, які відповідають різним етапам процесу зміни структурного стану та форми еритроцитів - зміні форми, набухання та власне гемолізу клітин. Статистично значуща реєстрація зміни форми та навіть набухання еритроцитів у великій мірі залежить від апаратних особливостей методики, в той же час максимуми швидкості власне лізису клітин чітко реєструються будь-якою методикою, навіть із використанням найпоширеніших в клініко-діагностичних лабораторіях широкощільових ФЕКів.

Метою роботи була розробка швидкого, автоматизованого підходу до аналізу кінетики гемолізу еритроцитів і перевірка його надійності при вивченні еритрограм хворих із серцево-судинною патологією.

Ішемічна хвороба серця (ІХС) є частою причиною смерті та інвалідності. Смертність від цього захворювання складає близько третини серед усіх випадків

загибелі в розвинених країнах. Вона набагато випереджає інші захворювання в якості причини раптової смерті. Істотну роль у формуванні судинних ускладнень при ішемії відіграють порушення функціональної активності еритроцитів, зумовлені зміною молекулярної організації клітинних мембран [5]. У пацієнтів з ІХС спостерігається підвищення кислотної резистентності еритроцитів та переважання молодих форм еритроцитів [14]. Вивчення морфофункціональних особливостей еритроцитів має важливе клінічне значення в діагностиці постішемічних ускладнень та перебігу лікування серцево-судинних патологій [8]. В роботі ми застосували розроблений нами спосіб автоматизованого визначення параметрів морфо-функціонального стану еритроцитів за кінетичними кривими гемолізу еритроцитів зразків крові хворих на ІХС з метою виявлення різниці між субпопуляціями еритроцитів у нормі та при патології.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліджувалась стійкість еритроцитів до кислотної гемолізу 2 груп людей: перша група - практично здорові добровольці (контроль), друга - хворі на ІХС у віці від 35 до 55 років. Кількість досліджених зразків крові в кожній експериментальній групі складала 16.

Суспензію еритроцитів готували з цільної венозної крові стабілізованої гепарином центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 20 хвилин, видаляли плазму і знімали лейкоцитарну плівку з поверхні осаду еритроцитів. Суспензію двічі відмитих фізіологічним розчином (0,15 М NaCl, рН=7,3) еритроцитів розводили фізіологічним розчином у об'ємному співвідношенні 1:1. В якості гемолітика використовувався розчин 1 н HCl, який додавали по 50 мкл до 450 мкл суспензії клітин. Реєстрацію еритрограм здійснювали двоканальним формомером-агрегометром ФА-01.

За кінетичними кривими зміни оптичної щільності суспензії еритроцитів будували диференціальну і інтегральну криві гемолізу [6-8, 10, 17] та визначали стандартний набір параметрів кислотної резистентності еритроцитів. Розрахунок частки еритроцитів (G , %) що розпалися за проміжок часу t , проводили за формулою:

$$G = \frac{D_i - D_{i-1}}{D_0 - D_\infty} \cdot 100\%,$$

де D - оптична щільність, D_0 і D_∞ - її початкові і кінцеві значення, i - порядковий номер вимірювання.

Звичайний аналіз кислотних еритрограм здорових добровольців і пацієнтів із діагнозом ІХС проводився за наступними показниками відповідно до робіт [8, 10, 17]: тривалість гемолізу, пік гемолізу, ширина інтервалу гемолізу домінуючої групи еритроцитів в популяції.

Для отримання більш детальної інформації щодо розподілу еритроцитів за стійкістю до гемолітичної дії HCl ту частину диференційної еритрограми, яка відповідає власно гемолізу клітин,

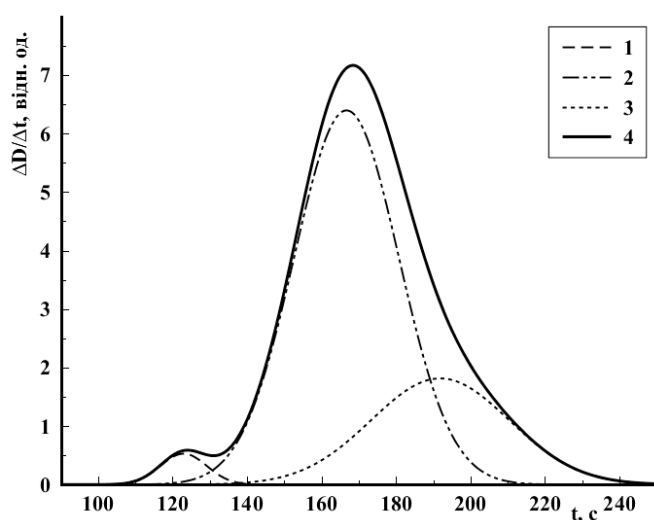


Рис. 1. Деконволюція типової диференційної еритрограми - 4:

- 1 - популяція еритроцитів низької стійкості;
- 2 - популяція еритроцитів середньої стійкості;
- 3 - популяція еритроцитів високої стійкості.

представляли у вигляді суми трьох гауссових кривих, підбираючи параметри

нормальних розподілів так, щоб збігалися площі під експериментальною та апроксимуючою кривою (рис. 1). Положення максимумів гауссових кривих використовували для визначення часу досягнення максимальної швидкості гемолізу у різних груп стійкості еритроцитів, площа під кривою дозволяла знаходити кількість еритроцитів в кожній групі стійкості. Для оцінки значущості відмінностей середніх використовували t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

При нормальному стані організму еритрограма є стабільною і відображає динамічну рівновагу в системі крові, що забезпечує відповідність між процесами кровотворення і руйнування клітин крові [9, 10].

У нормі на диференційній еритрограмі людини є один максимум [9, 11]. Збільшення напівширини еритрограми, поява асиметрії при патології може бути ознакою наявності декількох груп еритроцитів, які різко відрізняються за стійкістю внаслідок різкого порушення рівноваги в системі крові. За появою і зникненням максимумів в деяких випадках можна спостерігати зміну генерацій еритроцитів. Поява декількох максимумів може служити ознакою нерівномірності процесів кровотворення. Спостережуване розширення максимуму може відбуватися за рахунок посилення регенерації еритроцитів у тому числі при патологічному еритропоезі [12, 13].

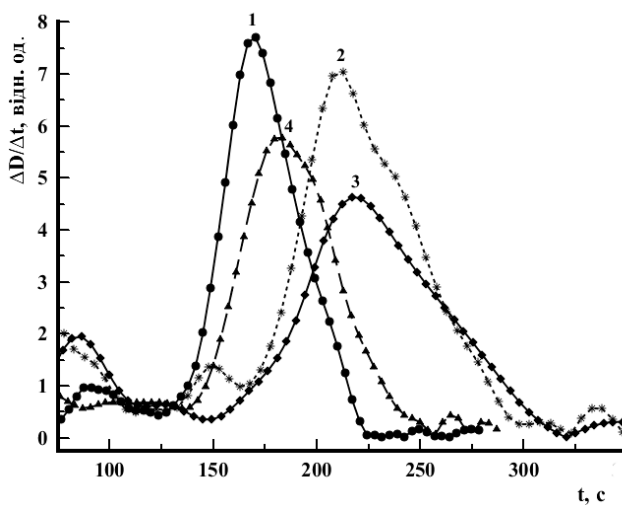


Рис. 2. Диференційна еритрограма:
1 – контрольна група;
2-4 – хворі на ІХС на різних етапах лікування.

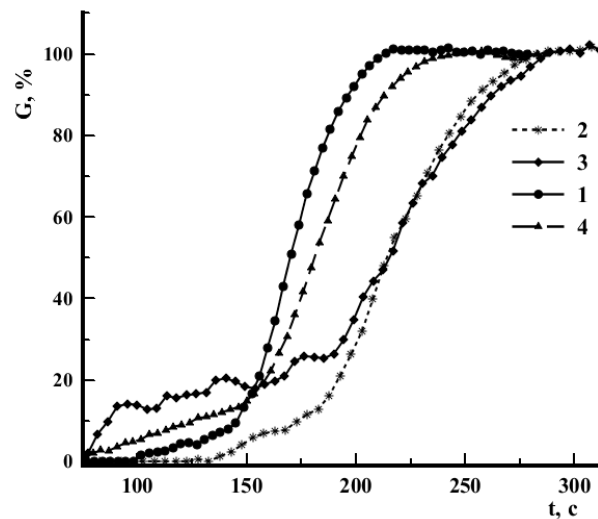


Рис. 3. Інтегральна еритрограма, залежність відсотка гемолізованих клітин від часу:
1 – контрольна група;
2-4 – хворі на ІХС на різних етапах лікування.

Для ілюстрації отриманих результатів наведемо типові еритрограми здорового й хворих пацієнтів. Як видно з рис. 2, диференційна еритрограма контрольної групи людей має один великий максимум гемолізу із плечем, якому передують локальні максимуми, що вказує на відносну однорідність еритроцитарної популяції, яка відповідає нормобластичному типу кровотворення. Також на диференційній еритрограмі відмічається асиметричність розподілу еритроцитів по стійкості та стадія зміни форми (сферуляції) клітин, яка передують гемолізу. Процес сферуляції проходить до 51 секунди, після чого починається власне гемоліз. Повний час гемолізу складає 150 с. На 123 с припадає перший локальний максимум швидкості гемолізу присутніх в пробі еритроцитів з низькою гемолітичною стійкістю. Максимальна швидкість гемолізу

припадає на 168 с, це свідчить, що в крові переважають еритроцити із середньою стійкістю. На 192 с спостерігається плече основного максимуму, яке свідчить про присутність в пробі молодих еритроцитів, що мають високу стійкість. Аналіз гауссової апроксимації диференційної еритрограми контрольної групи дозволив отримати оцінки кількості у досліджуваному зразку еритроцитів із певною кислотною стійкістю. Так, вміст підвищеностійких еритроцитів віком до 30 днів у здорових людей складає 17-23%, кількість еритроцитів із середньою стійкістю віком 30-90 днів складає 45-60% і кількість еритроцитів з низькою стійкістю віком понад 90 днів складає 18-24% (визначення віку еритроцитів було здійснено ґрунтуючись на [14, 15]). Отриманий результат збігається із висновками іншого дослідження [14], проте не відповідає даним інтегральної кривої гемолізу (рис. 3, крива 1). Ці відмінності у визначенні кількості клітин у різних групах стійкості між існуючим підходом (порівняння часу настання максимуму на диференційній кривій із відсотком гемолізованих клітин на інтегральній кривій) та запропонованим нами способом (розрахунком кількості клітин у кожній групі стійкості за площею під відповідною гауссовою складовою диференціальною еритрограми), очевидно, пов'язана із неврахуванням у запропонованому нами способі аналізу гемолізу тієї частини диференціальної еритрограми, яка передує гемолізу і відповідає стадіям зміни форми. При цьому, визначені нами занижені оцінки кількості еритроцитів із різною стійкістю (різного віку) видаються більш обґрунтованими.

При аналізі кислотної резистентності еритроцитів у хворих на ІХС (рис. 2, криві 2-4, для ілюстрації відібрано типові еритрограми трьох донорів із патологією) ми бачимо зміщення максимуму гемолізу основної групи стійкості праворуч, часто еритрограми мають локальний максимум ліворуч від основного.

На диференційних еритрограмах для всіх хворих на ІХС (n=16) також спостерігається асиметричність розподілу еритроцитів за стійкістю і плече, яке свідчить про неоднорідність популяції клітин. Середня тривалість протікання гемолізу для хворих ІХС складає 165 с. Піки гемолізу припадають на діапазон значень в часі від 192 до 226 с. Тривалість лаг-періоду та час початку гемолізу у всіх зразках еритроцитів хворих є близькими до контролю. Аналіз еритрограм із використанням автоматизованого підходу дозволив встановити, що кількість червоних клітин зі зниженою стійкістю у всіх досліджуваних зразках є меншою і складає 10-15% (табл. 1). Зміщення максимуму гемолізу праворуч свідчить про переважання стійких до гемолізу еритроцитів, віком від 30 до 90 днів, кількість таких клітин складає 60-70%. У всіх дослідних зразках кількість високостійких еритроцитів віком від 1 до 30 днів достовірно перевищувала значення контролю і складала 22-27%.

Таблиця 1

Параметри гауссової апроксимації диференційних еритрограм

	Пік	Час настання максимуму, с	Амплітуда максимуму, відн. од.	Напівширина максимуму, с	Площа під кривою, (відн. од.) ²
Контроль	1	130,4±7,5	0,53±0,12	6,0±1,3	5,6±2,6
	2	164,3±2,4	6,41±1,29	13,5±3,0	229,7±4,0
	3	183,7±8,2	1,81±1,32	23,2±1,4	85,0±0,7
Хворі на ІХС	1	159,4±10,6*	1,8±2,3	7,8±5,5	10,1±4,3
	2	197,5±12,4*	3,3±1,2	11,2±5,5	118,1±45,8*
	3	223,9±8,8*	2,9±1,4	24,4±8,4	249,7±118,8*

* відмінності від контролю статистично значущі за критерієм Стьюдента (p < 0,05)

Зареєстровані зміни складу еритроцитарної популяції хворих на ІХС, що виражаються у зміні стійкості еритроцитів до гемолізу, ми пов'язуємо зі структурною перебудовою мембрани еритроцитів при ІХС внаслідок порушення клітинного метаболізму. Інтенсивність і загальна тривалість кислотного гемолізу еритроцитів, а також співвідношення низько- і високостійких еритроцитів відрізняються від контрольної групи. Переважання в популяції еритроцитів з високою кислотною резистентністю вказує на значне її омолодження, яке, очевидно, пов'язане із загибеллю малостійких еритроцитів в зв'язку з деструктивними процесами в еритроцитарних мембранах під час розвитку хвороби.

При використанні типового підходу до аналізу даних кислотного гемолізу еритроцитів виявилось, що у випадку із ІХС статистично достовірні відмінності між контрольною групою та зразками хворих спостерігались лише для такого параметру, як розташування основного максимуму – часу настання максимальної швидкості певної стадії процесу гемолізу, але не для напівширини, швидкості певної стадії або інших часто обговорюваних параметрів гемолізу. У той же час, статистично значущі відмінності виявлено при підрахунку площин під гауссовими кривими (пропорційними відносній кількості клітин у певній групі стійкості). Цікавим є той факт, що навіть для невеликої когорти пацієнтів, відібраних для даного дослідження, вдалося отримати статистично значущі відмінності. Отже, оцінка кислотної резистентності еритроцитів хворих на ІХС за допомогою нового підходу виявила відмінності у кількості еритроцитів в субпопуляціях різних за стійкістю до гемолізу. Запропонований метод добре спрацював у передбачуваних умовах стосовно виявлення очікуваних змін. Подальше накопичення власних експериментальних даних, опрацювання бібліографічних даних із вивчення даного захворювання, а також інших, наприклад, серцево-судинних патологій, дозволить визначити критичний діапазон значень таких параметрів як час настання максимуму та площа під відповідною нормальною кривою для автоматичного віднесення їх до норми чи певного захворювання.

Проаналізуємо результати розподілу еритроцитів хворих на ІХС за стійкістю до кислотного гемолізу. Кислотна резистентність еритроцитів дозволяє судити, перш за все, про стан фосфоліпідного бішару й білків мембран еритроцитів. При кислотному гемолізі власне лізису клітин передує взаємодія гемолітика із мембраною та його транспорт в клітину [14], що може ушкоджувати мембрану чи вести до формування пор в ліпідному бішарі. Літературні дані свідчать, що активація вільнорадикальних процесів при ІХС веде до розвитку оксидативного стресу, який є одним з універсальних механізмів ушкодження клітин [13]. У еритроцитах хворих на ІХС відзначають збільшення вмісту холестерину в мембрані, збільшення мікров'язкості мембрани, зміну її фосфоліпідного та жирно-кислотного складу, активацію перекисного окислення ліпідів, зміну антиоксидантного потенціалу, а також порушення функціонування Na^+/K^+ - й Ca^{2+} -АТФаз [16].

Дослідження кислотної резистентності еритроцитів хворих на ІХС показало, що час настання максимальної швидкості гемолізу основної групи стійкості еритроцитів був більшим, порівняно із нормою, а значить, еритроцити хворих виявились більш резистентними до дії кислоти, ніж клітини здорових донорів. Можливо, це пов'язано із підвищеним вмістом холестерину в мембрані еритроцитів при ІХС, що зменшує проникність мембрани еритроцитів і підвищує її жорсткість, перешкоджаючи деструкції клітини під впливом низького рН. У той же час, збільшення субпопуляції молодих (із напевно малим вмістом холестерину в мембрані) підвищеностійких до гемолізу еритроцитів у зразках крові пацієнтів із ІХС, може свідчити про існування ще

одного компенсаторного механізму – на рівні системи кровотворення – для забезпечення потрібної кількості еритроцитів із «нежорсткими», добре проникними для кисню та нутрієнтів мембранами для протистояння ішемії.

Визначення таких показників гемолізу як кількість та вік еритроцитів у різних субпопуляціях за кислотною стійкістю може виступати в якості прогнозу ступеня ушкодження клітин крові при ІХС, передбачати імовірність ускладнень та визначати групи ризику пацієнтів із вичерпаними резервами адаптації та корегувати антиатерогенну терапію.

ВИСНОВКИ

Розроблено новий підхід до аналізу кінетики кислотного гемолізу еритроцитів на основі апроксимації диференційних еритрограм із автоматизованою оптимізацією єдиного параметру – площі під кривою.

Виявлено зміни в розподілі за стійкістю еритроцитів у хворих на ішемічну хворобу серця – підвищення вмісту клітин з високою кислотною резистентністю, що свідчить про переважання молодих еритроцитів в кровотоці.

Запропонований підхід характеризується високою точністю результатів, що дозволяє отримувати стистично достовірні дані, завдяки чому його можна адаптувати для експрес-діагностики в клінічних умовах.

Перспективою дослідження є подальше накопичення експериментальних даних, визначення критичного рівня значень таких параметрів диференційних еритрограм як час настання основного максимуму та площа під відповідною нормальною кривою для автоматичного діагностування норми чи певної патології; встановлення кореляції між пропонованими нами параметрами та показниками стандартної панелі клінічних лабораторних аналізів для з'ясування молекулярних механізмів деструктивних процесів еритроцитарних мембран у кардіологічних хворих.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mahapatra D. Recent advances in statistical data and signal analysis: Application to real world diagnostics from medical and biological signals / D. Mahapatra, K. Agarwal, R. Khosrowabadi, D.K. Prasad // *Comput. Math. Methods Med.* – 2016. – V. 2016. – Article ID 1643687.
2. Review of point-of-care testing and biomarkers of cardiovascular diseases in emergency and prehospital medicine / P.G. Claret, X. Bobbia, C. Roger [et al.] // *Acta Cardiol.* – 2015. – V. 70 (5). – P. 510-515.
3. Kinetics of hemolysis of normal and abnormal red blood cells in glycerol-containing media. / A. Sauer, T. Kurzion, D. Meyerstein, N. Meyerstein. // *Biochim Biophys Acta.* – 1991. – V. 1063 (2). – P. 203-211.
4. Chmura A. The kinetics of hemolysis as an indicator of spherocytosis. / A. Chmura, G. Paździor, M. Langner // *Cell Mol Biol Lett.* – 2002. – V. 7 (2). – P. 280.
5. Поиск взаимосвязей между параметрами кинетики кислотного гемолиза эритроцитов и функциональным состоянием организма / И.Л.Голенда [и др.] // *Физиология человека.* – 1996. – Вып. 4 (22). – С. 130-136. / *Poisk vzaimosvjazej mezhdu parametrami kinetiki kislotnogo gemoliza jeritrocitov i funkcional'nym sostojaniem organizma* / I.L.Golenda [i dr.] // *Fiziologija cheloveka.* – 1996. – V. 4 (22). – S. 130-136.
6. Иванов И.Т. Кинетика кислотного гемолиза в изотонической среде сахарозы. / И.Т. Иванов, Ю.Д. Данаилова. // *Биофизика.* – 1991. – V 36 (5). – С. 845-849. / *Ivanov I.T. Kinetika kislotnogo gemoliza v izotonicheskoj srede saharozy.* / I.T. Ivanov, Ju.D. Danailova. // *Biofizika.* – 1991. – V. 36 (5). – S. 845-849.
7. Заводник И.Б. Кислотный лизис эритроцитов человека. / И.Б. Заводник, Т.П. Пилецкая // *Биофизика.* – 1997. – Вып. 5 (42). – С. 1106-1112. / *Zavodnik I.B. Kislotnyj lizis jeritrocitov cheloveka.* / I.B. Zavodnik, T.P. Pileckaja // *Biofizika.* – 1997. – V. 5 (42). – S. 1106-1112.
8. Резистентность к кислотному гемолизу эритроцитов кролей при экспериментальном сахарном диабете и применении сахароснижающих средств / Т.А. Шаталова [и др.] // *Біофізичний вісник.* – 2013. – Вып. 2 (30). – С. 35-41. / *Pezistentnost' k kislotnomu gemolizu jeritrocitov krolej pri*

- jeksperimental'nom saharom diabete i primenenii saharosnizhajushhих sredstv / Т.А. Shatalova [i dr.] // Biofizicnij visnik. – 2013. – V. 2 (30). – S. 35-41.
9. Иванов И.Т. Сравнение механизмов кислотного и щелочного гемолиза эритроцитов человека / И. Т. Иванов // Биофизика. – 2001. – Вып. 2 (46). – С. 281–290. / Ivanov I.T. Sravnenie mehanizmov kislotnogo i shhelochnogo gemoliza jeritrocitov cheloveka / I. T. Ivanov // Biofizika. – 2001. – V. 2 (46). – S. 281–290.
 10. Терсков И.А. Метод химических (кислотных) эритрограмм / И.А. Терсков, И.И. Гительзон // Биофизика. – 1957. – Вып. 2 (2). – С. 259–266. / Terskov I.A. Metod himicheskikh (kislotnyh) jeritrogramm / I.A. Terskov, I.I. Gitel'zon // Biofizika. – 1957. – V. 2 (2). – S. 259–266.
 11. Гительзон И.И. Состав красной крови в норме и патологии / И.И. Гительзон. – Томск, 1960. – С. 187. / Gitel'zon I.I. Sostav krasnoj krovi v norme i patologii / I.I. Gitel'zon. – Tomsk, 1960. – S. 187.
 12. Вочегорский И.А. Антиоксиданты при экспериментальном сахарном диабете / И.А. Вочегорский, Л.М. Рассохина, И.Ю. Мирошниченко // Пробл. эндокринологии. – 2008. – Вып. 54 (5). – С. 43–49. / Vohegorskij I.A. Antioksidanty pri jeksperimental'nom saharom diabete / I.A. Vohegorskij, L.M. Rassohina, I.Ju. Miroshnichenko // Probl. jendokrinologii. – 2008. – V. 54 (5). – S. 43–49.
 13. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета и применение витаминов и микроэлементов для их лечения и профилактики / М.И. Балаболкин // Клиническая эндокринология. – 2006. – Вып. 6. – С. 1–7. / Balabolkin M.I. Rol' okislitel'nogo stressa v patogeneze sosudistyh oslozhnenij saharного diabeta i primenenie vitaminov i mikrojelementov dlja ih lechenija i profilaktiki / M.I. Balabolkin // Klinicheskaja jendokrinologija. – 2006. – V. 6. – S. 1–7.
 14. Китаева В.О. Определение кислотной резистентности эритроцитов и уровня гормона стресс-реакции эстрадиола у больных ишемической болезнью сердца. / В.О. Китаева, Ф.А. Гершкорон // Научный медицинский вестник ЮГРЫ. – 2014. – Вып. 1-2 (5-6). – С. 79–81. / Kitaeva V.O. Opredelenie kislotnoj rezistentnosti jeritrocitov i urovnja gormona stress-reakcii jestradiola u bol'nyh ishemicheskoy bolezniju serdca. / V.O. Kitaeva, F.A. Gershkoron // Nauchnyj medicinskij vestnik JuGRY. – 2014. – V. 1-2 (5-6). – S. 79–81.
 15. Галенок В.А. Гемореология при нарушениях углеводного обмена / В.А. Галенок, Е.В. Гостинская, В.Е. Диккер. – Новосибирск, 1987. – С. 86. / Galenok V.A. Gemoreologija pri narushenijah uglevodного обмена / V.A. Galenok, E.V. Gostinskaja, V.E. Dikker. – Novosibirsk, 1987. – S. 86.
 16. Мальцева И.В. Характеристика резистентности эритроцитов у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза / И.В. Мальцева // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12, Вып. 1. – С. 69–74. / Mal'ceva I.V. Harakteristika rezistentnosti jeritrocitov u kardiohirurgicheskikh bol'nyh s razlichnoj stepen'ju vyrashennosti postperfuzionного gemoliza / I.V. Mal'ceva // Bjulleten' sibirskoj mediciny. – 2013. – T. 12, V. 1. – S. 69–74.
 17. Руководство по гематологии: в 3 т. / Под ред. А.И. Воробьева: 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Ньюдиамед, 2005. - 416 с. / Rukovodstvo po gematologii: v 3 t. / Pod red. A.I. Vorob'eva: 3-e izd., pererab. i dop. - M.: N'judiamed, 2005. - 416 s.
 18. Castellino R.A. Computer aided detection (CAD): an overview / R.A. Castellino // Cancer Imaging. – 2005. - V 5 (1). – P. 17–19.
 19. Pokrajac L. Oligomerization and hemolytic properties of the C-terminal domain of pyolysin, a cholesterol-dependent cytolysin / L. Pokrajac. J.R. Harris, N. Sarraf, M. Palmer // Biochem. Cell Biol. – 2013. – V. 91, N. 2. – P. 59-66.

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 36(2)

Збірник наукових праць

Укр., рос. та англ. мовами.

Комп'ютерне верстання Горобченко О.О.

Підписано до друку 28.11.2016. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 5,90. Обл.-вид. арк. 6,86. Наклад 100 пр.

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

Надруковано: ХНУ імені В.Н. Каразіна
61022, Харків, майдан Свободи, 4, тел. 705-24-32
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.09

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.