

УДК 547.787.2 + 535.33/34

## **2-ФЕНИЛ[9,10]ФЕНАНТРОКСАЗОЛ И 2-(2'-ОН-ФЕНИЛ)-5-ФЕНИЛ-1,3,4-ОКСАДИАЗОЛ В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ В МЕМБРАНАХ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

**Е. А. Посохов**

Произведён поиск флуоресцентных зондов для детекции патологических изменений в мембранах тромбоцитов при атеросклерозе. Установлено, что флуоресцентные зонды, применяющиеся для детекции изменения содержания холестерина в липопротеинах (1,4-ANS, DPH, DMHL), не позволяют выявить патологических изменений в мембранах тромбоцитов при атеросклерозе. Показано, что флуоресцентные характеристики 2-фенил[9,10]фенантроксазола и 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазола являются чувствительными к изменениям в мембранах тромбоцитов при атеросклерозе.

**Ключевые слова:** флуоресцентные зонды, биомембраны, атеросклероз, тромбоцит.

Атеросклероз - хроническое заболевание артерий эластического и мышечно-эластического типа, возникающее вследствие нарушения липидного обмена и сопровождающееся отложением холестерина и некоторых фракций липопротеидов в интима сосудов. Отложения формируются в виде атероматозных бляшек. Последующее разрастание в них соединительной ткани (склероз) и кальциноз стенки сосуда приводят к деформации и сужению просвета вплоть до облитерации (закупорки) [1].

Визуализация патологических изменений в течение атеросклероза является одной из важных целей для улучшения диагностики этого заболевания [2-9].

Одним из способов визуализации патологических изменений, вызванных атеросклерозом, является применение флуоресцентных методов [10-12]. Флуоресцентные методы используются для диагностики атеросклероза, тромбоза и других заболеваний сосудов [10-12]. Для выявления атеросклероза при помощи флуоресценции чаще всего исследуют атеросклеротические бляшки, макрофаги, протеазы, липопротеины [13].

Поиск новых биологических объектов для спектроскопической визуализации патологических изменений в течение атеросклероза является важным для дальнейшего изучения и для улучшения диагностики этого заболевания [13].

В данной работе в качестве биологического объекта для спектроскопической визуализации патологических изменений, вызванных атеросклерозом, использовались мембраны тромбоцитов. Как известно, тромбоциты принимают участие в процессе отвердевания артерий (атеросклероз) [14]. Тромбоциты транспортируют свободный холестерол к моноцитам, которые играют ведущую роль в образовании пенистой клетки (т.е. когда моноциты превращаются в макрофаги) [15] и, таким образом, участвуют в образовании атеросклеротических бляшек. Также известно, что соотношение холестерол/фосфолипиды в мембранах тромбоцитов возрастает у больных с сосудистыми нарушениями атеросклеротического генеза [16].

Поскольку в литературе отсутствует информация об использовании флуоресцентных зондов для детекции патологических изменений в тромбоцитах в течение развития атеросклероза, было решено произвести экспериментальный поиск таких флуоресцентных зондов.

### **Экспериментальная часть**

Синтез и очистка 2-фенил[9,10]фенантроксазола и 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазола были описаны в [17,18]. 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (DPH) и 1-анилино-8-нафталинсульфоновая кислота (1,4-ANS) были приобретены в фирме Invitrogen (Carlsbad, CA). 4-диметиламинохалкон (DMHL) синтезирован и очищен как описано в [19].

Образцы тромбоцитов получали из крови 8 здоровых добровольцев (5 мужчин, 3 женщины) без сердечно-сосудистой патологии - группа I (т.е. контрольная группа) и от 16 пациентов (7 мужчин, 9 женщин) с симптомами церебрального атеросклероза - группа II. У больных церебральным атеросклерозом при исследовании холестерола и липопротеидов отмечались стабиль-

но повышенные показатели: уровень холестерина - выше 5,2 ммоль/л, уровень ЛПНП – более 4,0 ммоль/л. Возраст больных: 60-74 года. Возраст здоровых людей - 18-35 лет.

Тромбоциты получали из цитратной плазмы (1:9) центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут с последующей отмывкой физиологическим раствором и повторным центрифугированием в тех же условиях и диспергированием в 0,15 М фосфатном буфере (рН 7) до конечной концентрации взвеси тромбоцитов, имеющей поглощение на длине волны 405 нм, равное 0,25 единиц оптической плотности.

Вследствие низкой растворимости зондов в воде использовались 0,2 мМ растворы зондов в ацетонитриле. 10 мкл ацетонитрильного раствора флуоресцентного зонда добавляли к 2 мл суспензии тромбоцитов (т.е. конечная концентрация ацетонитрила  $\leq 0,5$  об.%) до конечной концентрации зондов  $10^{-6}$  моль/л, таким образом, молярное отношение липид/зонд составляло 1000:1. Измерение спектров флуоресценции производилось через 1 час после прибавления зондов к суспензиям тромбоцитов.

Флуоресцентные спектры регистрировались на спектрофлуориметре Hitachi F4010 (Япония) при комнатной температуре. Спектры флуоресценции зондов измеряли в области 340-600 нм при ширине щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции 5 и 5 нм соответственно, и длине волны возбуждения 330 нм. Флуоресцентные измерения проводились в 10 мм×10 мм кювете.

### Обсуждение результатов

Как было установлено ранее, при атеросклерозе содержание холестерина в мембранах тромбоцитов возрастает [15,16]. Известно, что увеличение содержания холестерина в липидных мембранах приводит к изменениям в гидратации, полярности и вязкости мембран [20]. С увеличением содержания холестерина упорядоченность мембранных липидов возрастает (т.е. уменьшается мембранная текучесть). Такое возрастание упорядоченности затрудняет вращательные движения молекул фосфолипидов. Поэтому микровязкость, как мера фрикционного сопротивления к вращательным и поступательным движениям молекул, возрастает. Также холестерол способствует дегидратации липидного бислоя [21,22] и, вследствие возрастания микровязкости, замедляет динамику релаксации воды в липидном бислое. Уменьшение гидратации липидного бислоя и снижение скорости релаксации растворителя, в свою очередь, приводит к снижению полярности бислоя [23].

Принимая во внимание эффект увеличения содержания холестерина в липидных мембранах, для детекции патологических изменений в тромбоцитах при атеросклерозе были отобраны флуоресцентные зонды, чувствительные к изменениям гидратации, полярности и вязкости их окружения.

На первом этапе исследования были использованы флуоресцентные зонды, применяемые для мониторинга содержания холестерина в липопротеинах [11,12]: 1-анилино-4-нафталинсульфоновая кислота (1,4-ANS), 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (DPH) и 4-диметиламинохалкон (DMHL). Флуоресцентные характеристики 1,4-ANS зависят от физико-химических свойств его окружения: полярности, вязкости, способности к образованию водородных связей. Флуоресцентные характеристики DMHL чувствительны к изменениям гидратации и вязкости его окружения. Флуоресцентные характеристики DPH чувствительны к изменениям вязкости его окружения. 1,4-ANS и DMHL локализируются в полярной области липидной мембраны, DPH локализуется в гидрофобных областях липидной мембраны [11,12].

Однако, было установлено, что за 1 час инкубации с мембранами тромбоцитов DPH и DMHL практически не встраиваются в мембраны: возрастание интенсивности флуоресценции этих зондов после инкубации с тромбоцитами оказалось незначительным (Таблица 1). Такая низкая скорость встраивания DPH и DMHL в мембраны тромбоцитов не позволяет использовать эти зонды в медико-биологических исследованиях тромбоцитов. Следует отметить, что в литературе [11] имеются сведения и о других случаях низкой скорости встраивания в мембраны зонда DPH.

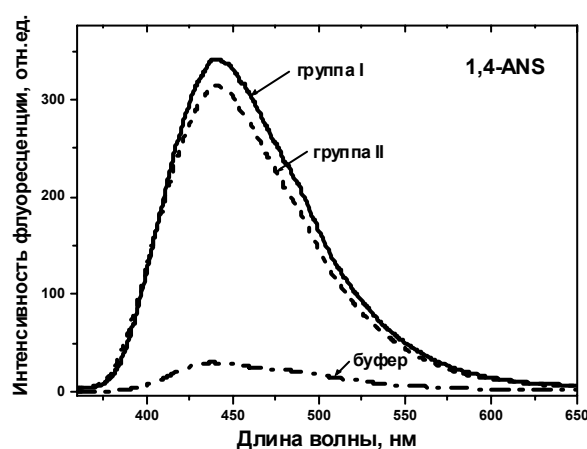
1,4-ANS успешно встраивается в мембраны тромбоцитов за 1 час инкубации, но этот зонд не показывает большого различия между тромбоцитами контрольной группы (группа I) и тромбоцитами пациентов с церебральным атеросклерозом (группа II) (Рисунок 1, Таблица 1): умень-

шение интенсивности флуоресценции в максимуме флуоресценции ( $\lambda=440$  нм) для зонда 1,4-ANS, связанного с тромбоцитами пациентов, составляет менее 10% по сравнению с соответствующим значением интенсивности флуоресценции для контрольной группы.

**Таблица 1.** Флуоресцентные характеристики зондов 1,4-ANS, DPH и DMHL после 1 часа инкубации с мембранами тромбоцитов.

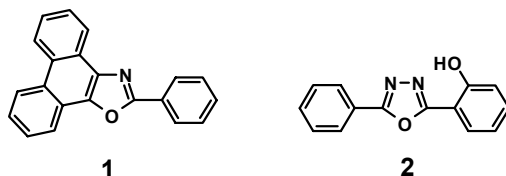
| Образец                               | Интенсивность флуоресценции, отн.ед.        |   |   |
|---------------------------------------|---|---|---|
|                                       | 1,4-ANS                                     | DPH   | DMHL  |
|                                       | $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 440$ нм | $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 440$ нм | $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 585$ нм |
| Буфер                                 | 27.4  | 6.2   | 6.4   |
| Группа I (контроль)                   | 340.7                                       | 7.1   | 13.4  |
| Группа II (церебральный атеросклероз) | 312.8                                       | 15.3  | 10.2  |

Здесь  $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$  – максимум в спектре флуоресценции. Относительная погрешность значений интенсивности флуоресценции составляет менее 10%.



**Рис. 1.** Флуоресцентные спектры зонда 1,4-ANS, связанного с тромбоцитами контрольной группы (сплошная линия), с тромбоцитами больных церебральным атеросклерозом (пунктирная линия), и для зонда в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (линия «точка-тире»). 1,4-ANS связывается с мембранами тромбоцитов за 1 час инкубации, но уменьшение интенсивности флуоресценции в максимуме флуоресценции ( $\lambda=440$  нм) для зонда, связанного с тромбоцитами больных церебральным атеросклерозом (группа II), составляет менее 10% по сравнению с соответствующим значением интенсивности флуоресценции для контрольной группы (группа I).

На следующем этапе поиска флуоресцентных зондов для детекции патологических изменений в мембранах тромбоцитов при атеросклерозе было решено использовать 2-Фенил[9,10]фенантроксазол (1) и 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазол (2) (Схема 1), флуоресцентные характеристики которых чувствительны к присутствию холестерина в модельных липидных везикулах [24].

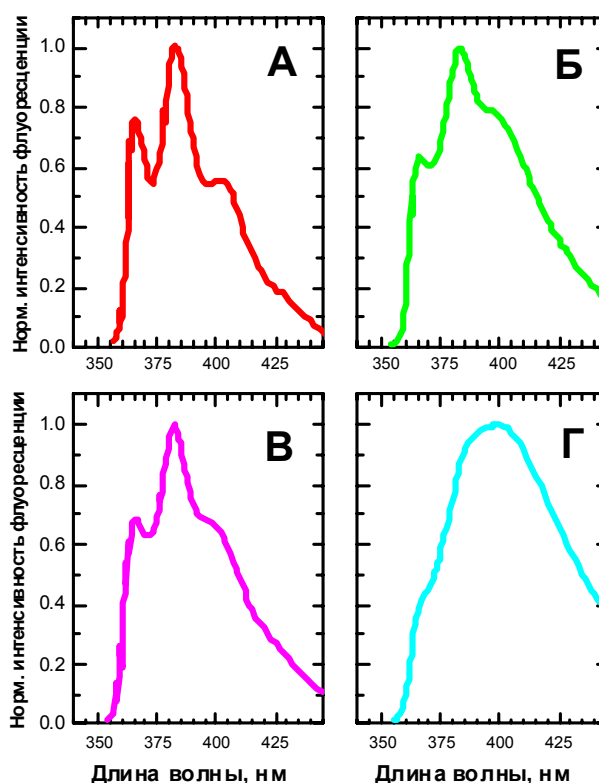


**Схема 1.** Структурные формулы 2-фенил[9,10]фенантроксазола (1) и 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазола (2).

Флуорофоров 1 и 2 позволяют осуществить одновременный мониторинг нескольких параметров окружающей их среды: форма спектра флуоресценции зонда 1 зависит от протонодонорной способности среды (Рисунок 2), а интенсивность флуоресценции 1 зависит от вязкости

среды; спектры флуоресценции зонда 2 чувствительны к способности к образованию водородных связей, полярности и вязкости окружения этого зонда [24-26].

Как видно из рисунка 2, в присутствии протонных растворителей относительные интенсивности полос флуоресценции зонда 1 заметно изменяются: в апротонных растворителях интенсивность полосы  $\lambda=365$  нм заметно выше интенсивности полосы  $\lambda=403$  нм, в протонных растворителях, напротив, интенсивность полосы  $\lambda=365$  нм заметно ниже интенсивности полосы  $\lambda=403$  нм. Максимум спектра флуоресценции зонда 1 в воде сдвигается в область длинных волн по сравнению с соответствующим параметром для зонда 1 в органических растворителях, колебательная структура спектра зонда 1 в воде является невыраженной, при этом интенсивность флуоресценции на длине волны  $\lambda=365$  нм более чем в 2 раза ниже интенсивности флуоресценции на длине волны  $\lambda=403$  нм. Таким образом, зонд 1 может использоваться для оценки гидратированности его микроокружения в липидном бислое.



**Рис. 2.** Нормализованные спектры флуоресценции зонда 1 в различных растворителях: (А) в октане, (Б) в метаноле, (В) в ацетонитриле с добавкой воды (95 об.% ацетонитрила и 5 об. % воды), (Г) в смеси 20 об.% ацетонитрила и 80 об. % воды. Форма флуоресцентного спектра зонда 1 зависит от протондонорной способности среды: в присутствии протонных растворителей интенсивность полосы  $\lambda= 365$  нм снижается, а интенсивность полосы  $\lambda= 403$  нм возрастает.

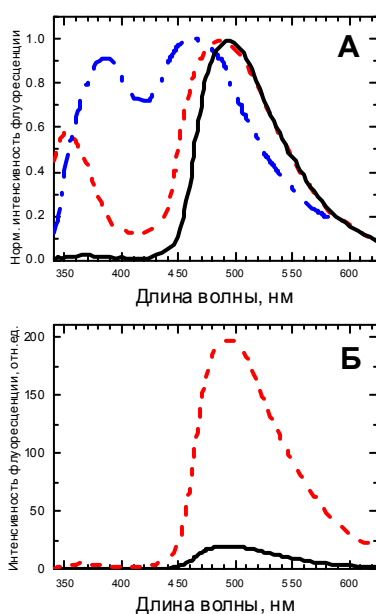
В возбужденном состоянии для 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазола (**2**) характерно протекание реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП): гидроксильная группа в орто-положении бокового бензольного кольца выступает в роли протондонора, а атом азота оксадиазольного цикла – в роли протонакцептора [24-26]. Результатом реакции ВМФПП является образование фототаутомерной формы ( $T^*$ ), флуоресцирующей в существенно более длинноволновой области по сравнению с исходной формой, т.н. «нормальной» формой ( $N^*$ ) [24-26] (Рисунок 3).

Положение максимумов флуоресценции нормальной формы ( $N^*$ ) и фототаутомерной формы ( $T^*$ ), а также соотношение интенсивностей флуоресценции нормальной и фототаутомерной

форм ( $I_{T^*}/I_{N^*}$ ) - параметры, которые позволяют осуществлять мониторинг физико-химических свойств микросреды зонда **2** [18,26] (Рисунок 3).

Например, при увеличении полярности среды происходит коротковолновый сдвиг полос флуоресценции исходной формы и фототаутомера (Рисунок 3А, сравнение спектров зонда **2** в октане и в ацетонитриле), а при увеличении способности среды к образованию водородных связей происходит длинноволновый сдвиг полосы флуоресценции исходной формы и коротковолновый сдвиг полосы флуоресценции фототаутомера (Рисунок 3А, сравнение спектров зонда **2** в октане и в воде). Кроме того, при возрастании полярности среды и способности среды к образованию водородных связей наблюдается относительное увеличение интенсивности полосы флуоресценции нормальной формы по отношению к соответствующей интенсивности полосы флуоресценции фототаутомера (Рисунок 3А), т.е. уменьшается величина соотношения  $I_{T^*}/I_{N^*}$ .

Увеличение вязкости микроокружения зонда **2** приводит как к абсолютному увеличению интенсивности флуоресценции фототаутомера, так и к относительному увеличению интенсивности флуоресценции фототаутомера по отношению к соответствующей интенсивности исходной формы (Рисунок 3Б, сравнение спектров зонда **2** в октане и в полистирольной плёнке), т.е. увеличивается соотношение  $I_{T^*}/I_{N^*}$ .

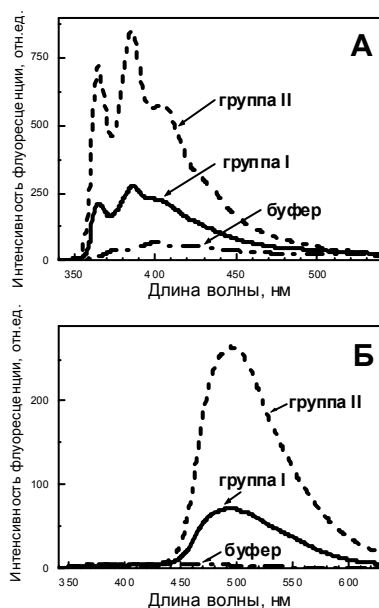


**Рис. 3.** Флуоресцентные спектры зонда **2**: (А) в различных растворителях – в октане (сплошная линия), в ацетонитриле (пунктирная линия), в воде (линия «точка-тире»); (Б) в октане (сплошная линия) и в полистирольной плёнке (штриховая линия). Положение полос флуоресценции и соотношение интенсивностей флуоресценции  $I_{T^*}/I_{N^*}$  зонда **2** зависит от полярности и протондонорной способности окружающей его среды. Интенсивность флуоресценции фототаутомера зонда **2** возрастает при возрастании вязкости окружающей среды.

Поскольку зонд **2** позволяет использовать соотношение интенсивностей флуоресценции фототаутомерной формы ( $I_{T^*}$ ) и исходной формы ( $I_{N^*}$ ) в качестве параметра для оценки физико-химических свойств микросреды [18,26], его можно отнести к ратиометрическим флуоресцентным зондам. Такие ратиометрические флуоресцентные зонды имеют несколько преимуществ по сравнению с традиционными флуорофорами: использование ратиометрических флуоресцентных зондов даёт возможность исключить как погрешности измерений, обусловленные девиацией концентрации флуоресцентной пробы (например, неравномерным содержанием флуоресцентной пробы в различных мембранах), так и погрешности измерений, обусловленные девиацией настроек флуоресцентной техники (девиации интенсивности источника возбуждающего излучения, изменения в фокусировке, изменения в чувствительности фотодетектора и т.д.) [27].

Ожидается, что зонд **1** локализуется в наиболее гидрофобных областях липидных мембран (в области метиленовых цепочек фосфолипидов и в центре липидного бислоя), а зонд **2** – в достаточно полярных областях липидных мембран (в области глицерольных остатков фосфолипидов и в области карбонильных групп фосфолипидов). Предположение о локализации зондов **1** и **2** в липидных мембранах сделано на основании их флуоресцентных свойств в липидном бислое [24], а также их структурного сходства с флуоресцентными зондами, мембранная локализация которых известна [11,12].

При связывании зонда **1** с мембранами тромбоцитов спектры его флуоресценции приобретают колебательную структуру, величина соотношения интенсивностей флуоресценции  $I_{365}/I_{403}$  увеличивается, интенсивность флуоресценции зонда **1** в максимуме флуоресценции ( $\lambda=385$  нм) увеличивается и максимум флуоресценции сдвигается в область более коротких длин волн, по сравнению с соответствующими спектрами **1** в буфере, не содержащем мембран тромбоцитов (Рисунок 4А).



**Рис. 4.** Флуоресцентные спектры зондов **1** (А) и **2** (Б), связанных с тромбоцитами контрольной группы (сплошная линия), с тромбоцитами больных церебральным атеросклерозом (штриховая линия), и для зонда в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (линия «точка-тире»). Спектры зондов **1** и **2**, связанных с тромбоцитами больных церебральным атеросклерозом (группа II), заметно отличаются от соответствующих спектров этих зондов, связанных с тромбоцитами контрольной группы (группа I): в случае атеросклероза интенсивность флуоресценции зонда **1** в максимуме флуоресценции (383 нм) в 3,1 раза выше соответствующей интенсивности для контрольной группы, интенсивность флуоресценции фототауомера (450-630 нм) зонда **2** в случае атеросклероза в 3,7 раза выше соответствующей интенсивности для контрольной группы.

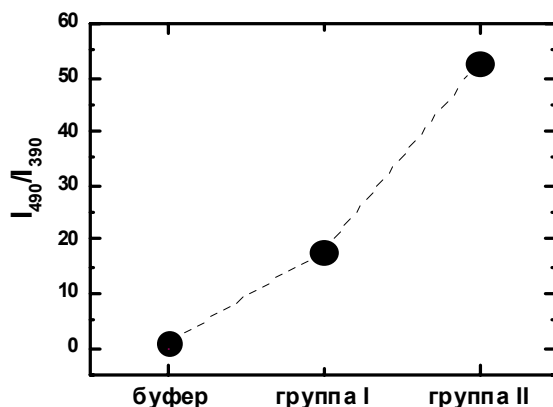
Коротковолновый сдвиг максимума полосы флуоресценции, появление колебательной структуры, увеличение соотношения интенсивностей флуоресценции  $I_{365}/I_{403}$  зонда **1** в присутствии мембран тромбоцитов указывает на уменьшение количества молекул воды в микроокружении зонда при его встраивании в липидную мембрану (т.е. при переходе молекул зонда **1** из водной среды в гидрофобную среду липидной мембраны).

Принимая во внимание высокий квантовый выход зонда **1** как в аполлярных апротонных растворителях (в октане  $\phi \sim 0,52$ ), так и в полярных протонных средах (в смеси 80 об.% воды и 20 об.% ацетонитрила  $\phi \sim 0,56$ ), наблюдаемое 4-8 кратное возрастание интенсивности флуоресценции **1** в присутствии мембран тромбоцитов, по сравнению с соответствующей интенсивностью этого зонда в буфере без мембран, (Рисунок 4А) не может быть объяснено только за счёт увеличения вязкости микросреды зонда в липидных мембранах. Другой возможной причиной обсуждаемого возрастания интенсивности флуоресценции **1** после инкубации с мембранами

тромбоцитов может быть увеличение числа молекул зонда, оставшихся в растворе в результате связывания с липидными мембранами и, соответственно, уменьшение числа молекул зонда, выпавших в осадок за 1 час инкубации с мембранами, по сравнению с числом молекул зонда **1**, выпавших в осадок за время инкубации в буфере, не содержащем мембраны тромбоцитов. Такое осаждение молекул зонда **1** за 1 час инкубации после добавления ацетонитрильного раствора зонда к буферу (см. экспериментальную часть) происходит вследствие низкой растворимости зонда **1** в воде ( $< 1$  мкМ).

При связывании с мембранами тромбоцитов интенсивность флуоресценции исходной формы (т.е. «нормальной» формы,  $N^*$ , максимум флуоресценции  $\sim 390$  нм) **2** уменьшается, а интенсивность флуоресценции фототаутомерной формы ( $T^*$ , максимум флуоресценции  $\sim 490$  нм) **2** увеличивается по сравнению с соответствующими интенсивностями **2** в буфере без тромбоцитов (Рисунок 4).

Увеличение соотношения интенсивностей флуоресценции  $I_{T^*}/I_{N^*}$  для зонда **2** при связывании с мембранами тромбоцитов свидетельствует об уменьшении способности к образованию водородных связей, уменьшении полярности и росте вязкости окружения зонда при переходе зонда из буфера в липидную биомембрану (Рисунок 5).



**Рис. 5.** Соотношения интенсивностей флуоресценции таутомерной и исходной форм  $I_{T^*}/I_{N^*}$  были вычислены для зонда **2**, связанного с тромбоцитами контрольной группы (группа I), с тромбоцитами больных церебральным атеросклерозом (группа II), и для зонда в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (буфер). Величины соотношения  $I_{T^*}/I_{N^*}$ , вычисленные для зонда **2**, связанного с тромбоцитами, значительно больше, чем соответствующая величина для зонда **2** в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов. Величина соотношения  $I_{T^*}/I_{N^*}$  для зонда **2**, связанного с тромбоцитами больных церебральным атеросклерозом (группа II), в 2,9 раза выше, чем соответствующее значение для зонда **2**, связанного с тромбоцитами контрольной группы (группа I).

В отличие от DPH, DMHL и 1,4-ANS, зонды **1** и **2** показали значительную разницу между тромбоцитами контрольной группы (группа I) и тромбоцитами больных церебральным атеросклерозом (группа II), (Рисунок 4).

По сравнению со спектром флуоресценции зонда **1**, связанного с мембранами тромбоцитов контрольной группы (группа I), спектр флуоресценции зонда **1**, связанного с мембранами тромбоцитов пациентов с церебральным атеросклерозом (группа II), имеет более значительную интенсивность в максимуме флуоресценции ( $\lambda=385$  нм) и более выраженную колебательную структуру.

Как следует из рисунка 4, для случая церебрального атеросклероза величина соотношения интенсивностей полос флуоресценции  $I_{365}/I_{403}$  зонда **1** составляет 1,23, что превышает соответствующую величину соотношения интенсивностей для контрольных мембран тромбоцитов, составляющую 0,98.

Отмеченное наличие более выраженной колебательной структуры и увеличение соотношения интенсивностей полос флуоресценции  $I_{365}/I_{403}$  свидетельствуют об уменьшении гидратации

(т.е. о росте гидрофобности) микроокружения зонда 1 в мембранах тромбоцита при церебральном атеросклерозе.

Возрастание интенсивности спектра флуоресценции в максимуме флуоресценции ( $\lambda=385$  нм) свидетельствует как об увеличении числа молекул зонда, связавшихся с тромбоцитами больных за время инкубации, так и о возможном увеличении вязкости микроокружения зонда 1 в мембранах тромбоцитов при церебральном атеросклерозе.

Обсуждаемые увеличение числа молекул зонда, связавшихся с тромбоцитами пациентов (группа II) за время инкубации, и возможное увеличение вязкости при патологии хорошо согласуются с ростом гидрофобности микроокружения зонда 1 в мембранах тромбоцитов при церебральном атеросклерозе.

Рост гидрофобности и увеличение вязкости микроокружения зонда 1 могут быть объяснены увеличением содержания холестерина в гидрофобных углеводородных областях мембран тромбоцитов при церебральном атеросклерозе.

Спектр флуоресценции зонда 2, связанного с мембранами тромбоцитов пациентов с церебральным атеросклерозом (группа II), характеризуется значительным возрастанием интенсивности флуоресценции фототаутомерной формы ( $T^*$ , максимум флуоресценции  $\sim 490$  нм) и возрастанием соотношения интенсивностей флуоресценции  $I_{T^*}/I_{N^*}$  (Рисунки 4,5) по сравнению с соответствующим спектром флуоресценции 2, связанного с мембранами тромбоцитов контрольной группы (группа I). Отмеченное возрастание интенсивности флуоресценции фототаутомерной формы и соотношения интенсивностей флуоресценции  $I_{T^*}/I_{N^*}$  свидетельствуют об увеличении вязкости, уменьшении способности к образованию водородных связей и уменьшении полярности микроокружения зонда 2 в мембранах тромбоцитов при церебральном атеросклерозе. Такое увеличение вязкости, уменьшение способности к образованию водородных связей и уменьшение полярности микроокружения зонда 2 указывает на дегидратацию области локализации этого зонда. Обсуждаемая дегидратация, в свою очередь, может быть объяснена увеличением содержания холестерина в области глицерольных остатков и карбонильных групп фосфолипидов мембран тромбоцитов при церебральном атеросклерозе.

Таким образом, зонды 1 и 2 показали чувствительность к изменениям в мембранах тромбоцитов при церебральном атеросклерозе.

### Благодарность

Автор выражает благодарность проф. Дорошенко А.О. за предоставленные для исследования 2-фенил[9,10]фенантроксазол и 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазол, д.м.н. Реминяк И.В. (Институт неврологии, психиатрии и наркологии) за предоставленные для исследования образцы тромбоцитов, а также с.н.с. лаборатории нейрофизиологии и иммунологии Института неврологии, психиатрии и наркологии, к.б.н. Бевзюк Д.А. – за ценные комментарии.

### Литература / References

1. Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine, 23rd edn. Philadelphia: WB Saunders; 2007.
2. Fayad ZA Cardiovascular molecular imaging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:981-2.
3. Choudhury RP, Fisher EA. Molecular imaging in atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:983-91.
4. Saraste A, Nekolla SG, Schwaiger M. Cardiovascular molecular imaging: an overview. *Cardiovasc Res* 2009;83:643-52.
5. Desai MY, Schoenhagen P. Emergence of targeted molecular imaging in atherosclerotic cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2009;7: 197-203.
6. Sanz J, Fayad ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 2008;451:953-7.
7. Cormode DP, Skajaa T, Fayad ZA, Mulder WJM. Nanotechnology in medical imaging: probe design and applications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:992-1000.
8. Rudd JHF, Hyafil F, Fayad ZA. Inflammation imaging in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1009-16.
9. Laufer EM, Winkens MHM., Narula J, Hofstra L. Imaging of cell death in atherosclerosis. *ArteriosclerThromb Vasc Biol* 2009;29:1031-38.



10. Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Optical and multimodality molecular imaging: insights into atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1017-24.
11. Vladimirov YA, Dobretsov GE. Fluorescence probe in study of biological membranes. Moscow: Nauka, 1980.
12. Dobretsov GE. Fluorescence probes in cell, membrane and lipoprotein investigations. Moscow: Nauka, 1989.
13. Libby P, DiCarli M, Weissleder R. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. *J Nucl Med* 2010;51:33S-7S.
14. Bakic M. Pathogenetic aspects of atherosclerosis. *Acta Medica Medianae* 2007;46:25-9.
15. Christoph Wanner C. Lipids and atherosclerosis. In: Horl WH, ed. () Replacement of renal function by dialysis. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 2004: 791-805.
16. Reminyak IV, Boyko TP. Change of lipid structure of thrombocyte membranes in patients with vascular pathology of hypertensive and atherosclerotic genesis. *Ukr Visn Psychoneurol* 1999;7:14-6. (in Russian).
17. Doroshenko AO, Posokhov EA, Shershukov VM, Mitina VG, Ponomarev OA. Spectral and luminescence properties of derivatives of 2-aryl[9,10]phenanthroazole. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 1995;31:492-9.
18. Doroshenko AO, Posokhov EA, Verezubova AA, Ptyagina LM. Excited State Intramolecular Proton Transfer Reaction and Luminescent Properties of the Ortho-Hydroxy Derivatives of 2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazole. *J Phys Org Chem* 2000;13:253-65.
19. Rojas J, Domínguez JN, Charris JE, Lobo G, Payá M, Ferrándiz ML. Synthesis and inhibitory activity of dimethylamino-chalcone derivatives on the induction of nitric oxide synthase. *Eur J Med Chem* 2002;37:699-705.
20. Straume M, Littman BJ. Equilibrium and dynamic structure of large, unilamellar, unsaturated acyl chain phosphatidylcholine vesicles. Higher order analysis of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and 1-[4-(trimethylammonio)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene anisotropy decay. *Biochemistry* 1987;26:5121-6.
21. Ho C, Slater SJ, Stubbs CD. Hydration and order in lipid bilayers, *Biochemistry* 1995;34:6188-95.
22. Disalvo EA, Larion F, Martini F, Tymczyszyn E, Frias M. Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:2655-70.
23. Gabdouliline RR, Zheng C, Vanderkooi G. Molecular origin of the internal dipole potential in lipid bilayers: role of the electrostatic potential of water. *Chem Phys Lipid* 1996;84:139-46.
24. Posokhov EA, Abmanova NA, Boyko TP, Doroshenko AO. *Visn Hark nac univ, № 454, Ser Him, issue 4(27), P. 188. [ISSN 2220-637X (print)] [in Russian/Ukrainian].*
25. Doroshenko AO, Posokhov EA, Verezubova AA, Ptyagina LM, Skripkina VT, Shershukov VM. Radiationless deactivation of the excited phototautomer form and molecular structure of ES IPT-compounds. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:92-9.
26. Doroshenko AO, Posokhov EA. Proton phototransfer in a series of ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole in polystyrene films. *Theor Exper Chem* 1999;35:334-7.
27. Shapiro HM. Flow cytometry. New York: Science, 1995.

*Поступила в редакцію 20 июля 2012 г.*

Є. О. Посохов. 2-Феніл[9,10]фенантроксазол і 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазол як флуоресцентні зонди для дослідження змін у мембранах тромбоцитів при атеросклерозі.

Проведено пошук флуоресцентних зондів для детекції патологічних змін у мембранах тромбоцитів при атеросклерозі. З'ясовано, що флуоресцентні зонди, які застосовують для детекції зміни вмісту холестеролу в ліпопротеїнах (1,4-ANS, DPH, DMHL), не дозволяють виявити патологічні зміни в мембранах тромбоцитів при атеросклерозі. Показано, що флуоресцентні характеристики 2-Феніл[9,10]фенантроксазолу і 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазолу є чутливими до змін у мембранах тромбоцитів при атеросклерозі.

**Ключові слова:** флуоресцентні зонди, біомембрани, атеросклероз, тромбоцит.

Y. O. Posokhov. 2-Phenyl-phenantr[9,10]oxazole and 2-(2'-OH-phenyl)-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole as fluorescent probes to study the changes in platelet membranes accompanied the atherosclerosis.

The search of fluorescent probes to detect pathological changes in platelet membranes caused by the atherosclerosis has been performed. It has been found that the fluorescent probes, which are commonly used for monitoring the cholesterol content in lipoproteins (1,4-ANS, DPH, DMHL) failed to detect the changes in platelet membranes accompanied the atherosclerosis. It has been shown that fluorescence parameters of 2-phenyl-phenantr[9,10]oxazole and 2-(2'-OH-phenyl)-5-phenyl-1,3,4-oxadiazole are sensitive to the changes in platelet membranes in this case.

**Key words:** fluorescence probes, bio-membrane, atherosclerosis, platelet (thrombocyte).

Kharkov University Bulletin. 2012. № 1026. Chemical Series. Issue 21 (44).