

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

UKRAINIAN BIOCHEMICAL JOURNAL

Volume 86, N 5 (Supplement 1), 2014

Kyiv

Матеріали XI Українського біохімічного конгресу 6-10 жовтня 2014 р., м.Київ

Зміст

Пленарні доповіді	4
I. Структура, властивості та функції біологічних макромолекул і надмолекулярних комплексів	
Доповіді	14
Стендові повідомлення	42
II. Регуляція метаболічних процесів та клітинних функцій	
Доповіді	90
Стендові повідомлення	123
Алфавітний покажчик	233

За організаційну та фінансову підтримку в підготовці і проведенні XI Українського біохімічного конгресу та за публікацію матеріалів конгресу Українське біохімічне товариство висловлює щирю подяку:

- Національній академії наук України (НАНУ)
 - Міністерству освіти і науки України
 - Київському національному університету імені Тараса Шевченка
 - Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
 - Федерації європейських біохімічних товариств (FEBS)
-
- ЗАТ «МАКРОХІМ» – Хімічна продукція, оснащення лабораторій, Україна
 - ЗАТ «Фармацевтична фірма «ДАРНИЦЯ»
 - ТОВ «Науково-виробнича компанія «ЕКОФАРМ»
 - ТОВ «АЛТ Україна» ЛТД – Передові лабораторні технології
 - ТОВ «АЛСІ» ЛТД – Обладнання сучасних лабораторій, Україна
 - ТОВ «БІОЛАБТЕХ» ЛТД – Обладнання, реагенти, технічна підтримка обладнання, Україна
 - ТОВ «МАНКОР» – Лабораторний посуд та обладнання, Україна
 - ТОВ «Іноваційно-виробнича компанія «РАМІНТЕК», Україна

Шановні учасники XI Українського біохімічного конгресу!

Цими днями у нас свято. Свято української біохімічної науки.

Свято – тому що наша наука залишається однією з найцікавіших, найважливіших і найскладніших природничих наук. Тому що біохімія і суміжні науки бурхливо розвиваються і створюють не тільки нові знання про живе, але й закладають основи сучасної біомедицини, дозволяють отримувати нові корисні для суспільства продукти, починаючи від біокомп'ютерів та біороботів до нових і невідомих раніше організмів. Тому що наш Конгрес – це чудова і важлива нагода зустрітися разом і познайомитися з досягненнями світової та вітчизняної біохімії, почути думку колег щодо своїх власних досліджень.

Ми горді з того, що наше товариство, якому понад 85 років, є одним із найдавніших наукових товариств країни і є рівноправним членом Міжнародного Союзу біохімії і молекулярної біології (IUBMB) та Федерації Європейських біохімічних товариств (FEBS), що члени нашого товариства достойно представляють українську науку як в нашій країні, так і за кордоном.

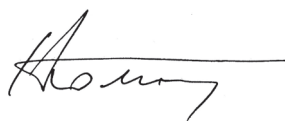
Наш Конгрес проходить у славетному Київському національному університеті імені Тараса Шевченка – визнаному лідеру серед університетів нашої країни. Користуюсь нагодою, щоб щиро подякувати керівництву та співробітникам Університету за можливість провести конгрес та за його організацію.

Український біохімічний конгрес відбувається у складні для нашої країни часи, і тому особливо саме зараз наше завдання полягає в тому, щоб бути на рівні сучасної науки та зробити свій достойний внесок у біохімію і молекулярну біологію, а також використати здобутки світової науки на благо населення України.

Від імені президії Українського біохімічного товариства та організаційного комітету Конгресу бажаю всім вам успіхів та нових звитяг у вашій роботі, і хай вам щастить у всьому!

Зі щирою повагою

Президент Українського
біохімічного товариства
академік НАН та АМН України



Сергій Комісаренко

ПЛЕНАРНІ ДОПОВІДІ

THE MOLECULAR MACHINERY OF INTRACELLULAR PROTEIN DEGRADATION

BAUMEISTER W.

*Max-Planck-Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany;
e-mail: baumeist@biochem.mpg.de*

The 26S proteasome is at the executive end of the ubiquitin proteasome pathway for the controlled degradation of intracellular proteins. While the structure of its 20S core particle (CP) has been determined by X-ray crystallography, the structure of the 19S regulatory particle (RP), which recruits substrates, unfolds them, and translocates them to the CP for degradation, has remained elusive. Here, we describe the molecular architecture of the 26S holocomplex determined by an integrative approach based on data from electron cryomicroscopy, X-ray crystallography, residue-specific chemical cross-linking, and several proteomics techniques. The “lid” of the RP (consisting of Rpn3/5/6/7/8/9/11/12) is organized in a modular fashion. Rpn3/5/6/7/9/12 form a horseshoe-shaped heterohexamers, which connects to the CP and roofs the AAATPase module, positioning the Rpn8/Rpn11 heterodimer close to its mouth. Rpn2 is rigid, supporting the lid, while Rpn1 is conformationally variable and positioned at the periphery of the ATPase ring. The ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 are located in the distal part of the RP, indicating that they were recruited to the complex late in its evolution. The modular structure of the 26S proteasome provides insights into the sequence of events prior to the degradation of ubiquitylated substrates.

Tripeptidylpeptidase (TPP) II is a complex of 6MDa which trims or degrades peptides released by the proteasome. We have determined the structure of *Drosophila* and human TPP II by a hybrid cryo EM–x-ray crystallography approach. The active sites are buried in a complex network of cavities permeating the assembly and restricting access to small- and medium sized peptides. Activation of TPP II is linked to assembly in such a manner that sequestration precedes activation.

References

1. Lasker K., Förster F., Bohn S. *et al.* Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach // PNAS. – 2012. – 109, N 5. – P. 1380–1387.
2. Rockel B., Kopec K. O., Lupas A. N., Baumeister W. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – 1824. – P. 237–245.
3. Förster F., Unverdorben P., Sledz P., Baumeister W. Unveiling the long-held secrets of the 26S proteasome // Structure. – 2013. – 21. – P. 1551–1559.

TYROSINE NITRATION AS POSTTRANSLATIONAL MODIFICATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS IN ANIMALS AND PLANT CELLS

BLUME Ya. B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net*

Nitric oxide (NO) is a precursor of reactive nitrating species which modify proteins to generate oxidized species such as 3-nitrotyrosine. During last decade a growing body of evidences indicates that NO also regulates a myriad of physiologic responses by modifying tyrosine residues. As results of these investigations, the

cytoskeleton becomes the main cellular fraction containing nitrotyrosinated proteins. α -Tubulin can be considered as the major target among them. 3-Nitrotyrosine can posttranslationally incorporate into C-terminus of α -tubulin molecule via tubulin-tyrosine ligase, similar to unmodified tyrosine residue. Earlier it was shown that nitration can occur on animal α -tubulin at sites other than the C-terminus: Tyr-161 and Tyr-357 were positively identified as two specific amino acids endogenously nitrated. Looking for the structural effects triggered by nitrotyrosination of α -tubulin, we reconstructed the spatial structure of nitrotyrosinated α -tubulin isoforms. The results of 3-D reconstruction of α -tubulin and redistribution of surface electrostatic charge revealed that the nitration of Tyr-161 increases negative electrostatic potential in the lateral contact interface of the molecule (H4-S5 region). The nitration of Tyr-357 results in more significant reorganizations of molecular surface structure in comparison with nitration of Tyr-161. We can suppose the influence of Tyr-357 nitration on the interaction with GTP molecule that is attached to β -tubulin of next dimer. Also it is possible to assume, that nitration of Tyr-161 and 357 can increase their ability to undergo a phosphorylation. The results of reconstruction the spatial structure α -tubulin with detyrosinated, tyrosinated and nitrotyrosinated C-termini testify that these modifications change substantially the level of flexibility of α -tubulin C-terminal domain. The tyrosination increases substantially the mobility of C-terminus. The breakdown of tyrosination/detyrosination cycle due to incorporation the nitrotyrosine into C-terminus should resulted in predomination of short-time living microtubules over long-time living microtubules.

Recently we demonstrated the presence of α -tubulin tyrosine nitration in plant cells (*Nicotiana tabacum* BY-2 suspension culture). It was also revealed that nitrotyrosine decorates such highly dynamic microtubular arrays as preprophase bands, mitotic spindles and phragmoplasts of these cells. This proves the presence of tyrosine nitrated α -tubulin in the polymerized MTs. It was assumed that the functional role of this posttranslational modification can be the regulation of MTs dynamic properties, since exogenous NO donors caused dose-dependent decrease of general number of mitotic MTs without any changes of their organization. Moreover, 3-D models of the mitotic kinesin-8 complexes with the tail of detyrosinated, tyrosinated and nitrotyrosinated α -tubulin at C-terminus (Tyr 450) from *Arabidopsis thaliana* were reconstructed. These experiments allow to obtaine respective proofs of tubulin nitrotyrosination influence on the molecular dynamics of α -tubulin and kinesin-8 interaction (Blume et al., *Front. Plant Sci.*, 2013; 4 (530):1-14).

Generally, α -tubulin tyrosine nitration can be considered as common tubulin posttranslational modification. Direct mechanism of NO signal transduction with the participation of animal and plant MTs under physiological conditions are one of the hallmarks of the increased MT dynamics.

НОВІ ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНТИРОЗИНФОСФАТАЗ: СТРУКТУРА, АКТИВНІСТЬ І МЕХАНІЗМИ ДІЇ

ВОВК А. І.

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;
e-mail: vovk@bpci.kiev.ua*

Протеїнтирозинфосфатази каталізують гідроліз фосфотирозинових залишків протеїнів, контролюючи разом із протеїнкіназами ступінь фосфорильованості протеїнових молекул та їхню активність в багатьох біохімічних перетвореннях, в тому числі тих, що забезпечують ріст, диференціювання, апоптоз, рухливість і метаболізм живих клітин. Активність протеїнтирозинфосфатаз може бути пов'язана з розвитком захворювань людини. Так, відомо, що протеїнтирозинфосфатаза 1В (PTP1B) є негативним регулятором інсулін- і лептинзалежної клітинної сигналізації, яка каталізує гідроліз фосфоестерних зв'язків у структурі активованого рецептора інсуліну або кінази JAK2, асоційованої з лептиновим рецептором. Внутрішньоклітинна фосфатаза SHP2, що бере участь в трансдукції сигналів, може ініціювати розвиток раку. Рецепторна протеїнтирозинфосфатаза CD45 відіграє суттєву роль в реалізації імунних функцій через дефосфорилування Src-кіназ і розглядається як мішень у разі лікування автоімунних захворювань та ускладнень при трансплантації органів. Аналіз механізмів

впливу природних і синтетичних сполук на активність протеїнтирозинфосфатаз свідчить про можливість утворення комплексів із інгібітором під час його зв'язування за рахунок переважно багаточетових механізмів, що виявляється в кінетиці конкурентного, змішаного або неконкурентного типу. Облаштування інгібітора може бути сповільненим. Крім того, деякі органічні сполуки або реакційні форми кисню здатні ковалентно модифікувати каталітичний залишок цистеїну, що в біологічному оточенні є складовою механізмів редокс-регуляції ензиму.

Інтерес до створення нових інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз дедалі зростає, незважаючи на те, що в літературі накопичено значну кількість даних щодо їх структури і активності. Численні похідні карбонових, сульфонових і фосфонових кислот, а також похідні гетероциклічних сполук виявляють значну інгібуючу здатність та певну селективність дії щодо окремих ензимів. Однак клінічні випробування окремих інгібіторів не привели до їх впровадження в клінічну практику. Тому пошук і первинні дослідження нових речовин як потенційних інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз все ще залишаються актуальним завданням біоорганічної хімії і біохімії.

В ІБОНХ НАН України в системах *in vitro* вперше досліджено нові інгібітори протеїнтирозинфосфатаз серед різних класів органічних сполук, включаючи похідні фосфонових і амінофосфонових кислот, у тому числі ковалентно закріплених на макроциклічній платформі калікс[4]аренів, тіакалікс[4]аренів і циклічних поліамінів, а також ряд похідних азотвмісних гетероциклічних сполук. Як модельні мішені було використано PTP1B, TC-PTP, SHP-2, CD-45, PTP- β , LAR і MEG2. Під час дослідження механізмів інгібування застосовувались кінетичні методи та методи молекулярного докінгу. Отримані результати дозволили знайти кореляції між розрахунковими і експериментальними даними, охарактеризувати особливості утворення ензим-інгібіторних комплексів та зробити висновки щодо механізмів дії інгібіторів.

ADAPTOR/SCAFFOLD PROTEINS: THE KEY INTEGRATORS OF INTRACELLULAR SIGNALING

DROBOT L.

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: drobot@biochem.kiev.ua*

To coordinate cellular responses, cell surface receptors employ receptor-proximal adaptor/scaffold proteins that compose exclusively of domains and motifs involved in intermolecular interactions. The creation of adaptor proteins-mediated supramolecular complexes is regulated in dynamic and selective fashion thereby influencing the processing of information through signaling networks. Given the important role of adaptor proteins in propagating cellular signals, it is quite likely that their dysfunction may be involved in carcinogenesis. The prooncogenic or tumor-suppressor activities of a set of adaptor proteins have been already demonstrated. Adaptor protein Ruk/CIN85 consisting of three SH3 domains, four blocks of proline-rich motifs and C-terminal coiled-coil region acts as a transducer platform that participates in the control of various physiological processes such as apoptosis, ligand-induced endocytosis of receptor tyrosine kinases, vesicular trafficking, cell adhesion, motility and invasion. However, a number of issues with respect to the role of Ruk/CIN85 in carcinogenesis remain still open.

Using Western-blot analysis and immunohistochemistry, it was shown previously the significant increase in expression level of Ruk/CIN85 full-length form in human invasive ductal breast adenocarcinoma samples in comparison with surrounding conditionally normal tissues. The highest expression of Ruk/CIN85 was found in lymph node metastases and in intravascular tumor embols suggesting that Ruk/CIN85 contributes to malignancy (Samoylenko et al., 2012). Therefore, we decided to investigate the oncogenic potential of Ruk/CIN85 by stably overexpressing the full-length isoform in weakly invasive MCF-7 breast adenocarcinoma cells deficient in adaptor protein. The Ruk/CIN85 overexpressing cells showed a slower growth rate, decreased cell adhesion, enhanced anchorage-independent growth in soft agar, increased motility in both

transwell migration and wound healing assays, increased production of hydrogen peroxide as well affected response to epidermal growth factor. Thereby, Ruk1/CIN85 led to a more rapid and prolonged epidermal growth factor-dependent activation of Src, Akt, S6/mTOR and ERK1/2 kinases, and NF- κ B transcription factor, and treatment with the Src inhibitor PP2 and the PI3K inhibitor LY294002 abolished the Ruk1/CIN85-dependent changes both in Akt activity and cell motility. Our findings also demonstrate that expression of Ruk/CIN85 in MCF-7 cells led to stabilization of HIF-1 α (through interference with proline hydroxylation-dependent protein destabilization) and provide the first evidence that Ruk/CIN85 induces uPA and uPAR expression as well as PAI-1 expression via modulation of HIF-1 α stability (Samoylenko et al., 2010). These molecular features of tumor cells are known to regulate many important steps of the metastatic process. In addition, Ruk/CIN85 overexpressing MCF-7 cells showed increased stemness characteristics such as: increased ability to form mammospheres; increased expression of CD44 with a CD44⁺/CD24⁻ phenotype; resistance to doxorubicin, tamoxifen and etoposide, higher amount of ABCG2-positive cells and increased activity of ALDH. Recent studies indicate that subpopulation of tumor cells with tumor-initiating ability play an important role in tumor dissemination and metastasis. Together, the data obtained indicates that high levels of Ruk/CIN85 contribute to the conversion of breast adenocarcinoma cells into a more malignant phenotype.

БАКТЕРІАЛЬНІ ТОКСИНИ. ЇХ РЕЦЕПЦІЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ В КЛІТИНАХ

КОЛИБО Д. В., ЛАБИНЦЕВ А. Ю., РОМАНЮК С. І., КОМІСАРЕНКО С. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kolibo@biochem.kiev.ua*

Протеїнові екзотоксини є найважливішими факторами патогенності багатьох бактерійних збудників небезпечних інфекційних захворювань, наприклад, холери, дифтерії, ботулізму, правцю, кашлюку, сибірки тощо. Молекули більшості токсинів побудовані з двох функціональних фрагментів: А-фрагменту (від. англ. “active”), який відповідає за токсичний вплив, та В-фрагменту (від. англ. “binding”), який відповідає за зв’язування токсину з рецепторами на поверхні клітини і транслокацію А-фрагменту до цитозолу.

Найкраще досліджено механізм проникнення дифтерійного токсину в клітину, клітинним рецептором якого є трансмембранна форма гепаринзв’язувального фактора росту. Після потрапляння до ендосом, зв’язок між А і В-фрагментами токсину розщеплюється протеїназою фурином, В-фрагмент вбудовується в мембрану ендосоми і переносить А-фрагмент в цитозоль, де відновлюється дисульфідний зв’язок між фрагментами токсину. Проте, деякі етапи транспортування і рецепції токсину залишаються нез’ясованими.

Використання флуоресцентно-мічених рекомбінантних фрагментів дифтерійного токсину в поєднанні з методом конфокальної мікроскопії дозволило нам встановити суттєві особливості процесу взаємодії токсину з клітинами та його транспортування всередині клітин. Так, нами було показано, що дифтерійний токсин здатний взаємодіяти і поглинатися не тільки чутливими, але й резистентними до нього клітинами. Проте, є певні особливості у внутрішньоклітинному транспортуванні токсину в різних типах клітин, які, ймовірно, пов’язані з СОРІ-залежним механізмом його транспортування в чутливих клітинах. На підставі одержаних даних запропоновано гіпотезу про використання ретроградного механізму транспорту А-субодиниці дифтерійного токсину в ендоплазматичний ретикулум як можливий механізм реалізації його біологічної функції.

**АТР-ГІДРОЛАЗИ ТА СИСТЕМНА БІОЛОГІЯ
ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВОЇ КЛІТИНИ***КОСТЕРІН С. О.**Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;**e-mail: kinet@biochem.kiev.ua*

Гладеньким м'язам належить видатне значення у забезпеченні функціонування систем внутрішніх органів. Внутрішньоклітинні іони Са виконують найважливішу роль у регуляції процесу «скорочення-розслаблення» гладеньких м'язів. АТР-гідролази системи (як Са²⁺-транспортуючі мембранозв'язані, так і скоротливих протеїнів) задіяні у контролі унікального загальнобіологічного феномену – електро- та фармакомеханічного спряження в м'язах. Можна стверджувати, що гладеньком'язова клітина являє собою складну рецепторну тензоелектрохімічну систему, для якої, стосовно внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу, притаманні так звані емерджентні властивості: кооперативність, нелінійність, неадитивність, синергістичність, наявність мереж позитивних і негативних зворотних зв'язків, а також явище «градієнта спорідненості» до іонів Са у випадку мембранозв'язаних енергозалежних Са²⁺-транспортувальних систем. Відповідно, з фундаментальної точки зору перспективним є комплексне трансдисциплінарне вивчення біофізикохімічних властивостей та іонних, молекулярних і мембранних механізмів функціонування гладеньком'язових клітин. Тому, в контексті уявлень системної біології гладеньком'язової клітини, спрямованих на розуміння механізму електро – та фармакомеханічного спряження, нагальним є пошук оборотних ефекторів (інгібіторів, активаторів) – селективних та високоафінних регуляторів мембранозв'язаних Са²⁺-транспортувальних АТР-гідролаз та АТР-гідролази скоротливих протеїнів. Втім маємо й важливий практичний аспект зазначеної проблеми: адже патології скоротливої функції гладеньких м'язів часто-густо пов'язані з порушенням кальцієвого гомеостазу в міоцитах. Мова йде, зокрема за: гіпо- та гіпертензію, аномалії моторики кишкового тракту, астму, гіпо- та гіпертонус матки, викидні, спонтанні аборти, дисфункції ерекції тощо. Отже, з практичної точки зору, можна стверджувати, що потенційно вищезазначені нетоксичні ефектори можуть слугувати «молекулярними платформами» для створення ліків нового покоління, що нормалізують скоротливу функцію гладеньких м'язів у випадку її порушення за патологічних станів. Відповідно до вищезазначеного в останні роки увагу біохіміків привертають, зокрема, такі супрамолекулярні сполуки, як каліксарени (циклічні олігомери фенолів).

У доповіді будуть продемонстровані результати трансдисциплінарного системного вивчення співробітниками відділу біохімії м'язів ІБХ та хімії фосфоранів ІОХ НАН України біохімічних та фізико-хімічних аспектів АТР-залежної регуляції концентрації іонів Са в клітинах міометрія та модуляції її каліксаренами. Під час проведення дослідів використовували наступні методи: препаративної та аналітичної біохімії, біохімічної мембранології, ензимології, ізотопної техніки (⁴⁵Са²⁺), фотон-кореляційної спектроскопії, спектрофотометрії, спектрофлуориметрії, протокової цитофлуориметрії, світлової та електронної мікроскопії, конфокальної мікроскопії, комп'ютерного докінг-моделювання та молекулярної динаміки, хімічної та біохімічної кінетики, математичного моделювання та статистичного аналізу (ІБХ НАНУ); органічного синтезу, ЯМР, інфрачервоної спектроскопії, ОФВЕРХ та молекулярного моделювання (ІОХ НАНУ); тензометрії та механокінетики (каф. біофізики КНУ ім. Тараса Шевченка). Буде зроблений акцент на висвітленні наступних питань: 1. Трансдисциплінарні дослідження та біохімія гладеньких м'язів. Системна біологія гладеньком'язової клітини та внутрішньоклітинний кальцієвий гомеостаз; 2. АТР-гідролази гладеньком'язових клітин – ключові ензими, які контролюють електро- та фармакомеханічне спряження; 3. Каліксарени та спрямована модуляція ними активності АТР-гідролазних систем та кальцієвого гомеостазу в клітинах міометрія; 4. Висновки.

**МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ
ФІБРИНОВОГО КАРКАСА ТРОМБУ**

ЛУГОВСЬКОЇ Е. В., КОМІСАРЕНКО С. В.

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

Внаслідок багатьох захворювань серцево-судинної системи активується система зсідання крові, що призводить до утворення тромбіну. Тромбін перетворює фібриноген (Fg) у фібрин (f), який полімеризується з утворенням тривимірної полімерної сітки. На першій стадії полімеризації формуються протофібрили, які на другій стадії латерально асоціюють, розгалужуються і утворюють фібриновий каркас тромбу. Для локалізації сайтів у молекулі фібрину, міжмолекулярна взаємодія яких лежить в основі механізмів полімеризації, нами було отримано ряд моноклональних антитіл (mAb) проти f. Серед них було відібрано mAb, які разом з Fab-фрагментами і синтетичними пептидами, що імітують амінокислотну послідовність епітопів даних антитіл, специфічно інгібували полімеризацію фібрину шляхом блокування сайтів полімеризації. За допомогою mAb 2d-2a, епітоп якого містить пептидний зв'язок Вβ14-15 у Fg; чотирьох mAb, епітопи яких локалізовано в ділянці Вβ15-46, та mAb II-4d з епітопом у NH₂-кінцевій частині γ-ланцюга D-регіону Fg, була виявлена невідома раніше пара комплементарних сайтів, яка разом з відомою парою сайтів «А»-«а» бере участь у формуванні протофібрил. Побудована комп'ютерна модель міжмолекулярної взаємодії виявлених сайтів.

Епітоп унікального f-специфічного mAb I-3c розташований в шарнірній частині суперспірального регіону молекули Вβ126-135. З його допомогою зроблено відкриття, що в процесі перетворення Fg в f в суперспіральному конекторі молекули відбувається структурна перебудова, яка необхідна для здійснення другого етапу полімеризації – латеральної асоціації протофібрил. Досліджено механізм виявленої структурної перебудови.

Отримано два mAb класу IgG проти αC-регіону молекули Fg, епітопи до яких розташовані у центральній і C-кінцевій частині αC-регіону. Показано, що в цих областях молекули знаходяться сайти полімеризації f. За допомогою HPLC виділено два фрагменти αC-регіону з молекулярною масою 10 і 24 кДа, які містять епітопи даних антитіл. Третє отримане mAb проти αC-регіону виявилось класу IgM. З його допомогою було показано, що в молекулі Fg і fdesA αC-регіони поєднані з фібринопептидами В і лише у разі їх відщеплення αC-регіони відходять від остова молекули.

Fg-специфічне mAb 2d-2a, f-специфічне mAb I-3c і D-димер-специфічне mAb III-3b, епітопом до якого локалізовано в області Вβ134-196, були використані в тест-системах як catch-антитіла для кількісного визначення в плазмі крові людини Fg, розчинного f і D-димеру відповідно. Як tag-антитіла було використано mAb II-4d для всіх трьох тест-систем, які наразі адаптовано для промислового виробництва. Результати апробації тест-систем у клінічних закладах України показали, що для своєчасної і ефективної діагностики загрози тромбоутворення необхідне одночасне кількісне визначення розчинного f і D-димеру в різні періоди антитромботичної терапії до та/або після хірургічних втручань.

Ефективним антитромботичним препаратом є протеїн С (РС), концентрація якого в плазмі крові суттєво знижується при різних захворюваннях серцево-судинної системи. Тому кількісне визначення цього протеїну в плазмі крові має велике діагностичне значення. З метою отримання mAb до РС як антигену було обрано кон'югований з KLN синтетичний пептид, який імітує карбоксикінцеву ділянку легкого ланцюга РС – Pro¹⁴⁴-Leu¹⁵⁵. Внаслідок отримано mAb IV-6A, яке реагувало з активованим РС та рекомбінантним РС. MAb IV-6A можуть бути використаними для кількісного визначення РС у плазмі крові людини.

Крім роботи, щодо діагностики загрози тромбоутворення, проводяться дослідження пошуку низькомолекулярних інгібіторів полімеризації f і формування тромбу. Знайдено, що до таких речовин відносяться каліксарени С-145 і С-192 та синтетичні пептиди, які імітують амінокислотну послідовність виявлених сайтів полімеризації. Досліджено загальні структурні особливості пептидів, які забезпечують їх інгібуючий ефект. Дані пептиди і каліксарени можуть слугувати основою для створення антитромботичних препаратів.

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ КАК КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР БИОХИМИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО РОСТА

ОСИНСКИЙ С. П.

*Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев*

Рассматривается влияние факторов метаболического микроокружения, к которым относятся оксигенация (гипоксия опухоли), аэробный гликолиз (эффект Варбурга), ограничение питания опухолевых клеток, внеклеточный ацидоз против внутриклеточной щелочности (работа антипортов и симпортов в опухоли), биоэнергетический статус и редокс-статус, на рост опухоли и ее прогрессию, в частности метастазирование, «спячку» опухоли и «избегание» иммунного контроля организма.

С учетом специфических характеристик метаболического микроокружения опухолевых клеток на основании данных литературы и собственных, предлагается пересмотреть некоторые методологические подходы к изучению биохимии опухолевого роста.

Приводятся примеры теоретического и практического значения исследований метаболического микроокружения опухолевых клеток, в частности с точки зрения биохимии опухолей.

РЕЦЕПТОРОПОСЕРЕДКОВАНА РЕГУЛЯЦІЯ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ В-ЛІМФОЦИТІВ І ЛІМФОМАГЕНЕЗ

СИДОРЕНКО С. П.

*Институт экспериментальной патологии, онкологии
і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: svitasyd@yahoo.com*

Дослідження механізмів регуляції диференціювання нормальних клітин та їх порушень при злоякісній трансформації є надзвичайно актуальними для визначення молекулярних механізмів патогенезу злоякісних новоутворень, застосування адекватної терапії та в розробці нових підходів до регуляції процесів диференціювання клітин. Регуляція процесів диференціювання В-лімфоцитів здійснюється завдяки інтеграції сигналів від ендогенних факторів та рецепторів, що забезпечують природний та адаптивний імунітет. Координовані зміни експресії генів, що регулюються специфічними комбінаціями транскрипційних факторів, забезпечують диференціювання клітин та їх функціональну активність. У той же час, механізми регуляції сигнальних каскадів клітин, експресії та активності транскрипції факторів на різних стадіях диференціювання нормальних клітин, а також у злоякіснотрансформованих клітинах, залишаються нез'ясованими.

Абсолютна більшість лімфом людини має В-клітинне походження, не дивлячись на те, що кількість Т- і В-лімфоцитів у дорослих людей є практично однаковою. Така висока частота злоякісної трансформації В-лімфоцитів обумовлена особливостями процесів фізіологічного диференціювання цих клітин і формування адаптивної імунної відповіді. Антиген-розпізнавальний рецептор В-клітин (BCR) є ключовим регулятором диференціювання В-клітин. Кооперація BCR з CD40, BAFFR, TAC1 та BCMA, що належать до родини TNF-рецепторів, забезпечує регуляцію диференціювання В-клітин при адаптивній імунній відповіді. CD150/SLAMF1 рецептор також приймає участь у регуляції імунної відповіді. Кооперативна дія цих рецепторів координує утворення зародкових центрів і переключення класів імуноглобулінів. Всі ці рецептори пов'язані з PI3K-Akt/PKB, ERK1/2, p38 MAPK, JNK1/2 та PKD2 сигнальними каскадами, які приймають участь у регуляції мережі транскрипційних факторів, що контролює диференціювання, проліферацію та апоптоз В-лімфоцитів. Нами були

з'ясовані особливості активації MAPK, Akt/PKB та PKD2 сигнальних каскадів через BCR, CD40 та CD150 в нормальних та злоякіснотрансформованих В-клітинах людини. Показана особлива роль адапторного протеїну SH2D1A/SAP у регуляції CD150-опосередкованих сигнальних каскадів. Використання В-лімфобластоїдних клітинних ліній, отриманих за трансформації вірусом Епштейна-Барр В-лімфоцитів хворих із Х-зчепленим лімфопроліферативним синдромом першого типу (XLP1), що мають мутації в *SH2D1A/SAP*, дозволило отримати свідчення участі цього адапторного протеїну в регуляції диференціювання В-лімфоцитів. Особливе місце в регуляції процесів диференціювання В-клітин займають фактори транскрипції родини IRF та NF-κарраВ. Нами було показано, що в нормальних та злоякіснотрансформованих В-лімфоцитах сигнали через BCR, CD40 та CD150 впливають на рівень експресії, активності та внутрішньоклітинної локалізації факторів транскрипції IRF4 та NF-κарраВ.

Визначення нових молекулярних маркерів, які можуть бути використаними для оцінки рівня диференціювання нормальних та злоякіснотрансформованих лімфоцитів, а також розробка нових підходів до регуляції диференціювання, проліферації та апоптозу нормальних і злоякіснотрансформованих В-лімфоцитів сприятиме вдосконаленню діагностики лімфоїдних форм лейкозів та лімфом, визначенню прогнозу перебігу захворювання, що, в свою чергу, слугуватиме підвищенню ефективності індивідуалізованої терапії і оптимізації економічних аспектів лікування хворих.

ХОЛІНЕРГІЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ШЛЯХУ АПОПТОЗУ

СКОК М. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: skok@biochem.kiev.ua*

Нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAХР) опосередковують швидку синаптичну передачу в нервово-м'язових з'єднаннях та автономних гангліях, регулюють функції інших іонних каналів та вивільнення нейромедіаторів у нейронах центральної нервової системи та підтримують життєздатність і проліферативний потенціал незбудливих клітин. Функціонування nAХР звичайно пов'язували виключно із плазматичною мембраною клітин. Дослідженнями нашої лабораторії вперше було показано присутність nAХР на зовнішній мембрані внутрішньоклітинних органел – мітохондрій. Було визначено, що мітохондрії печінки і мозку мишей експресують декілька субтипів nAХР, принаймні α3β2, α4β2 та α7β2, розподіл яких є тканиноспецифічним. На мембрані мітохондрій nAХР знаходяться у тісному контакті із потенціалзалежними аніонними каналами (VDAC), які приймають участь у формуванні мітохондріальної пори перехідної провідності. Відповідно, nAХР регулюють утворення мітохондріальної пори і пригнічують вивільнення цитохрому *c* і активних форм кисню під дією апоптогенних чинників – високих доз Ca²⁺ або H₂O₂.

Механізм сигналінгу nAХР у мітохондріях відрізняється від функціонування класичного іонного каналу. Було показано, що пригнічення вивільнення цитохрому *c* із ізольованих мітохондрій відбувається під дією як агоністів, так і антагоністів різних субтипів nAХР, а також антитіл, спрямованих проти позаклітинних (позамітохондріальних, орієнтованих у цитозоль) фрагментів молекули nAХР. Таким чином, акт сигналінгу опосередкований не деполяризацією мембрани мітохондрій іонами, що проходять крізь канал nAХР, а конформаційними змінами в молекулі рецептора, зумовленими зв'язуванням специфічних лігандів. За допомогою специфічних інгібіторів було визначено внутрішньомітохондріальні кінази, які беруть участь в реалізації анти-апоптотичного сигналінгу nAХР у мітохондріях. Так, було знайдено, що сигналінг α7-вмісних nAХР викликає переважно активацію PI3K/Akt-залежного шляху, а сигналінг α3β2 та α4β2 nAХР призводить також до інгібування Src- та CaMKII-залежних сигнальних шляхів.

Отримані дані свідчать про важливу роль мітохондріальних НАХР у підтриманні життєздатності клітин шляхом запобігання відкриттю пори перехідної проникності і вивільненню про-апоптотичних чинників, таких як цитохром *c* або активні форми кисню. Приймаючи до уваги те, що різні апоптогенні чинники запускають процес мітохондріального апоптозу неоднаковими шляхами, різноманітність субтипів НАХР мітохондрій забезпечує ефективний захист клітин від шкідливих впливів різного походження.

ANTIOXIDANTS: ANGELS OR DEVILS IN CHEMOTHERAPY?

STOIKA R.

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua*

An antioxidant is a molecule that inhibits the oxidation of other molecules which are potentially causing a production of free radicals starting chain reactions. When the chain reaction occurs in a cell, it can lead to cell damage or death, and antioxidants terminate these reactions. [Sies H. *Exp. Physiol.* 1997; 82 (2): 291–295]. Antioxidants are classified into two broad divisions, depending on whether they are hydrophilic (ex. glutathione, uric acid, vitamin C, lipoic acid) or lipophilic (ex. vitamin A, vitamin E, coenzyme Q). Water-soluble antioxidants react with oxidants in the cell cytosol and the blood plasma, while lipid-soluble antioxidants protect cell membranes from lipid peroxidation [Sies H., 1997]. Cell-produced reactive oxygen species (ROS) including hydrogen peroxide (H_2O_2), and free radicals such as the hydroxyl radical ($\bullet OH$) and the superoxide anion (O_2^-), are among the most important targets of action of the antioxidants. Selenium and zinc are the antioxidant nutrients having no antioxidant activity themselves, but they are required for the activity of some antioxidant enzymes. So, if such a positive role is referred to the antioxidants, then why the Noble laureate Jim Watson in his recent paper [Open Biol. 2013; 3(1): 120144] wrote “Free-radical-destroying anti-oxidative nutritional supplements may have caused more cancers than they have prevented”?

Here we have analyzed the results of our studies aimed at the molecular and cellular consequences of action of specific cytotoxic agents, including anticancer drugs and *Chelidonium* alkaloids, towards human and animal tumor cells *in vitro* and *in vivo*. It was demonstrated that the biological effects of these agents can be mediated by the ROS. We have detected an ultra-rapid (2 min) release of cytochrome *C* from mitochondria of human leukemia CEM T-cells treated with sanguinarine and chelerythrine, and early (1 h) pro-apoptotic DNA damage induced by these alkaloids was almost totally blocked by ROS scavenger N-acetyl-cysteine (NAC). However, such release was not stopped when another alkaloid, chelidonine inducing late (12-24 h) DNA damage, was applied [Kaminsky V. et al. *Toxicol. Lett.* 2008; 177(3): 168-181]. Thus, these and other pro-apoptotic effects (activation of caspase cascade, cleavage of PARP repair enzyme) of specific *Chelidonium* alkaloids depend significantly on their ability to induce ROS in the treated cells.

Doxorubicin is widely used in clinical oncology, however, its application in cancer patients is accompanied by several negative side effects, specifically a severe cardiotoxicity. This is caused by an extreme sensitivity of the cardiomyocytes to superoxide anions that are excessively produced under the action of this drug. Sodium selenite and selenomethionine (modulators of glutathione peroxidase) and D-pantethine (acetyl-CoA precursor) inhibited doxorubicin toxicity towards human cancer cell lines, while NAC did not possess such action [Panchuk R. et al. *Croat. Med. J.* 2014; 55: 206-217]. The production of H_2O_2 and O_2^- -radicals induced by doxorubicin in human T-leukemia Jurkat cells, was delayed (12-24 h). No inhibitory effect of the above mentioned antioxidants was observed in drug-resistant tumor cell lines.

Landomycin A is a novel antibiotic produced by *Streptomyces sp.* that possesses a unique feature of overcoming drug resistance in tumor cells. We have demonstrated early (1 h) and significant (2-3 fold) induction of H_2O_2 in both drug-sensitive and drug-resistant human tumor cell lines that was blocked by NAC scavenger, while it did not induce O_2^- -radicals, thus, suggesting less general toxicity comparing to doxorubicin [Panchuk R. *Biopolymers and Cell.* 2011; 27(2): 124-131]. Mitochondria were found to be the main target of

the landomycin A action, opposite to doxorubicin's targeting the DNA, and a direct activation of the effector caspase-7 upstream of other initiator caspases was detected. Thus, various anticancer agents differ in their ability to induce specific ROS, and the antioxidants differentially modulate a cytotoxic activity of these agents.

mTOR/S6K-ЗАЛЕЖНИЙ СИГНАЛЬНИЙ КАСКАД – НОВІ ГРАВЦІ ТА НОВІ ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗВ'ЯЗКИ

ФІЛОНЕНКО В. В.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

Унікальною властивістю клітин макроорганізмів є висока координованість їхнього росту, проліферації та диференціації, регуляції метаболічних процесів, в основі яких зміни в експресії цільових генів та трансляції відповідних мРНК. Дія зовнішніх чинників (механічні подразники, стимуляторні молекули, поживні речовини) запускає відповідні сигнальні каскади, внаслідок яких має бути зміна функціональної активності на рівні окремої клітини, цілого органу і організму в цілому.

mTOR/S6K-залежний сигнальний шлях є ключовим інтегратором стимулів, які надходять у клітину і залежать, в першу чергу, від наявності ростових факторів, цитокінів, гормонів та поживних речовин (амінокислот, глюкози). Порушення в його функціонуванні виявлено за багатьох патологій, а саме онкологічних захворюваннях, нейродегенеративних та метаболічних розладах. З огляду на це, компоненти зазначеного шляху є привабливими мішенями для їхнього дослідження як потенційних фармакологічних мішеней.

Одними з ключових молекул у mTOR/S6K-залежному сигнальному каскаді є кінази рибосомного протеїну S6 – S6K1 та S6K2. Ідентифікація та характеристика їх нових протеїнових партнерів, серед яких протеїнкінази PKC та CK2, убіквітин лігаза ROC1, CoA синтаза і адаптерний протеїн TDRD7 суттєво розширює наші уявлення, як про механізми регуляції S6K1/2 протеїнкіназ, так і про нові функціональні зв'язки сигнального каскаду в цілому.

**I. СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ
ТА ФУНКЦІЇ БІОЛОГІЧНИХ
МАКРОМОЛЕКУЛ
І НАДМОЛЕКУЛЯРНИХ
КОМПЛЕКСІВ**

ДОПОВІДІ**GENE ENCODING CHITINASE-3-LIKE 2 PROTEIN (CHI3L2)
IS NEW PUTATIVE “GENE-CHAMELION”***ARESHKOV P. O., AVDIEIEV S. S.**Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: chitotrio@gmail.com*

Human genome code six chitinase-like proteins, homologous chitinase-3-like 1 (CHI3L1) and chitinase-3-like 2 (CHI3L2) are the most investigated among them. Overexpression of both *CHI3L1* and *CHI3L2* genes was found in different tumors [Johansen et al., 2006; Kavsan et al., 2008]. Our previous studies (Areshkov et al., 2012) showed that in contrast to CHI3L1 mitogen (Recklies et al., 2002; Balynska et al., 2012) CHI3L2 treatment of serum-starved U373 or 293 cells resulted in cell growth arrest. Suppression of mitogenesis was accompanied by sustained ERK1/2 phosphorylation, whereas CHI3L1 induced more transient kinases activation.

To test biological effect of *CHI3L2* on cell mitogenesis we used the lentiviral-based vector system for gene transduction into 293 cells. MTT assay showed that under serum-free culturing conditions, heterogeneous population of 293 cells which stably produced CHI3L2, in contrast to 293_ *CHI3L1*(Lenti) cells, possessed approximately the same proliferation level as non- or *GFP*-transformed 293 cells, indicating the lack of mitogenic effect for secretory CHI3L2. Moreover, CHI3L2 treatment of 293_ *CHI3L1*(Lenti) cells resulted suppression of cell viability.

Recently, Miyatake et al. (2013) reported that lentiviral-mediated ectopic expression of human *CHI3L2* enhanced colony formation and proliferation of murine teratocarcinoma ATDC5 cells in serum-supplemented medium. Quoting our previous results, which demonstrated inhibition of 293 and U373 cell viability *via* recombinant CHI3L2 treatment, Japanese authors hypothesized that results alteration can be explained by cell nature. Analysis of 293_ *CHI3L2*(Lenti) and 293_ *CHI3L1*(Lenti) cells by MTT- and soft agar assays showed that *CHI3L2*-overexpression in 293 cells, same as *CHI3L2* in ATDC5 cells, increased both estimated parameters, pointing *CHI3L2* properties preservation in cells of different origin. As Miyatake et al. proposed, another possible explanation for that discrepancy is that continuous activation of CHI3L2-associated signal pathways may alter the cellular responses which are observed in the transient activation. However, further experiments are required to examine if the sustained of phosphorylation of ERK is observed in *CHI3L2*-overexpressing cells.

Thus, our results pointed on antagonistic functional duality of *CHI3L2* gene.

**MOLECULAR DOCKING ANALYSIS OF HEME BINDING
TO MAPK SIGNALING CASCADE MEMBERS INVOLVED
IN NEURONS DEVELOPMENT AND SURVIVAL***BARANNIK T. V.**V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine;
e-mail: tbarannik@karazin.ua*

Heme molecule is known now as the ligand that reversibly changes the activity of various proteins with regulatory functions (Girvan H.M. et Munro A.W., 2013). Heme level was found to affect the activity of tyrosine kinases of MAPK family, heme deficiency was shown to cause apoptosis of neurons and neurodegeneration

(Smith A.G. et al, 2011). But molecular mechanisms of heme action on MAPK signaling pathways are not elucidated yet. So molecular docking studies were performed in order to predict potential heme-binding sites and to evaluate the affinity for heme of MAPK cascade members involved in neuron development and survival.

Sequence annotations and gene ontology terms for human MAPK cascade members were loaded from UniProt server (<http://www.uniprot.org/>). Information on signaling pathways was selected from KEGG Pathway (<http://www.genome.jp/>) and Reactome (<http://www.reactome.org/>) databases. Structural files in *.pdb format for proteins with their annotations were loaded from Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/>). Pdb-file for heme *b* was loaded from PubChem (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/>). Molecular docking studies were performed using HEX server (<http://hexserver.loria.fr/>). Total energy of interactions (E_{total}) was calculated based on shape and electrostatics, and the range angle of 90°; other parameters were set to default values. Structure visualization and analysis were performed by Swiss-PdbViewer 4.1.0.

Among more than 50 kinases of MAPK signaling cascades and their partners acting in human about half are linked to neurotrophin signaling, regulation of axon guidance or regulation of apoptosis. Proteins with known 3D-structure were selected for docking analysis and included protein kinases MAPK1, MAPK3, MAPK7, MAPK8, MAPK9, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K5, MAPKAPK2, MAPKAPK3 and MAPK associated protein MAPKAP1.

Docking of selected MAPK-signaling members to heme *b* molecule revealed different E_{total} with median value -335 kJ/mol. The highest affinity was shown for MAPKAPK2 in complex with MAPK14 (PDB ID 2OZA, -425 kJ/mol), MAP2K1 (PDB ID 3MMP, -398 kJ/mol) and MAPK9 (PDB ID 3E7O, -371 kJ/mol). In the case of multiple pdb structures available for one protein the docking analysis revealed the affinity for heme to be usually much lower in monomeric forms and higher in complexes of several subunits. The most difference was found in the case of MAP2K1, where E_{total} for monomer (PDB ID 1S9J) was -45 kJ/mol while for complex of A/B/C chains (PDB ID 3MMP) it was -398 kJ/mol. Opposite dependence was revealed only for MAP2K4: monomeric form showed more affinity for heme ($E_{total} = -331$ kJ/mol, PDB ID 3ALO) than complex of 3 chains ($E_{total} = -186$ kJ/mol, PDB ID 3ALN). Presence of inhibitors in the complexes with kinases affected their affinity to heme in different manner and less than number of chains.

Possible effect of cysteine residues on heme binding was studied for MAPK8 having pdb-files for 7 cysteine-deficient mutants. All mutants showed less affinity for heme comparing with natural variant of enzyme (PDB ID 2XRW, $E_{total} = -343$ kJ/mol) with minimum affinity in mutant with 5 substituted cysteines (PDB ID 3VUK, $E_{total} = -127$ kJ/mol). Since none of cysteines was predicted to be directly bound to heme, they may play certain role in maintenance of protein conformation.

So MAPK signaling members exhibit different affinity to heme that is dependent mostly on proteins association and cysteines important for conformation. The oscillations of cellular heme level may alter protein-binding and catalytic activity of MAPK-signaling members that could be one of the factors affecting neurons development and survival.

ТРНК ОБЕСПЕЧИВАЕТ ТОЧНОСТЬ СИНТЕЗА ПРОЛИЛ-ТРНК^{ПРО} НА ДВУХ ЭТАПАХ РЕДАКТИРОВАНИЯ ПРОДУКТА

*БОЯРШИН К. С., ПРИСС А. Е., РАЕВСКИЙ А. В., КРИКЛИВЫЙ И. А.,
КОВАЛЕНКО О. П., ИЛЬЧЕНКО Н. Н., ДУБЕЙ И. Я.,
ЯРЕМЧУК А. Д., ТУКАЛО М. А.*

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: kboyarshin@mail.ru*

Чтобы преодолеть проблему ложного узнавания сходных аминокислот, многие аминоксил-ТРНК синтетазы (АРСазы) выработали редактирующую активность для избирательного гидролиза ошибочно образованных продуктов. Существует два основных пути редактирования: избирательный гидролиз промежуточного продукта активации аминокислоты (аминоацил-аденилата) – претрансферное

редактирование, и гидролиз ошибочно синтезированной аминоксил-тРНК – посттрансферное редактирование. Предварительно нами было показано, что пролил-тРНК синтетаза бактерии *Enterococcus faecalis* (ПроPCEf) использует оба эти пути.

Для изучения молекулярных механизмов, обеспечивающих посттрансферное редактирование ПроPCEf мы применили ряд подходов, в том числе молекулярное моделирование, квантово-механические вычисления, сайт-направленный мутагенез и энзиматическую модификацию тРНК. Замена в редактирующем домене, ответственном за посттрансферное редактирование лизина Lys279 на аланин привело к падению скорости деацилирования примерно в 3000 раз. Докинг и молекулярная динамика показали роль этого аминокислотного остатка для связывания ССА-конца тРНК в активном центре редактирующего домена. С другой стороны, модификация тРНК^{Pro} по 2'-положению аденина A76 показала существенное значение 2'-гидроксильной группы для гидролиза. На основании полученных экспериментальных данных и квантово-механических (QM/MM) вычислений мы предложили двустадийный тРНК-ассистированный механизм гидролиза аланил-тРНК^{Pro}, ключевую роль в котором играет водородное связывание 2'-гидроксила A76 аминоксил-тРНК с карбонильной группой аминоксила. Предложенный нами механизм существенно отличается от известного и описанного в литературе для гомологичного энзима *Escherichia coli*.

Та же 2'-гидроксильная группа A76 тРНК^{Pro} участвует в тРНК-зависимом претрансферном редактировании. Её замена на протон оказывает слабое влияние на аминоксилацию, что подтверждает её специфическую роль в гидролизе аланил-аденилата. Таким образом, один и тот же структурный элемент тРНК^{Pro} обеспечивает точность аминоксилации тРНК на двух этапах редактирования.

ПРОТЕЇНИ CH13L1 І TSC22 МОДУЛЮЮТЬ ОНКОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИН

БУКРЕЄВА Т. В., КАВСАН В. М.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: t.v.bukreieva@imbg.org.ua*

Гліобластома є найагресивнішою пухлиною центральної нервової системи в дорослих, яка характеризується високою внутрішньопухлинною гетерогенністю та високою стійкістю до хіміотерапії різними агентами. Низька ефективність протипухлинних методів лікування, які використовують антиоксиданти для запобігання прогресу пухлини, може бути пов'язана з вищою стійкістю злоякісно трансформованих клітин до активних форм кисню. Ген *CH13L1* надзвичайно надекспресований в клітинах гліобластоми, проте як вміст мРНК *TSC22* значно знижений в гліобластомі порівняно з головним мозком людини в нормі. Метою цієї роботи було виявити внесок онкогена *CH13L1* (chitinase-3-like 1) та пухлиносупресорного гена *TSC22* (transforming growth factor-beta 1 [TGF-β1]-stimulated clone 22 domain family, member 1) до процесів виживання і апоптозу клітин лінії гліобластоми людини U87 за дії окислювальних агентів.

У ході роботи було досліджено чутливість *CH13L1*-продукуючих клітин (клітинна лінія гліобластоми людини U87) до активних форм кисню і визначено можливість протеїну супресора пухлин *TSC22* до зниження життєздатності та відновлення чутливості цих клітин до дії оксидантів. Клітини U87, трансфіковані конструкцією, що містила повнорозмірну кДНК *TSC22*, обробляли впродовж 24 год пероксидом водню в діапазоні концентрацій 0,05–5 мМ. Відповідно до результатів тесту МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолін бромід), за надпродукції *TSC22* внаслідок трансфекції відбувалось вірогідне зниження життєздатності клітин гліобластоми U87 на 16% в умовах окисного стресу при 0,5 мМ пероксиду водню, але нетрансфіковані клітини не зазнавали цитотоксичного ефекту за тієї самої концентрації H₂O₂. Кількість метаболічно активних нетрансфікованих клітин U87 експоненційно зростає протягом 7 днів, проте як стабільна продукція

протеїну-онкосупресора TSC22 призводить до зменшення кількості метаболічно активних клітин в 2,6 раза в той самий період. У присутності TSC22 спостерігається посилене фосфорилування протеїну p53 і зменшення продукції протеїну CH13L1 в клітинах U87, що було показано Вестерн-блот-аналізом зі специфічними антитілами. Але попри те, що TSC22 є транскрипційним фактором, його надекспресія не пригнічує транскрипції *CH13L1* в клітинах U87, що показано за допомогою ПЛР із праймерами до кодуєчої послідовності *CH13L1*.

Надпродукція протеїну-супресора пухлин TSC22 пригнічує життєздатність та відновлює чутливість клітин U87 до дії активних форм, пропонуючи новий онкогензалежний механізм хіміотерапевтичної стійкості в гліобластомі. Присутність TSC22 веде до посиленого фосфорилування p53 й обумовлює регуляцію вмісту CH13L1 в клітинах U87, що може впливати на онкогенність цих клітин.

АВТОХТОННА β -АГРЕГАЦІЯ ПРОТЕЇНІВ: ПЕРЕДУМОВИ, МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ТА ПАТОЛОГІЧНІ НАСЛІДКИ

ВЕРЬОВКА С. В.

ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України», Київ;
e-mail: sks-4072@mail.ru

Утворення β -структурованих протеїнових агрегатів належить до маловивчених та вкрай тяжких ускладнень багатьох захворювань, що практично не піддаються лікуванню. Узагальнення відомих даних про молекулярні механізми формування та підтримки структури протеїнів, закономірності їх взаємодії із клітинними мембранами та властивості утворених при цьому похідних дають змогу пояснити основні моменти зазначеного цього виду протеїнопатій, обґрунтувати присутність β -агрегованих протеїнових включень у найрізноманітніших патологічно змінених тканинах, вперше провести їх цілеспрямований пошук та виявлення в патологічно змінених тканинах.

Як відомо, протеїнові молекули є високозбалансованими структурами, що перебувають у стані динамічної рівноваги між тими чи іншими відхиленнями від «правильної» для кожної з них конформації. За порушення цієї збалансованості утворюються похідні, чия структура і властивості істотно відмінні від нативних форм. Типовим прикладом подібних розбалансованих структур є пептидні та протеїнові компоненти ендогенної інтоксикації, що є невід'ємною складовою комплексу метаболічних порушень, притаманних найрізноманітнішим захворюванням. Порушення обміну речовин призводить до надмірного накопичення проміжних метаболітів та утворення значної кількості нефізіологічних похідних, зокрема структурно ушкоджених протеїнів, що зазнали нефункціонального розщеплення чи хімічної модифікації. Подібні протеїни та пептиди здатні до вбудови в мембрани клітин, істотно змінюючи властивості останніх. Процес взаємодії незбалансованих пептидних структур із подвійним фосфоліпідним шаром мембрани носить закономірний характер та відбувається в кілька етапів, що включають сорбцію пептиду на поверхні мембрани, утворення α -спіралей та їх вбудову всередину шару, асоціацію окремих спіралей та перебудову в β -структури. Утворення в складі мембрани стабільних β -структурованих включень змінюють імунні властивості клітини, порушують функціонування трансмембранних протеїнів і надають мембрані неприродних сорбційних властивостей. Все це зумовлює розвиток та хронізацію функціональних порушень, що лежать в основі хронічних неінфекційних захворювань.

Нерозчинні, стабільні та стійкі до протеолізу β -структури здатні до автохтонного росту за рахунок сорбції розчинних протеїнів та індукції їх перебудови в β -конформацію. Типовим наслідком подібного процесу є амілоїдоза – група тяжких ускладнень найрізноманітніших захворювань, що практично не піддаються лікуванню. Однак утворення амілоїдів є лише «верхівкою айсбергу» процесів патологічного формування β -структур. Усвідомлення молекулярних механізмів, що лежать в основі цього процесу, дало змогу вперше виявити β -агреговані включення в патологічно змінених тканинах, чия формування створювало передумови для параметаболічного процесу β -агрегації.

EPIGENETIC CONTROL OF PROTO-ONCOGENIC *EEF1A2* EXPRESSION IN CANCER CELLS

¹VISLOVUKH A., ^{2,3,4}PORTO E., ¹GRALIEVSKA N., ^{2,3,4}BELDIMAN C.,
¹EL'SKAYA A., ^{2,3,4}HAREL-BELLAN A., ¹NEGRUTSKII B., ^{2,3,4}GROISMAN I.

¹State Key Laboratory on Molecular and Cell Biology, Institute of Molecular Biology
and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

e-mail: a.a.vislovukh@imbg.org.ua;

²Université Paris Sud, Laboratoire Epigenétique et Cancer, France;

³Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), France;

⁴Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), France

The main function of eEF1A (Eukaryotic translation elongation factor 1A) is to deliver aminoacyl-tRNA to the A site of the 80S ribosome. In higher eukaryotes it is present as two isoforms, eEF1A1 and eEF1A2, which are tissue and development specific. Their expression is mutually exclusive. However, appearance of eEF1A2 in non-specific tissue is associated with cancer progression. The expression of eEF1A2 has been detected in a variety of different tumors, including breast, ovarian, lung, pancreatic and other cancers. The mechanisms of eEF1A2 induction are unknown.

In the majority of ovarian cancer samples the overexpression of the *eeff1a2* gene was not related to the genetic or epigenetic modifications in the *eeff1a2* locus. Thus, deregulation of the eEF1A2 expression can occur on the posttranscriptional level. We proposed that the eEF1A2 expression in cancer tissues is controlled by microRNAs.

Thus our aim was to discover miRNAs that can regulate eEF1A2 expression and to investigate the effect of miRNA mediated eEF1A2 downregulation on the MCF7 breast cancer cell line proliferation.

Changes in the eEF1A2 mRNA and miRNAs levels were quantified by qPCR. Dual-luciferase assay was applied to detect the influence of miRNAs on the eEF1A2 expression.

For proliferation assay, the cells were stained and their number in each well was counted using the Operetta® High Content Imaging System (Perkin Elmer).

We found that eEF1A2 is a direct target of two oncosuppressor microRNAs: hsa-mir-663 and hsa-mir-744. Both miRNAs were able to downregulate the expression of luciferase gene attached to the 3'UTR of eEF1A2 up to 20% and 50% respectively. Next, we examined the effect of hsa-mir-663 and hsa-mir-744 on the cellular eEF1A2 expression in MCF7 cell line. In this case, overexpression of hsa-mir-663 and hsa-mir-744 reduced the eEF1A2 mRNA level by 45% and 70% and decreased the eEF1A2 protein level by 20 and 40% respectively.

Overexpression of both hsa-mir-663 and hsa-mir-744 inhibited the proliferation of MCF7 cells. Treatment of MCF7 cell line with anti eEF1A2 siRNA showed similar inhibitory effect of the MCF7 proliferation. hsa-mir-663 is well-known oncosuppressor and it was shown to be upregulated during treatment of THP-1 and SW-480 cells with resveratrol, one of the compounds of red wine. Resveratrol also inhibited eEF1A2 expression by blocking Akt in serum- or insulin-stimulated PA-1 cells. We observed upregulation of mir-663 and mir-744 with corresponding downregulation of eEF1A2 in resveratrol treated MCF7 cells, suggesting that resveratrol may influence the eEF1A2 expression through miRNA dependent pathway.

Our findings demonstrate that abnormal occurrence of the eEF1A2 isoform in tumor tissues may be caused by the loss of microRNA-mediated post-transcriptional control of the eEF1A2 expression. Our data support the opinion that regular red wine intake may lower a cancer risk.

ЕФЕКТ НАДНИЗЬКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ГЛЮКСАЛЮ І МЕТИЛГЛЮКСАЛЮ НА ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ТА АЗОТИСТИЙ ОБМІН ЛІМФОЦИТІВ *IN VITRO*

ГІРІН С. В., САВІНОВА І. В., НАУМЕНКО Н. В., АНТОНЕНКО І. В.

*ТОВ «Каскад-Медикал Референс-Лабораторія UBI», Київ;
e-mail: girin@cascade-medical.com.ua*

Важливим завданням сучасної біології є дослідження різноманітних аспектів метаболізму активних карбонільних сполук. Найвідомішими з них є гліюксаль і метилгліюксаль. Враховуючи структурно-функціональні особливості гліюксалю та метилгліюксалю, закономірним є очікування різноманітних ефектів у ланках метаболізму за дії субфізіологічних концентрацій цих сполук (менше $1 \cdot 10^{-8}$ М). Саме тому метою нашої роботи було дослідження впливу наднизьких концентрацій гліюксалю і метилгліюксалю на деякі ланки енергетичного та азотистого обмінів лімфоцитів *in vitro*.

Об'єктом дослідження були лімфоцити людини, які одержували з донорської крові. Забір крові проводили з ліктьової вени у вакуумні пробірки з EDTA(K2). Лімфоцити із крові одержували за допомогою методу седиментації на градієнті щільності Histopaque-1077 Hybri-Max® і інкубували в RPMI-1640 з 5% фетальної сироватки теляти, 40 мМ L-глутаміну; 10 тис. ОД пеніциліну та 10 мг стрептоміцину (всі реактиви Sigma, США) в 100 мл середовища при 37 °С та вологості 95%, в 5%-му CO₂. Концентрація лімфоцитів у контрольних та дослідних культурах складала $3 \cdot 10^6$ /мл. Після закінчення 16-годинного терміну інкубації в дослідні культури лімфоцитів вносили гліюксаль та метилгліюксаль у 0,9%-му розчині NaCl (кінцеві концентрації складали відповідно $1,29 \cdot 10^{-12}$ М і $1,04 \cdot 10^{-12}$ М). Одночасно в контрольні культури лімфоцитів вносили відповідні об'єми 0,9%-го розчину NaCl. До внесення гліюксалю та метилгліюксалю в дослідні культури лімфоцитів та 0,9%-го розчину NaCl у контрольні, а також після 3, 6, 24, 48 та 72 годин одержували проби культурального середовища, а також суспензії лімфоцитів, з яких одержували лізати. У лімфоцитах визначали активність ензимів азотистого обміну аланінамінотрансферази (2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (2.6.1.1), інтенсивність гліколізу оцінювали за активністю лактатдегідрогенази (1.1.1.27) та альдолази (4.1.2.13) і за вмістом пірувату, а також за зміною концентрації глюкози в культуральному середовищі. В лізатах визначали вміст протеїну. Для всіх видів аналізу критичний рівень значимості дорівнював $P < 0,05$.

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що надслабкий вплив гліюксалю ($1,29 \cdot 10^{-12}$ М) та метилгліюксалю ($1,04 \cdot 10^{-12}$ М) спричинює ефекти в окремих ланках енергетичного і азотистого обмінів лімфоцитів *in vitro*, про що свідчать вірогідні зміни активності альдолази, лактатдегідрогенази, аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази й концентрації пірувату в лімфоцитах, а також вмісту глюкози в культуральному середовищі. Слід зазначити, що в цих умовах проведення експерименту азотистий обмін зазнав менших змін, ніж енергообмін. У переважній більшості активність аспартатамінотрансферази і аланінамінотрансферази змінюється внаслідок зрушень, які відбуваються у внутрішньоклітинному енергетичному обміні.

Одержані результати дозволяють виявити активізацію енергообміну лімфоцитів в умовах 3- та 24-годинного надслабкого впливу гліюксалю і метилгліюксалю, що було виражено в закономірних вірогідних змінах концентрації основних його метаболітів: екстрацелюлярного пірувату і глюкози в культуральному середовищі. При цьому спостерігається значна різниця в метаболізмі глюкози між дослідними й контрольними культурами лімфоцитів ($r = -0,67$, при $P < 0,05$), що є результатом дії наднизьких концентрацій гліюксалю та метилгліюксалю.

**ПЛАЗМІНОГЕН/ПЛАЗМІНОВА СИСТЕМА.
НОВІ УЯВЛЕННЯ ПРО ФІЗІОЛОГІЧНУ
ТА ПАТОФІЗІОЛОГІЧНУ РОЛЬ**

ГРИНЕНКО Т. В., ЖЕРНОССКОВ Д. Д., ТИХОМИРОВ А. О., ЮСОВА О. І.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: grinenko@biochem.kiev.ua*

Плазміноген/плазмінова протеолітична система відіграє провідну роль у розчиненні фібринових згустків і підтримці гемостатичного балансу крові та є залученою до багатьох інших фізіологічних та патологічних процесів в організмі, таких як репродукція, ембріогенез, ремоделювання тканин, запалення, канцерогенез та метастазування.

Структурні особливості плазміноген/плазмінової молекули, наявність лігандзв'язувальних ділянок, розташованих в п'яти кринглових доменах, здатність до конформаційних перебудов визначають специфічність її міжмолекулярних взаємодій та забезпечують багатоманітність біологічних функцій. Участь плазміноген/плазміну в перелічених процесах реалізується через вплив на функціональну активність клітин. На поверхні мембран різних типів клітин містяться численні плазміногензв'язувальні сайти, взаємодія з якими забезпечує активацію проензиму до плазміну і захист останнього від дії інгібіторів, що дозволяє йому виконувати різні функції. Плазмін гідролізує протеїни адгезії та екстрацелюлярного матриксу, активує металопротеїнази та фактори росту і в такий спосіб прямо або опосередковано впливає на міграцію та інфільтрацію моноцитів і макрофагів, проліферацію ендотеліоцитів, інвазію малігнізованих клітин. Плазмін через інтегральні рецептори індукує внутрішньоклітинний сигналінг. Найдетальніше послідовність подій досліджено на моноцитах. Плазмін через взаємодію з аннексином А2 запускає Akt та ERK1/2 сигналінг, активацію факторів транскрипції NF- κ B та STAT, експресію генів та секрецію прозапальних цитокінів, стимулюючи тим самим повномасштабну запальну реакцію. Разом з тим процесинг плазміноген/плазміну внаслідок дії низки протеїназ призводить до утворення ендогенних фрагментів – ангіостатинів, які, на відміну від батьківської молекули, виявляють антиангіогенні та протизапальні властивості і діють за різними механізмами.

В експериментах, виконаних на плазмі, збагаченій на тромбоцити, та на відмитих тромбоцитах, встановлено, що нативний Glu-плазміноген на цитоплазматичній мембрані перетворюється на частково гідролізовану форму – Lys-плазміноген, для якої характерна відкрита конформація. Lys-плазміноген пригнічує агрегацію тромбоцитів, індуковану ADP, тромбіном та колагеном, і не впливає на рістоміцинзалежну агрегацію. Процес є зворотнім у присутності 6-аміногексанової кислоти та окремих крингловмісних фрагментів плазміногену і не чутливий до дії апротиніну. Показано, що Lys-плазміноген перешкоджає перебудові актинового цитоскелета тромбоцитів, зумовленого тромбіном та колагеном. Припускається, що антиагрегаційний вплив Lys-плазміногену обумовлений його взаємодією за участю лізинзв'язувальних ділянок різних кринглових доменів із мембранозв'язаними протеїнами, що експонуються на поверхні тромбоцитів під час активації і залучаються до тромбоутворення. Вперше встановлено, що одним із таких протеїнів є актин, показано його участь у процесингу плазміногену з утворенням ангіостатинів на поверхні тромбоцитів. Одержані дані дозволяють припустити, що регуляція плазміноген/плазміновою системою функціонального стану тромбоцитів спрямована на обмеження як надмірного тромбоутворення в кровотоці, так і процесів ангіогенезу під час репарації тканин за участю тромбоцитів.

**АВТОАНТИТІЛА ДО ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ЗА НОРМИ
І СЕРЦЕВО-СУДИННИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ**

¹ГРОМ М. Ю., ²ЯКОВЕНКО Л. Ф., ³ГРАНІЧ В. М., ³ДОБРОХОД А. С.,
³ТОРБАС О. О., ³РАДЧЕНКО Г. Д., ³СІРЕНКО Ю. М.,
²СИДОРИК Л. Л., ²КОРНЕЛЮК О. І.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: grom.m.yu@gmail.com;
²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
³Національний науковий центр «Інститут кардіології
ім. акад. М. Д. Стражеска» НАМН України, Київ

Тирозил-тРНК синтетаза належить до високоспецифічної групи ензимів, які каталізують реакцію аміноацилювання відповідних тРНК на дорибосомному етапі біосинтезу протеїну. Крім основної синтетичної активності, ці ензими здійснюють низку неканонічних функцій. Тирозил-тРНК синтетаза завдяки своїм цитокиноподібним властивостям здатна впливати на процес неоангіогенезу. Ензим залучений до розвитку одного з найпоширеніших спадкових нейродегенеративних захворювань – синдрому Шарко-Марі-Тута, а також антисинтетазного синдрому. Раніше нами було показано високий рівень автоантитіл до тирозил-тРНК синтетази в пацієнтів із серцевою недостатністю. Здійснення неканонічних функцій синтетази забезпечується як цитоплазматичною, так і ядерною та позаклітинною її формами. Наявність у позаклітинному просторі тирозил-тРНК синтетази, зокрема, може провокувати утворення автоантитіл, роль яких у нормі та у разі патологічних процесів не досліджено.

Метою роботи було виявлення автоантитіл до рекомбінантного протеїну повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази в пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями, клінічно здорових донорів та клінічно здорових осіб з ускладненою спадковістю за серцево-судинними захворюваннями.

Рекомбінантний протеїн експресували, використовуючи штам-продуцент, трансформований відповідним плазмідним вектором, та очищували методом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозній колонці. Рівень специфічних автоантитіл у сироватці крові хворих з артеріальною гіпертензією II ($n = 19$) та III ($n = 8$) стадії та клінічно здорових донорів ($n = 36$) – контрольна група, а також здорових за клінічними показниками осіб, родинна історія яких включала випадки серцево-судинних захворювань, ($n = 10$) – група порівняння, досліджували за допомогою твердофазного імуоензимного аналізу. Антитілопозитивною вважали сироватку, абсорбція якої перевищувала середнє значення абсорбції антитіл в клінічно здорових донорів на два стандартні відхилення ($m+2SD$).

Підвищений рівень автоантитіл (антитілопозитивні сироватки) до рекомбінантного протеїну тирозил-тРНК синтетази детектовано у 5,7% донорів крові та у 11,8% пацієнтів з артеріальною гіпертензією II стадії, 12,5% пацієнтів з артеріальною гіпертензією III стадії. Серед клінічно здорових осіб з ускладненою спадковістю за серцево-судинними захворюваннями не ідентифіковано антитілопозитивної сироватки до рекомбінантної тирозил-тРНК синтетази.

Виявлення підвищеного рівня автоантитіл до досліджуваного протеїну як серед пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями, так і клінічно здорових донорів крові свідчить про можливу роль тирозил-тРНК синтетази як автоантигену. Для розуміння значення ензиму в патогенезі серцево-судинних захворювань необхідне подальше порівняльне дослідження біологічної активності автоантитіл до тирозил-тРНК синтетази.

**НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНЕ ПОРУШЕННЯ БАР'ЄРНИХ
ВЛАСТИВОСТЕЙ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ – РЕЗУЛЬТАТ
ДЕЗОРГАНІЗАЦІЇ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЇ
СТРУКТУРИ ГЕМОГЛОБІНУ**

ГУЛЕВСЬКИЙ О. К., РЄПІН М. В., ЩЕНЯВСЬКИЙ І. Й.

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: ivanou@rambler.ru*

Зараз домінуючим уявленням про механізми кріоушкодження клітин є первинність порушення структурно-функціональних властивостей плазматичних мембран внаслідок впливу фізико-хімічних факторів середовища: температурного стресу, зміни рН, концентрування розчинів солей, впливу кристалотворення тощо.

У роботі досліджувалась дія низькотемпературного впливу на еритроцити і замкнуті тіні, плазматичні мембрани яких практично зберігають свої бар'єрні властивості на рівні нативних клітин. У той самий час за гіпотонічного гемолізу в цих модельних клітинах вміст гемоглобіну в обсязі, властивому для нативних еритроцитів, знижується приблизно в 4–5 разів і еритроцит знаходиться в дезорганізованому стані.

За різних режимів заморожування до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ – повільного (1–2 град./хв) або швидкого (200–400 град./хв) – у відігрітих зразках за даними виходу маркерних речовин (гемоглобін, ^{14}C -сахароза, $^{45}\text{Ca}^{2+}$, Mn^{2+} , K^{+} , Na^{+}) оцінювали збереження бар'єрних властивостей плазматичних мембран нативних еритроцитів і замкнутих тіней. Встановлено, що навіть за відсутності захисту кріопротекторами на відміну від нативних еритроцитів, мембрани яких практично повністю втрачають свої бар'єрні властивості, мембрани замкнутих тіней значною мірою (40–60%) зберігають їх.

Найвираженіші відмінності виявляються під час дослідження невеликих концентрацій кріопротекторів (гліцеролу або ДМСО), доданих у середовище заморожування до кінцевої концентрації 1–4%. У цьому разі, за вмісту 1–2% гліцеролу в середовищі під час повільного заморожування, судячи за виходом гемоглобіну, кріодеструкції піддається 87–93% мембран еритроцитів, тоді як замкнуті тіні еритроцитів в цих умовах зберігають свої бар'єрні властивості приблизно на 80%. Подібні дані одержано і за дослідження ДМСО в концентрації 1–2% як кріопротектора. Виявлена закономірність зберігається і в разі використання швидкого (200–400 град./хв) заморожування. Морфологічні дослідження методом електронної скануючої мікроскопії еритроцитів і замкнутих тіней еритроцитів, підданих заморожуванню-відтаюванню під захистом низьких концентрацій кріопротекторів, добре корелюють із даними про стан бар'єрних властивостей мембран, оцінюваних за виходом маркерних речовин.

Таким чином, сукупність виявлених фактів, на нашу думку, свідчить про важливу роль надмолекулярної організації гемоглобіну, порушення якої призводить до колоїдно-осмотичного гемолізу еритроцитів, що принципово змінює існуючі уявлення про механізми кріоушкодження.

НОВІ ФУНКЦІЇ ПРОТЕЇНІВ ЕНДОЦИТОЗУ В КОНТРОЛІ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО СИГНАЛІНГУ

¹ДЕРГАЙ М. В., ¹ДЕРГАЙ О. В., ¹ПАНЬКІВСЬКИЙ С. В.,
¹НОВОХАЦЬКА О. В., ²МЯЧИНСЬКА М., ¹РИНДИЧ А. В.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
²Міжнародний інститут молекулярної та клітинної біології, Варшава, Польща;
e-mail: m.dergai@imbg.org.ua

Клатринопосередкований ендоцитоз – процес поглинання клітиною молекул за допомогою облямованих клатрином везикул – є важливим для підтримання клітинного гомеостазу, передачі сигналів всередину клітини, а також встановлення значення та інтенсивності таких сигналів. Окрім того клатринопосередкований ендоцитоз є важливим для виживання клітин, їх міграції та диференціації. Слід зазначити, що у ссавців цей процес є інтегрованим з іншими клітинними процесами, зокрема із проліферацією та диференціацією. Поглинання молекул із плазматичної мембрани є високопорядкованою послідовністю подій, в яких бере участь декілька десятків протеїнів ендоцитозу.

Нещодавно було показано, що протеїни, які знаходяться переважно біля плазматичної мембрани, переміщуються в ядерний компартмент, де можуть виявляти низку специфічних функцій. На сьогодні роль протеїнів ендоцитозу в ядрі є мало дослідженою, проте відомий вплив цих протеїнів на експресію генів, визначення стану компактизації хроматину, підтримку стабільності генетичного апарату та участь у процесі поділу клітини.

Нами було показано, що адаптерний протеїн інтерсектин 1 може переміщатися до ядра. Накопичення інтерсектину 1 спостерігається за блокування експорту протеїнів з ядра за допомогою лептоміцину В. В ядерній фракції детектовано форму інтерсектину 1 зі збільшеною молекулярною вагою, що обумовлюється її убіквітинілюванням. Цікаво, що убіквітинільовану форму не детектовано в цитозольній фракції. Форму інтерсектину 1 зі зміненою молекулярною масою також детектовано в ядерній фракції, одержаній з печінки щура. Ці дані вказують на те, що убіквітинільована форма інтерсектину має ядерну локалізацію *ex vivo* та *in vivo*.

Нами встановлено, що інтерсектин 1 зв'язує гетерогенний ядерний рибонуклеопротеїн К (HNRNPK), який регулює експресію генів та транспорт транскриптів. Надекспресія інтерсектину 1 в ядрі призводить до активації гену *c-myc*, який регулюється і протеїном HNRNPK. Окрім того, інтерсектин 1 здатний зв'язуватись із транскриптами гену *Fun*, що може свідчити про його роль в транспорті специфічних транскриптів.

Раніше було продемонстровано, що інтерсектин 1 може впливати на сигнальні каскади, які реалізуються в цитозолі. Нами показано, що інтерсектин 1 може також активувати частини сигнальних каскадів, які розташовані в ядерному компартменті. Спираючись на одержані дані, можна припустити, що адаптерний ендоцитозний протеїн може модулювати клітинні сигнали від початкового моменту їх надходження в клітину до етапу регуляції експресії генів в ядрі.

THE HUMAN IFN- β ENHANCER: MOLECULAR ASSEMBLING IN SOLUTION

DRAGAN A. I.

*Institute of High Technologies, Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: anatoliy.dragan@gmail.com*

An essential step in the formation of human interferon- β (IFN- β) enhanceosome, which regulates IFN- β synthesis, involves interferon regulatory factors (IRFs), which are activated upon virus infection. Activation of IRFs is triggered by phosphorylation of certain Ser/Thr residues in the C-terminal domain (CTD) of this two-domain protein and results in its dimerization and binding to the IFN- β enhancer. This is followed by binding of the other two main components of the enhanceosome: the NF- κ B (p50/p65) and bZIP ATF-2/c-Jun heterodimers. Despite general knowledge of enhanceosome organization the mechanisms of the proteins interaction with the enhancer DNA and their cooperation resulting in enhanceosome activation still have not yet been studied in details.

Assembly of interferon- β enhanceosome from its individual protein components (IRF-3, HMG-I/Y, NF- κ B and ATF-2/c-Jun bZIP dimer) in different combinations and of enhancer DNA has been studied in solution using fluorescence anisotropy, microcalorimetry, and circular dichroism (CD) approaches. It was shown that the enhancer binds only one full-length phosphomimetic IRF-3 dimer at the PRDIII–PRDI sites, and this binding does not exhibit cooperativity with binding of the ATF-2/c-Jun bZIP (leucine zipper dimer with basic DNA recognition segments) heterodimer at the PRDIV site. The orientation of the bZIP pair is, therefore, not determined by the presence of the IRF-3 dimer, but is predetermined by the asymmetry of the PRDIV site. In contrast, bound IRF-3 dimer interacts strongly with the NF- κ B (p50/p65) heterodimer bound at the neighboring PRDII site. The orientation of bound NF- κ B is also predetermined by the asymmetry of the PRDII site and is the opposite of that found in the crystal structure. The HMG-I/Y protein, proposed as orchestrating enhanceosome assembly, interacts specifically with the PRDII site of the interferon- β enhancer by inserting its DNA binding segments (AT hooks) into the minor groove, resulting in a significant increase in NF- κ B binding affinity for the major groove of this site.

The mechanisms of interferon- β enhanceosome activation will be discussed.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЛІПОПЕПТИДНИХ АНТИБІОТИЧНИХ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ ШТАМУ *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB В-7404

¹ДРАГОВОЗ І. В., ¹ЛЕОНОВА Н. О., ¹ЗЕЛЕНА Л. Б.,
²РЕБРИЄВ А. В., ¹АВДЄЄВА Л. В.

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: igordragovoz@ukr.net;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

Відомо, що синтез ліпопептидних антибіотиків притаманний деяким видам сапробіонтних бактерій роду *Bacillus*. Ліпопептиди завдяки амфифільним властивостям мають широкий спектр біологічної активності, зокрема беруть участь у біоконтролі захворювань рослин. Так, штами *Bacillus amyloliquefaciens* здатні до синтезу ліпопептидних антибіотиків, що відіграють важливу роль у прояві антагонізму щодо фітопатогенних грибів та індукції фітоімунітету. Така різновекторна спрямованість прояву біологічної активності характерна саме для позаклітинних ліпопептидів із родини фенгіцинів. Нами було показано високу антифунгальну активність штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB

B-7404 щодо фітопатогенів зернових культур та проведено очистку і хімічний аналіз ліпопептидних екзометаболітів, що визначають його антагонізм.

Метою роботи було проведення ідентифікації антибіотичних екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404 із залученням мас-спектрометричного та молекулярно-генетичного методів аналізу.

Об'єктами роботи були надсадова рідина добової культури досліджуваного штаму та його біомаса. Підготовку зразка для мас-спектрометричного аналізу здійснювали перерозподілом певних екзометаболітів в органічну фазу з подальшим концентруванням та очисткою ліпопептидних фракцій хроматографічними методами. Аналіз зразків ліпопептидних антибіотиків здійснювали за допомогою часоперельотної мас-спектрометрії з матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією (т.з. MALDI-TOF MS), використовуючи спектрометр Voyager-DE PRO (Applied Biosystem, США). Одержані результати показали, що мас-спектри аналізуємих сполук ідентичні мас-спектрам ліпопептидних антибіотиків родини фенгіцинів. Мас-піки відповідають значенням m/z від 1449,9 (C_{15}) до 1485,9 (C_{16}). Результати мас-спектрометричного аналізу збігаються з даними літератури щодо ідентифікації ліпопептидних біосурфактантів у бацил.

Молекулярно-генетичні дослідження здійснювали з використанням специфічних праймерів шляхом ампліфікації фрагментів трьох генів синтезу фенгіцинів, які було підібрано за допомогою програм MEGA 5.0 і Primer 3 на підставі відомих послідовностей цих генів у представників роду *Bacillus*, наведених у базі даних Gen Bank. Методом ЗТ-ПЛП із застосуванням цих праймерів показано транскрипційну активність трьох генів, що входять до складу оперону фенгіцинсинтез: *fenD*, *fenE*, *fenA*. Про це свідчать амплікони відповідних розмірів: 132, 168 та 286 п.н. Одержані результати підтверджують, що штам *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7404 містить у складі геному оперон фенгіцинсинтез і гени цього оперону є транскрипційно активні.

Отже, використовуючи MALDI-TOF мас-спектрометрію і молекулярно-генетичні методи аналізу встановлено, що ліпопептидні антибіотичні сполуки досліджуваного штаму належать до родини фенгіцинів. Завдяки своїм властивостям, останні виявляють антифунгальну активність щодо фітопатогенів, з одного боку, та індукують фітоімунітет – з іншого, здійснюючи в такий спосіб біоконтроль рослинних хвороб.

GLIOBLASTOMA MOLECULAR SUBTYPES ACCORDING TO DATA OF GENE EXPRESSION

¹IERSHOV A., ²LIKHOVID A., ³STETSYUK P., ³MEKLER A., ¹DMITRENKO V.

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: a.yershov@yahoo.com;

²V. M. Glushkov Institute of Cybernetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

³The Bonch-Bruевич Saint-Petersburg State University
of Telecommunication, Russian Federation

Glioblastoma is the most aggressive intracranial malignancy characterized by high invasiveness, recurrence, and poor response on chemo- and radiotherapy. The heterogeneous character of glioblastoma eliminates the value of single molecular markers. High-throughput gene expression analysis provides huge amounts of data, that could be used to identify characteristic gene expression profiles (signatures), associated with specific tumor properties. Previously, glioblastomas were divided into three subtypes that correlated with patient survival or into four subtypes using unsupervised cluster analysis. However, gene expression signatures alone provide limited possibility to understand the biology of tumor. Large number of genes is associated with tumorigenesis, and gene entry to the signature does not mean its direct relevance to the tumor pathogenesis. Analysis and integration of various signatures, created using different approaches, can clarify common pathways involved in tumor development, which is not apparent at the level of individual genes.

We used cluster analysis with k-means approach to search for the differences in expression of 12480 genes in 224 glioblastomas samples obtained earlier, and found two subtypes. 15 genes were upregulated and 401 genes were downregulated two-fold in the first subtype of glioblastoma (80 samples) as compared to the second subtype (144 samples). 10 from 15 genes with increased expression in the first subtype encoded proteins involved in the regulation of cell cycle and proliferation. Significant part of 401 genes were found to be involved in synaptic transduction, neurogenesis, formation of myelin sheath, and axon development. Further, to validate our classification we selected 15 genes with increased expression in the first subtype, and 60 of 401 genes with increased expression in the second subtype. Kohonen map, built on the basis of expression of selected genes also showed the existence of two subtypes in same glioblastoma samples.

Distribution of glioblastomas on two subtypes on the basis of expression of 416 genes, selected in our work, may represent two ways of tumorigenesis, leading to the development of subtypes with increased expression of either «proliferative» or «proneural» genes. This 416-gene expression signature can be used for classification of glial tumors. The clinical relevance of obtained glioblastoma subtypes, namely correlation with patient survival, awaits further characterization.

THE ROLE OF G-QUADRUPLEXES IN MAINTAINING OF THE FUNCTIONAL STRUCTURES OF HIV-1 UNTRANSLATED REGIONS

ZARUDNAYA M. I., POTYAHAYLO A. L., KOLOMIETS I. N., HOVORUN D. M.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: m.i.zarudna@imbg.org.ua*

Multiple structural rearrangements of the HIV-1 genomic RNA occur during various stages of the virus life cycle. Mechanisms maintaining conformations competent for polyadenylation, dimerization, reverse transcription, and other processes are not well studied. Consideration of the role of G-quadruplexes in RNA structure can contribute to elucidation of these mechanisms. Earlier we proposed models of dimerization linkage structure of HIV-1 genome for mature viral particles. These models include both DIS (dimerization initiation site) hairpin and intermolecular dimeric G-quadruplexes located downstream of DIS (Zarudnaya et al., 2003, 2005). Recently we revealed conservative G-rich tracts in the 3' untranslated region (UTR) of HIV-1 genomic RNA with high potential to form intramolecular (monomeric) G-quadruplexes. Supposing that formation of G-quadruplexes can provide independent folding of the downstream RNA region, we first presented structural models for the complete poly(A) site and almost entire 3' UTR of HIV-1 pre-mRNA (Zarudnaya et al., 2013). The aim of the present work was to elucidate a role of the G-rich tract located about 40 nts downstream of GAG start codon in formation of dimerization competent structure of the 5' terminal region of HIV-1 genome. This tract has been reported to form intramolecular G-quadruplex in genome of HIV-1 NL4-3 and promote strand transfer *in vitro* (Shen et al., 2009).

To evaluate a conservation of this tract, we have analyzed about 2000 HIV-1 genomic sequences of different subtypes presented in GenBank and revealed that on average 90% of genomes contain a similar G-rich tract with the potential to form G-quadruplex. Supposing that formation of this G-quadruplex determines the boundary of the preceding genomic region, we predicted the structure of the region from the end of the poly(A) hairpin up to the beginning of the G-rich tract for about 200 HIV-1 isolates of different subtypes using UNAFold program. We applied two folding constraints, the first to prohibit base pairs in 18 nts of primer binding site, which interacts with the cellular tRNA^{Lys3}, and the second to prohibit base pairs in the pseudoknot-like GACGC-GCGUC duplex predicted by Sakuragi et al. (2012). The 5' strand of this duplex is located immediately upstream of DIS hairpin and the 3' strand is located 10 nts downstream of GAG start codon. Upon folding of this region the dimerization competent structure was formed in optimal or near-optimal folding ($\text{ddG} \leq 1.0 \text{ kcal/mol}$) in 70% of HIV-1 genomes. Within $\text{ddG} \leq 2.0 \text{ kcal/mol}$, this structure was formed in 80%

of HIV-1 genomes studied. The dimerization competent structure closed by the known U5-AUG duplex contains the subdomain with DIS hairpin locked by the CU/GA-duplex and PBS subdomain. Besides the U5-AUG duplex, we also found other duplexes closing these subdomains.

Based on our findings, we conclude that the intramolecular G-quadruplex formed downstream of GAG start codon can maintain dimerization competent structure of HIV-1 5' terminal region. Actually defining the 3' boundary of this structure, the intramolecular quadruplex formation should be considered to revise structural models of this region. Upon virus maturation, nucleocapsid protein may induce the unfolding of the intramolecular G-quadruplex and stabilize dimeric intermolecular G-quadruplexes (Shen et al., 2011). Dimeric G-quadruplexes can be formed in different regions of HIV-1 genome. They keep two genomic RNA in proximity promoting genetic recombination. Formation of both intramolecular and intermolecular quadruplexes should be considered to study multiple structural rearrangements of the HIV-1 RNA which occur during various stages of virus replication.

КАЛИКС[4]АРЕНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ НА ВЕРХНЕМ КРАЮ «ЧАШИ» ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫЕ ГРУППЫ, СПОСОБНЫ ИНГИБИРОВАТЬ ФУРИН

¹КИБИРЕВ В. К., ²ОСАДЧУК Т. В., ³РОДИК Р. В., ³КАЛЬЧЕНКО В. И.

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;

²Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;

³Институт органической химии НАН Украины, Киев;

e-mail: kibirev@biochem.kiev.ua

Фури́н относится к семейству Ca^{2+} -зависимых сериновых пропротеинконвертаз (ПК), осуществляющих посттрансляционную протеолитическую модификацию первоначально синтезируемых неактивных пропротеинов, превращая их в «зрелые» биологически активные продукты: гормоны, факторы роста и дифференцировки, рецепторы, ионные каналы, энзимы, адгезивные молекулы, факторы свертывания крови и т.д. Помимо выполнения нормальных биологических функций фури́н участвует также в инициации ряда патологических и деструктивных состояний: активации вирусных и бактериальных инфекций, развитии злокачественных новообразований и метастазирования, а также в реализации нейродегенеративных расстройств, диабета и атеросклероза. Поэтому фури́н и другие ПК рассматриваются как перспективные мишени для синтеза соответствующих ингибиторов и создания на их основе современных терапевтических средств и лекарственных препаратов.

Целью работы является дизайн и синтез новых ингибиторов фурина непептидной природы. Реализация данной программы показала, что каликсарены, содержащие на верхнем ободе макроцикла («чаши») группировки с положительным зарядом, способны подавлять активность фурина. Найдено, что в условиях эксперимента (рН 7,25; $t = 37^\circ\text{C}$) наиболее эффективным соединением является каликсарен СХ3im (код соединения), который при концентрации 100 мкМ ингибирует фури́н на 66%. На верхнем ободе он функционализирован положительно заряженными N-метилимидазолиевыми циклами, а на нижнем – пропокси-группами, замена которых на более гидрофобные гексильные радикалы обуславливает падение ингибиторного эффекта до 24%. Наименее активными являются каликсарены С-89 и С-100. У них на верхнем ободе «чаши» отсутствуют заместители с положительным зарядом. Эти производные ингибируют фури́н всего лишь на 18–22%.

Таким образом, впервые показано, что на платформе каликс[4]аренов могут быть созданы новые непептидные ингибиторы фурина.

**ТРНК-АСИСТОВАНЕ РЕДАГУВАННЯ
NVA-ТРНК^{Leu} ЛЕЙЦИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗОЮ
З *Thermus thermophilus***

КОВАЛЕНКО О. П., ГУДЗЕРА О. Й., ТУКАЛО М. А.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: kovalenko.o.380@gmail.com*

Гідроліз помилкових аміноацил-ТРНК є одним із механізмів забезпечення точності трансляції генетичної інформації. Лейцил-ТРНК синтетаза (*LeuRS*) – одна з трьох аміноацил-ТРНК синтетаз I структурного класу, яка містить у своєму складі додатковий редагувальний домен з окремим активним центром, що здійснює такий гідроліз. Результати рентгеноструктурного аналізу комплексу *LeuRS* із *T. thermophilus* з аналогом помилкової норваліл-ТРНК^{Leu} (*Nva*-ТРНК^{Leu}) виявили будову редагувального активного центру і топографію зв'язування субстрату, а також запропонувати участь 3'-ОН групи рибози кінцевого залишку аденозину ТРНК^{Leu} у процесі гідролізу.

З метою з'ясування ролі амінокислотних залишків активного центру було одержано набір мутантних *LeuRS*, в яких кожен з амінокислотних залишків, що за результатами рентгеноструктурного аналізу взаємодіють із субстратом, замінений залишком аланіну. Визначено загальну редагувальну активність мутантних *LeuRS* за накопиченням АМР у присутності норваліну та ТРНК^{Leu} та окремо – швидкість деацилювання *Nva*-ТРНК^{Leu} для кожної мутантної форми ензиму. Також вивчено вплив на активність у редагуванні норваліну *LeuRS* дикого типу в присутності мутантної 3'dA76 ТРНК^{Leu}. Виявлено, що для здійснення ефективного гідролізу *Nva*-ТРНК^{Leu} важливі залишки T247 та D347 ензиму, а також 3'-ОН група залишку A76 ТРНК, які фіксують зв'язок між норваліном та ТРНК у положенні, необхідному для його гідролізу молекулою води. Заміна кожного з цих елементів призводить до зменшення швидкості деацилювання *Nva*-ТРНК^{Leu}: T247 – у 8 разів, 3'-ОН групи залишка A76 ТРНК – у 25 разів, D347 – у 165 разів. Показано високий рівень помилкового аміноацилювання норваліном ТРНК^{Leu}, що відбувається за участю відповідних мутантних *LeuRS* або мутантної 3'dA76 ТРНК^{Leu}. Але жоден із знайдених структурних елементів не здійснює власне каталізу.

Одержані результати вперше для аміноацил-ТРНК синтетаз I структурного класу показали участь 3'-ОН групи кінцевого A76 залишку ТРНК у гідролізі помилкових аміноацил-ТРНК, але виявлення детального механізму цього процесу потребує додаткових досліджень.

МОЛЕКУЛЯРНА ДИНАМІКА І ФУНКЦІЯ АМІНОАЦИЛ-тРНК СИНТЕТАЗ

КОРНЕЛЮК О. І.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

e-mail: kornelyuk@imbg.org.ua

Одним з ключових етапів процесу реалізації генетичної інформації є ензиматичне аміноацилювання тРНК аміноацил-тРНК синтетазами (АРСазами) на дорибосомному етапі біосинтезу протеїну. Взаємна конформаційна адаптація АРСаз та тРНК в процесі впізнавання детермінується їх конформаційною рухливістю, в тому числі рухливістю їх доменів. Для дослідження конформаційної рухливості АРСаз широко використовуються як експериментальні методи дослідження, так і методи комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки (МД), які дають унікальну інформацію про динамічну поведінку протеїнів. Суттєве розширення можливостей моделювання МД протеїнів обумовлене розвитком новітніх комп'ютерних ґрід-технологій. Віртуальна лабораторія MolDynGrid (<http://moldyngrid.org>) створена як складова частина української академічної ґрід-інфраструктури для проведення комп'ютерного моделювання динаміки біологічних макромолекул та їх комплексів.

Тирозил-тРНК синтетаза є мультифункціональним ензимом, який виконує також неканонічні функції в сигнальних системах клітин. Комп'ютерне моделювання молекулярної динаміки *H. sapiens* тирозил-тРНК синтетази в інтервалі 100 нс проведено в ґрід-середовищі Українського національного ґрїду. При дослідженнях молекулярної динаміки *HsTyrRS* виявлено формування елементів вторинної структури у неструктурованому міжмодульному лінкері: антипаралельної β -структури за участі залишків Ala355-Val363 та спіралі Pe364-Arg367, що може модулювати конформаційну рухливість доменів синтетази. Аналіз даних молекулярної динаміки *HsTyrRS* показав, що формування компактної структури і взаємодія С-модулів з каталітичним димером TyrRS є асиметричними. В процесі молекулярної динаміки синтетази також виявлено формування водневих зв'язків між залишком Arg93 цитокінового ELR-мотиву та Ala340 і Glu479 некаталітичного С-модуля, раніше передбачене теоретично. Отримані дані підтверджують гіпотезу про відсутність цитокінової активності у повнорозмірної *HsTyrRS* за механізмом екранування цитокінового ELR-мотиву в компактній структурі ензиму.

Моделювання молекулярної динаміки мутантних форм тирозил-тРНК синтетази, пов'язаних з нейропатією Шарко-Мари-Тус (Gly41Arg, Glu196Lys та del153VKQV156), виявило універсальний механізм утворення нових антипаралельних β -стрендів у неструктурованій СР1-ділянці згортки Росмана, що може приводити до порушення функцій ензиму.

Проведено комп'ютерне моделювання МД тирозил-тРНК синтетази патогенної бактерії *M. tuberculosis* в комплексах з субстратами L-тирозином, АТФ та тирозиладенілатом. Показано формування закритого стану каталітичної KFGKS-петлі в активному центрі в залежності від типу зв'язаного субстрату, що стабілізується динамічним формуванням антипаралельних β -стрендів. Встановлено, що конформаційна рухливість каталітичної петлі синтетази має вирішальне значення для формування ензим-субстратних комплексів і функціональної активності ензиму. На основі даних молекулярної динаміки активного центру *M. tuberculosis* тирозил-тРНК синтетази проведено дизайн нових інгібіторів ензиму, які взаємодіють з каталітичною KFGKS-петлею в активному центрі.

**ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ИЗОФОРМ АКТИНА ЦИТОСКЕЛЕТА
ФИБРОБЛАСТОВ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ
МЕХАНИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИИ И УВЕЛИЧЕНИЯ
КОЛИЧЕСТВА $\alpha 2$ И $\beta 1$ ИНТЕГРИНОВ**

КОТ Ю. Г., КОТ Е. В., КУЛИШ А. С., ОЛЕЙНИЧЕНКО Е. К.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: kot_jurij@inbox.ru*

В работе исследовано изменение спектра изоформ актина фибробластов, культивируемых в условиях их деформации, а также изучено, влияет ли на этот процесс увеличение степени межклеточных контактов, опосредованных $\alpha 2$ и $\beta 1$ интегринными – главными адгезионными рецепторами фибробластов.

Для исследования использовали фибробласты 2-го пассажа из легкого крыс 2-недельного возраста. Для деформации клеток их высевали на эластичную пленку (латекс + 0,1%-ый коллаген + 0,1%-ый гиалуронат). После распластывания клеток (16 час культивирования) подложку моноаксиально удлиняли на 0,1% ее длины. Условия культивирования клеток: ДМЕМ-10% FBS, 37 °С, 95% RH, 5% CO₂. Общее время культивирования при деформации – 6 часов. Исследования изменений в клетках проводили через каждые 60 минут.

За 48 часов до посева на подложку фибробласты обрабатывали TGF- $\beta 1$ (2 нг/мл культуральной среды), являющийся усилителем экспрессии генов $\alpha 2$ и $\beta 1$ интегринов.

Количество $\alpha 2$ и $\beta 1$ интегринов оценивали флуоресцентной микроскопией после обработки клеток наночастицами, конъюгированными с FITC-антителами. Систему актиновых микрофиламентов оценивали в фиксированных фибробластах FITC-конъюгированными антителами на β -актин и TRITC-конъюгированными на α -актин.

Тотальный актин выделяли из снятых с подложки клеток (9×10^6) методом аффинной колоночной хроматографии на DNase-I-агарозе с очисткой элюатов на Sephadex G-50 fine, осаждали ацетоном и лиофилизировали. Лиофилизат использовали для изоэлектрического фокусирования изоформ актина, которое проводили в капиллярах (17×0,15 см) в 10%-ом ПААГ (градиент pH 10–3). Режим разделения: 12 ч – при 300 В и 4 ч – при 600 В. Гели окрашивали кумасси голубым и анализировали в TotalLab 2.01.

Показано, что актин недеформированных фибробластов представлен β - и γ -изоформами. Эти изоформы характерны для немышечных клеток. На 5 час культивирования на электрофореграмме актина деформируемых фибробластов, кроме β - и γ -полос, появляется полоса α -изоформы. Присутствие этой изоформы актина в фибробластах, подвергнутых деформации подтверждается также иммунохимически. Известно, что α -изоформа актина характерна для миобластов.

Выявлено, что предобработка клеток TGF- $\beta 1$ приводит к увеличению количества интегринов $\alpha 2$ и $\beta 1$ на их поверхности. При деформации клеток с более высоким пулом адгезионных рецепторов также наблюдается появление α -изоформы актина, однако в отличие от клеток, не подвергавшихся действию TGF- $\beta 1$, эта изоформа проявляется уже на 2–3 час культивирования. Это, по-видимому, является результатом запуска механизма сигналинга, зависящего от адгезии, в котором количество адгезионных рецепторов на мембране клетки напрямую влияет на эффективность передаваемых внутрь нее механозависимых сигналов.

Фибробласты лёгкого 2-недельных крыс в культуре под воздействием как механического напряжения, так и TGF- $\beta 1$ начинают синтезировать α -изоформу актина, нехарактерную для фибробластов, но специфическую для миобластов. Сочетанное действие обоих внешних факторов увеличивает количество α -изоформы актина в клетках.

**ВЗАЄМОДІЇ АДАПТЕРНИХ ПРОТЕЇНІВ TKS4 ТА TKS5
ІЗ ПРОТЕЇНАМИ-ПАРТНЕРАМИ**

¹КРОПИВКО С. В., ¹КРИКЛИВА В. О., ¹ГРЯЗНОВА Т. А.,
¹ЦИБА Л. О., ²ДРОБОТ Л. Б., ¹РИНДИЧ А. В.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

e-mail: s.v.kropyvko@imbg.org.ua

Адаптерні протеїни родини Tks (Tks4 та Tks5) є одними з головних протеїнів інвадоподій та подосом – актинзбагачених мембранних структур, які забезпечують клітинну міграцію, деградацію міжклітинного матриксу та інвазію клітин. Клітинна інвазія відіграє центральну роль у низці біологічних процесів, зокрема метастазуванні пухлинних клітин. Вивчення ключових компонентів інвадоподій та подосом дозволить у майбутньому краще зрозуміти молекулярні основи канцерогенезу, а також допомогти у виборі стратегій протипухлинної терапії.

Метою цієї роботи є пошук нових партнерів Tks4 та Tks5 шляхом перевірки його взаємодії з потенційними протеїнами-партнерами, а саме: з організаторами актинового цитоскелета: N-WASP та протеїнами родини верпролінів; Ras-подібними GTPазами RhoU та RhoV; фосфоліпазою C гамма (PLCg1) та Src-кіназою, яка, як відомо, фосфорилує Tks4 та Tks5; із протеїнами, залученими до ендо- та екзоцитозу: динаміном 2 (DNM2), амфіфізином 1 (Amph1), олігофреніном 1 (OPHN1), синаптояніном 1 (SYNJ1) та багатофункціональними адаптерними протеїнами родини інтерсектинів (ITSN1 та ITSN2), адаптерними протеїнами Tks4, Tks5, CrkII та Grb2.

Внаслідок проведених експериментів виявлено, що Tks4 взаємодіє із протеїнами ITSN1, ITSN2, CrkII та Grb2. Показано слабку взаємодію Tks4 з регуляторами актинового цитоскелета N-WASP та CR16, але взаємодії Tks4 із двома іншими представниками верпролінів, WIP та WIRE, не виявлено. Також не виявлено взаємодії з регуляторами клітинної міграції RhoU та RhoV. Перевірка взаємодії Tks4 із протеїнами, залученими до ендо- та екзоцитозу показала, що Tks4 зв'язується з DNМ2, OPHN1, Amph1 та SYNJ1. Крім того, було продемонстровано, що SH3-домени Tks4 можуть утворювати комплекси із власними пролінбагатими мотивами та з Tks5, а сам Tks5 взаємодіє з адаптерними протеїнами ITSN1 та ITSN2. Tks4 також взаємодіє з фосфоліпазою PLCg1 та Src-кіназою.

Таким чином, вперше показано, що адаптерний протеїн Tks4 може утворювати комплекси з регуляторами актинового цитоскелета N-WASP та CR16, адаптерами ITSN1, ITSN2, CrkII та Grb2, компонентами ендо- та екзоцитозу DNМ2, OPHN1, Amph1 та SYNJ1, а також із Src-кіназою та фосфоліпазою PLCg1, яка розщеплює фосфатидилінозитолдифосфати (PIP₂) до внутрішньоклітинних месенджерів – діацилгліцеролу та інозитолдифосфату. Продемонстровано, що SH3-домени Tks4 можуть утворювати комплекси із власними пролінбагатими мотивами та з Tks5, що може бути як механізмом регуляції активності цих протеїнів, так і свідченням тісної взаємодії Tks4 та Tks5 за регуляції утворення інвадоподій. Виявлено, що Tks5 взаємодіє з адаптерами ITSN1 та ITSN2.

Одержані дані свідчать про потенційну роль Tks4 та Tks5 в ендо- та екзоцитозі та деградації PIP₂, що раніше не було показано для цієї родини адаптерів, а також вказують на важливу роль Tks4 та Tks5 в реорганізації актинового цитоскелета та участі в передачі клітинних сигналів.

Робота частково виконувалася за рахунок науково-технічного проекту №48/14, реєстраційний номер 0114U00679, «Створення тест-системи для діагностики різних типів пухлин молочної залози людини для персоналізованої терапії».

СТРУКТУРНІ ПЕРЕТВОРЕННЯ В МОЛЕКУЛІ ФІБРИНОГЕНУ В ПРОЦЕСІ ЇЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ У ФІБРИН desA

МАКОГОНЕНКО Є. М., ЛУГОВСЬКОЇ Е. В., КОМІСАРЕНКО С. В.

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

e-mail: ymakogonenko@gmail.com

Фібриноген (Фг) – мультидоменний димерний протеїн, вільно циркулюючий в плазмі крові. Після активації тромбіном Фг перетворюється у фібрин, який полімеризується з утворенням тривимірної сітки фібрину – основи тромбу. Полімеризація фібрину проходить у декілька етапів: відщеплення фібринопептиду А з формуванням фібрину desA, утворення із фібрину desA протофібрил, відщеплення фібринопептиду В і формування фібрилярної сітки згустку. Основні структурні зміни в молекулі Фг відбуваються на першому етапі. Відомо, що відщеплення FpA експонує сайти полімеризації А і С, зумовлює дисоціацію FpA від α C-регіонів і α C-регіонів один від одного, внаслідок чого V β N-домен і α C-регіон залишаються у вигляді тимчасового комплексу, і спричинює перебудову в суперспіральному конекторі молекули фібрину. Роль тимчасового комплексу V β N-домену і α C-регіону в полімеризації фібрину desA не досліджено. Відомо, що X-фрагменти Фг, в яких відщеплено α C-регіони, і Фг з відщепленим пептидом V β 1-42 надзвичайно повільно полімеризуються. Для з'ясування ролі комплексу V β N-домен – α C-регіон в полімеризації Фг ми порівняли вплив D і DD фрагментів на полімеризацію Фг в системі Фг+тромбін і Фг + анцистрон. Знайдено, що обидва фрагменти інгібують полімеризацію в системі Фг + тромбін. В системі Фг + анцистрон D-фрагменти підсилювали, а DD-фрагменти пригнічували полімеризацію Фг. Ці дані дозволяють припустити, що тимчасовий комплекс α C-регіону з V β N-доменом задіяний у самоскладання і латеральної асоціації протофібрил. Він сприяє взаємній орієнтації молекул desA-фібрину і захищає їх олігомери від деполімеризуючої дії Фг. Іншим важливим спостереженням було встановлення факту перебудови суперспірального конектора молекули Фг після відщеплення фібринопептиду А, що призводить до формування в V β 121-135 ділянці Фг неоантигенної детермінанти (NAD) для монАТ І-3с і сайту латеральної асоціації протофібрил. Індуктором структурних змін, можливо, є тромбін-Фг субстратний комплекс. Іони хлору і монАт ІІ-5с, епітоп якого знаходиться в 20-78 ділянці А α -ланцюга, інгібували експозицію NAD. Ми припускаємо, що перебудова в V β 121-135 ділянці Фг після відщеплення FpA збільшує рухливість D-регіону молекули фібрину desA, що забезпечує їй оптимальну орієнтацію під час побудови і латеральної асоціації протофібрил.

ВПЛИВ МЕТИЛУВАННЯ ФАКТОРА ЕЛОНГАЦІЇ 1A НА ЙОГО ВЗАЄМОДІЮ З ПРОТЕЇНАМИ

¹НЕГЕЛЯ А. О., ²ПОРУБЛЬОВА Л. В., ¹НЕГРУЦЬКИЙ Б. С.

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

e-mail: a.negelya@windowslive.com

Метилування лізинових залишків є однією з найпоширеніших посттрансляційних модифікацій протеїнів, що беруть участь у регуляції клітинних процесів. Так, метилування гістонних протеїнів залучене до регуляції транскрипції. Менше відомо про функціональне значення метилування негістонних протеїнів. Серед них – еваріотичний фактор елонгації трансляції 1A (eEF1A). Основна його функція – в забезпеченні зв'язування аміноацил-tРНК із рибосоною. Останнім часом стало відомо, що eEF1A має ще інші, неканонічні функції: взаємодіє із протеїнами цитоскелета і бере участь у його ремодельованні, апоптозі, протеолізі, ядерному експорті, реплікації вірусної РНК та ін. Відомо, що в eEF1A метильовані 36, 55, 79, 165 та 318 залишки лізину. Проте така модифікація не впливає на

взаємодію eEF1A з аміноацил-тРНК чи рибосоною і тому на біосинтез протеїнів. На сьогодні нічого не відомо про функціональне значення метилування eEF1A. Також невідомі специфічні метилтрансферази чи деметилази, що залучені до модифікації eEF1A1. Імовірно, метилування eEF1A може бути задіяним у зміні його функції чи клітинної локалізації. Оскільки всі метильовані лізини залишки експоновані назовні протеїнової глобули, то така зміна функції протеїну може відбуватися за рахунок зміни взаємодії eEF1A з іншими протеїнами.

Тому метою роботи було дослідження впливу метилування однієї з ізоформ eEF1A – eEF1A1 – на його взаємодію із протеїнами в еукаріотичних клітинах. Для цього застосували сайтспрямований мутагенез гена eEF1A1 із заміною залишків лізину в 55- та 79-му положеннях, що метилуються, на залишки аргініну. Протеїн–протеїнові взаємодії eEF1A1 дикого типу та його мутантів K55R і K79R вивчалися за допомогою системи копреципітації протеїнів HaloTag Pull-Down (Promega, США), яка характеризується високою специфічністю та чутливістю.

Клітини MCF-7 були трансфіковані плазмідами, що кодують зшитий з міткою Halo протеїн eEF1A1 та його мутанти K55R і K79R. Після виділення протеїни-партнери eEF1A1 та його мутанти було розділено за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Денситометрія пофарбованого колоїдним кумассі гелю виявила низку протеїнових смуг, інтенсивність яких значно відрізнялася в дикого типу та в мутантах. Протеїни у більшості таких смуг було ідентифіковано за допомогою мас-спектрометрії.

Серед ідентифікованих протеїнів найбільшу групу складають ті, які залучені до трансляції: фактори елонгації трансляції, аміноацил-тРНК-синтетази, рибосомальні протеїни. Крім них виявлено протеїни цитоскелета – актин, тубуліни та шаперони, протеасомні протеїни, субдиниці АТР-синтази, протеїн 14-3-3 та процесингу мРНК. Менш численну групу складають протеїни, що задіяні в апоптозі та метаболізмі: дегідрогенази, протеїни метаболізму жирних кислот, С1 метаболізму та інші.

Показано, що метилування специфічних залишків лізину може мати як негативний, так і позитивний вплив на взаємодію з окремими протеїнами.

ПРИРОДА ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАРОТИНОЇДНИХ ПІГМЕНТІВ ШТАМІВ *Bacillus* sp. 1.1 ТА *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113

НЕЧИПУРЕНКО О. О., ХАРХОТА М. А., АВДЄЄВА Л. В., ЗЕЛЕНА Л. Б.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: ne4upura@gmail.com*

Відомо, що каротиноїдні пігменти синтезуються мікроорганізмами різних систематичних груп, зокрема стрептоміцетами, дріжджами, одноклітинними водоростями. Ці пігменти виконують антиоксидантну, фото- та радіопротекторну функції, є попередниками вітаміну А. Каротинсинтезувальна здатність бактерій роду *Bacillus* описана лише у поодиноких публікаціях. Згідно з даними літератури, каротиноїди цих бактерій представлені переважно у вигляді комплексів із вуглеводами, ліпідами та протеїнами, що значно ускладнює їх виділення та очистку. На сьогодні не існує досконалих методів екстракції, якісного і кількісного аналізу пігментів, не встановлено їх біологічну активність. Вирішення цих проблем дозволить розширити уявлення про каротинсинтезувальну здатність бактерій роду *Bacillus*. З огляду на вищевикладене, метою нашої роботи було встановити природу пігментів із штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113, дослідити їх фізико-хімічні властивості.

Об'єктом дослідження були штами *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 із музею відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, що здатні утворювати пігменти червоного кольору. Культивування бактерій здійснювали на рідкому живильному середовищі такого складу (г/л): цитрат натрію (1,29), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (4,75), KH_2PO_4 (9,6), MgSO_4 (0,18), глюкоза (10), протягом 18–24 год при температурі 37 °С. Екстракцію пігментів прово-

дили шляхом гомогенізації накопиченої біомаси бактерій із додаванням суміші хлороформу та метанолу (2 : 1). Для підтвердження наявності каротиноїдів в екстракті визначали спектри поглинання у видимій області світла на Specord. Далі було проведено ПЛР для виявлення послідовності гену фітоїнсинази (*yisP*). Розділення пігментів проводили з використанням тонкошарової хроматографії. Будову каротиноїдного комплексу визначали за допомогою якісних аналітичних реакцій.

Внаслідок екстракції пігментів із штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 було одержано екстракти жовтогарячого кольору. В одержаних розчинах ідентифікували три максимуми поглинання світла у видимій області, що вказує на наявність подвійних кон'югованих зв'язків у будові пігментів та їх приналежність до каротиноїдів. Визначені $\lambda_{\text{макс}}$ екстрактів із біомаси *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 становили: $\lambda_1 = 384$ нм, $\lambda_2 = 397$ нм, $\lambda_3 = 408$ нм й $\lambda_1 = 385$ нм, $\lambda_2 = 395$ нм, $\lambda_3 = 412$ нм відповідно. Оскільки максимуми поглинання світла пігментів бацил відрізнялися від таких для чистого каротину, ми припустили, що досліджувані бактеріальні каротиноїди представлені комплексом протеїнів та ліпідів, а також можливість наявності в екстракті проміжних продуктів синтезу каротиноїдів. Для підтвердження каротиноїдної природи пігментів підібрано праймери до гену фітоїнсинази (*yisP*), за допомогою яких одержано амплікони молекулярною масою 120 п.н. Далі підібрано оптимальну систему для розділення каротиноїдних пігментів методом ТСХ: розчин хлороформу, метанолу та етилацетату (1 : 1 : 2). Для пігментів штаму *Bacillus* sp. 1.1 Rf становили 0,91, 0,37, 0,3, 0,26, а для штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 0,93, 0,7, 0,4, 0,3, 0,26. Внаслідок обробки пластинок парами йоду, нінгідрином та динітросаліциловою кислотою виявлено яскраво-жовті та червоні смуги, що вказує на ліпопротеїнову будову комплексу.

Таким чином, нами було віднесено пігменти штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 до каротиноїдів, підібрано оптимальну систему для їх розділення та встановлено ліпопротеїнову будову пігментного комплексу.

TRANSLATION ELONGATION FACTOR eEF1A IS A NOVEL PARTNER OF Sgt1

¹NOVOSYLNA O., ²JUREWICZ E., ¹PYDIURA N., ²GORAL A.,
²FILIPEK A., ¹NEGRUTSKII B., ¹EL'SKAYA A.

¹State Key Laboratory on Molecular and Cell Biology, Institute of Molecular Biology
and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland;
e-mail: aleksnova@yahoo.com

Translation elongation factor eEF1A is involved in polypeptide synthesis and many other cellular processes in eukaryotic cells. In particular, eEF1A interacts with viral RNA/proteins and serves as a component of the viral replication machinery. We identified a novel protein partner of eEF1A, Sgt1, which is known to participate in the antiviral defense processes. The interaction between these two proteins is direct as it is observed between the individual proteins in gel-shift assay. The eEF1A-Sgt1 interaction was found also in human cell extract and was observed both between ectopically expressed and endogenous partners. Importantly, the proto-oncogenic eEF1A2 isoform did not demonstrate a capability to bind Sgt1.

Directed mutagenesis showed that domains D2 and D3 of eEF1A and TPR domain of Sgt1 are involved in the interaction. Modeling of the Sgt1-eEF1A complex revealed the geometric correspondence of the eEF1A and Sgt1 surfaces stabilized by a number of salt bridges, and the high level of charge complementarity between the two proteins which is typical also for protein-nucleic acid interaction. *In silico* analysis showed that TPR domain of Sgt1 binds the putative RNA-binding site of eEF1A comprising D2 and D3. Sgt1 did not influence the nucleotide exchange activity of eEF1A produced by D1. A possibility of the Sgt1-eEF1A complex involvement in the regulation of viral replication is discussed.

ОРГАНІЗАЦІЯ ПЕТЕЛЬНИХ ДОМЕНІВ ХРОМАТИНУ ЗА ДАНИМИ КОМЕТНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

СИВОЛОБ А. В., АФАНАСЬЄВА К. С., ЧОПЕЙ М. І.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

e-mail: sivolob@univ.kiev.ua

На вищих рівнях структурної організації хроматин формує петельні домени, які відіграють важливу роль у регуляції транскрипції та інших процесів, але механізми утворення їх залишаються недостатньо зрозумілими.

Ми застосували метод електрофорезу ізольованих клітин (кометного електрофорезу) для дослідження організації петельних доменів у складі нуклеоїдів, одержаних після лізису клітин за допомогою детергентів і високої концентрації солі. Добре відомо, що такі нуклеоїди містять надспіралізовані петлі ДНК. Реєстрація кінетики виходу ДНК із нуклеоїдів під час електрофорезу свідчить, що цей вихід здійснюється в два етапи. У першу чергу здійснюється міграція петель, розташованих на поверхні нуклеоїду, швидкість руху яких не залежить від рівня надспіралізації.

На другому етапі у хвіст комети виходять петлі, розташовані всередині нуклеоїду. Вихід таких петель є затриманим у часі, але стрибкоподібним (кооперативним). Одержані результати свідчать, що швидкість міграції внутрішніх петель залежить від концентрації ДНК всередині нуклеоїду: швидкість міграції підвищується у разі зниження концентрації ДНК під час її виходу у хвіст комети. Крім того, переміщення петель всередині нуклеоїду асоційоване зі змінами в конфігурації петель, що створює залежність швидкості міграції від рівня надспіралізації.

Двом типам петель, зазначеним вище, відповідає не більше 25% всієї ДНК нуклеоїду – більша частина петель нездатна вийти у хвіст комети, оскільки ці петлі є надто великими. Збільшення частки таких великих петель спостерігається за порушення взаємодії основ петель із залишковими протеїнами нуклеоїду – під час застосування денатуруючих агентів або високих концентрацій ДНК-інтеркаляторів. Довжина хвоста комети дозволяє оцінити контурну довжину найдовших петель, що містяться у хвості. Порівняння змін відносної частки ДНК у хвостах і довжини хвостів під час електрофорезу вказує на те, що петельні домени розподілені за їхньою довжиною в дуже широкому діапазоні, причому цей розподіл узгоджується з оберненою пропорційністю частоти петель до їхньої контурної довжини. Таке співвідношення є характеристикою так званої фрактальної глобули – особливого стану полімеру, існування якого було продемонстровано раніше для хроматину на масштабах у кілька мільйонів пар нуклеотидів. Наші результати свідчать, що стан фрактальної глобули виявляється також і на значно менших масштабах – до ста тисяч пар нуклеотидів.

Загалом, одержані результати підтримують уявлення про те, що інтерфазний хроматин поводить себе як довгий полімер у стані фрактальної глобули, де ймовірність тимчасового випадкового контакту між двома точками обернено пропорційна до відстані між ними. Деяка частина таких контактів фіксується за рахунок міжпротеїнових взаємодій. Маленька частина контактів (приблизно 0,1%) залишається зафіксованою в нуклеоїді і після лізису – ймовірно, за рахунок часткової агрегації протеїнів за високої іонної сили. Оскільки такі стабільні петлі передіснували *in vivo*, дослідження їхньої організації у клітинах різних типів може дати важливу інформацію о регуляції генетичної активності на рівні структури хроматину високого порядку.

S6 KINASE 1/2 INTERPLAY WITH ADAPTOR PROTEIN TDRD7*¹SKOROKHOD O., ²GOUT I., ¹FILONENKO V.**¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;**e-mail: fiwinner@ukr.net;**²University Collage Londone, UK;**e-mail: i.gout@biochemistry.ucl.ac.uk*

Family of ribosomal S6 kinases (S6Ks) are important players in cellular PI3K/mTOR signalling network, deregulation of which has been associated with several disorders, including cancer, methabolic sindrom, cardiovascular diseases etc. Yeast two hybrid screening of human cDNA library allowed us to identify a novel binding partner of S6K1 – adapter protein TDRD7 (Trap). TDRD7 is a scaffold protein detected in complexes involved in the regulation of cytoskeleton dynamics, mRNA transport, protein translation, non-coding piRNAs processing. In presented studies we have characterized TDRD7 interaction with S6K1 and its homologue S6K2 in context of possible functional consequences.

First of all, monoclonal antibodies against TDRD7 and S6K2 were obtained and characterized. Using these antibodies we have proved the complexes formation between S6K1/2 and TDRD7 in HEK293 cells. Confocal microscopy studies suggested possible co-localization of S6K1/2 and TDRD7 within perinuclear region of HEK293 and HEPG2 cells and primary culture of rat hippocampal neurons.

Bioinformatical analysis of TDRD7 sequence revealed the presence of several potential phosphorylation sites of S6K1/2 that was further confirmed by *in vitro* kinase assay using different recombinant peptides of TDRD7.

A distinctive feature of TDRD7 is a presence of Tudor domains specialized in the recognition of methylated protein sequences. Indeed using a set of S6K2 C-terminal synthetic peptides with methylated Arg in predicted by bioinformatical analysis sites we demonstrated that S6K2 methylation significantly affects its interactions with TDRD7.

The physiological role of S6K2-TDRD7 complex formation and impact of methylated Arg of S6K2 in this interplay remain to be elucidated in further studies.

**НИКАКОЙ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ИНФОРМАЦИИ, БОЛЬШЕЙ,
ЧЕМ ТА, ЧТО СОДЕРЖИТСЯ В ДНК, ДЛЯ СВРАЧИВАНИЯ
ПРОТЕИНА НЕ ТРЕБУЕТСЯ***СОКОЛИК В. В.**ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», Харьков;**e-mail: Sokolik67@rambler.ru*

Фолдинг протеина причисляют к пулу крупнейших научных проблем современности. Скорость сворачивания протеина *in vivo* объясняют кооперативными эффектами – одновременным формированием «зародышей» вторичной структуры, благодаря чему молекула протеина находит «кратчайший путь» на воображаемой гиперплоскости потенциальной энергии к точке, соответствующей нативной конформации. Как правило, реализуется один из трех сценариев: котрансляционное сворачивание новосинтезированного полипептида без шаперонов, с помощью молекулярных шаперонов или сопряженно с трансмембранной транслокацией. Один из подходов для описания рефолдинга денатурированных протеинов *in vitro* также постулирует, что сворачивание протеина начинается с образования элементов вторичной структуры независимо от третичной или, по крайней мере, до завершения формирования последней. В обоих случаях (*in vivo* и *in vitro*) отправным пунктом успешного фолдинга является формирование первичного каркаса с мотивами вторичной структуры протеина. Эти данные

послужили основанием для предположения о том, что кроме аминокислотной последовательности в генах протеинов закодирована информация об их индивидуальных структурных шаблонах (каркасах) из фрагментов вторичной структуры. Цель исследования состояла в выявлении специфичности кодирования вторичной структуры в генах протеинов эукариот.

Проанализирована случайная выборка из 100 протеинов эукариот, для которых в базе данных PDB представлены схемы вторичной структуры. Для оценки абсолютной и относительной частоты встречаемости кодонов вида XYS/G , XYA и XYT и их кластеров $(XYS/G)_n$, $(XYA)_n$ и $(XYT)_n$, $n \geq 3$, в нуклеотидных последовательностях, детерминирующих спиральные фрагменты, β -тяжи, повороты и неструктурированные мотивы протеинов. Результаты обрабатывали статистически, t -критерий Стьюдента использовали для анализа производных показателей (абсолютная и относительная частота), убедившись в нормальности распределения. P -тест Фишера и четырехпольные таблицы – для выявления статистической зависимости между конформерами и разновидностями кодонов и/или их кластеров. Различие считали статистически значимым при $P \leq 0,05$, тенденция к значимым отличиям при $P \leq 0,10$.

Установлено, что правая спираль кодируется кластерами кодонов $(XYS/G)_n$, $n \geq 3$ ($P = 7,33 \cdot 10^{-22}$, $\xi^2 = 42,62$). Повороты детерминированы кластерами кодонов $(XYA)_n$, $n \geq 3$. Эти данные согласуются с выявленным достоверным превышением относительной частоты встречаемости кластеров $(XYS/G)_n$, $n \geq 3$ и $(XYA)_n$, $n \geq 3$ в областях генов, кодирующих спиральные фрагменты и повороты, соответственно. β -Тяжи менее жестко детерминированы кодонами XYT . Тест Фишера показал кодирование β -тяжей кодонами XYT или их кластерами $(XYT)_n$, $n \geq 3$: $P = 3,63 \cdot 10^{-6}$ ($\xi^2 = 22,05$) и $P = 3,43 \cdot 10^{-2}$ ($\xi^2 = 4,56$) для изучаемого пула протеинов. Обсуждается роль изоакцепторных тРНК с синонимичными кодонами в перекодировании информации третьего нуклеотида кодонов и их кластеров в ходе матричного синтеза протеина. Создана программа «Молекулярный конструктор», которая декодирует нуклеотидную последовательность с созданием pdb-файла и визуализацией индивидуального структурного шаблона протеина в качестве основы для дальнейших исследований методами молекулярной динамики.

В геноме эукариот содержится информация о структуре протеинов.

ТЕРАПЕВТИЧНІ ОЛІГОРИБОНУКЛЕОТИДИ. МЕХАНІЗМ ДІЇ ТА ВИКОРИСТАННЯ В МЕДИЦИНІ

ТКАЧУК З. Ю.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: ztkachuk@bigmir.net*

Відомо, що олігорибонуклеотиди (ОРН) виявляють імуномодулюючу, протизапальну та антивірусну активність проти широкого спектра вірусів як ДНК-, так і РНК-ового походження. Метою роботи було встановити можливий механізм дії та визначити мішені ОРН для подальшого використання в медичній практиці.

Методами ІЧ-Фур'є спектроскопії (ІЧФ), КД-спектроскопії (КД), флуоресцентної спектроскопії (ФС), ЯМР-спектроскопії (ЯМР) та ізотермічної нанокалориметрії (ІНК) вивчали здатність ОРН утворювати комплекси з лігандами, їх взаємодію з широким спектром протеїнів і, в тому числі, з кальційзв'язуючими протеїнами, протеїнкіназами, цитокінами. Методом ПЛР-РЧ вивчали експресію біля тридцяти генів уродженого противірусного імунітету за профілактичної і лікувальної дії препаратів. Досліди проводили на експериментальних моделях імунних, запальних та вірусних захворювань і, в тому числі, на вірусах ГРВІ, герпесу, гепатиту, а також під час клінічних випробувань відповідних захворювань.

Показано, що ОРН виявляють імуномодулюючі та імуносупресивні властивості. Противірусну дію ОРН як в експерименті, так і в клінічних дослідженнях показано на різних групах ДНК- та РНК-

вмісних вірусів і в тому числі щодо вірусів ОРВІ, гепатитів, герпесу 1-го і 2-го типу, вірусу Епштейна–Барра, цитомегаловірусу, ретровірусів та ін.

Перевірено припущення про можливий механізм дії ОРН, який передбачає їх безпосереднє зв'язування із протеїнами клітин, що істотно змінює їх конформацію та призводить до значного модулювання їхньої активності. В першу чергу це показано на протеїнкіназах та Ca^{2+} -зв'язуючих протеїнах. Одержано прямі докази здатності ОРН модулювати активність восьми різних ПК і при цьому зв'язуватись поза їхнім активним центром. Для Ca^{2+} -зв'язуючих протеїнів показано здатність ОРН вірогідно збільшувати рівень зв'язування Ca^{2+} з цими протеїнами та впливати на їхню афінність. За допомогою ІЧФ і КД показано зміни конформацій і вторинних структур кальційзв'язуючих протеїнів і інтерферонів. Методом ЯМР-спектроскопії локалізовано місця зв'язування ОРН, а за допомогою ІНК встановлено енергію цього зв'язування.

Таким чином, олігорибонуклеотиди впливають на конформацію вірусних і клітинних протеїнів та рецепторів, контролюють реплікацію вірусних РНК та гальмують входження і вихід вірусів із клітин. Змінюючи конформацію сигнальних молекул, вони впливають на проліферацію імунних клітин, а регулюючи експресію генів уродженого противірусного імунітету, і, в першу чергу, цитокінів та системи 2-5OAC/РНК-аза L, ОРН контролюють вірусну навантаженість як за профілактики, так і лікування вірусних захворювань. На основі цих досліджень було впроваджено в медичну практику новий противірусний препарат широкого спектра дії «Нуклекс», який виявляє активність проти РНК- і ДНК-вмісних вірусів.

DISSECTION OF TRANSLATION ELONGATION FACTOR EEF1B γ : CREATION OF DELETION MUTANTS TO STUDY ITS INTERACTION WITH PROTEIN PARTNERS *IN VITRO*

TROSIUK T. V., SHALAK V. F.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: chafran@mail.ru*

eEF-1B - nucleotide exchange factor that consists of three subunits α , β and γ , and provides the restoration of active GTP-bound form of eEF-1A which subsequently interacts with aminoacylated tRNA and delivers it to the ribosome. The subunits α and β have catalytic activity as GDP/GTP exchange factors. Subunit γ is a structural subunit of complex. Up to date, the structure of the complex is unknown and the mode of interaction between the subunits is unidentified.

The purpose of this work is to explain how all three subunits interact with each other to form a complex. For that the series of eEF1B γ deletion mutants should be obtained in soluble form. To get all the deletion mutants in soluble form different approaches and expression systems should be employed.

Conservative protein domains in the structures of eEF1B γ subunit were delineated by multiple sequences alignment using ClustalW. The group of mutants was custom designed and included N-terminal deletion mutants – eEF1B γ -del33, eEF1B γ -del92, eEF1B γ -del230, eEF1B γ -del263 (or C-terminal domain) and C-terminal deletion mutants – eEF1B γ 33, eEF1B γ 92, eEF1B γ 163, eEF1B γ 228 (N-terminal domain). N-terminal deletion mutants were cloned into pET28b expression vector (expressed as constructs with C-terminal His-tag) and into pET28a (contained N - terminal His-tag).

As a second approach we considered the creation of deletion mutants fused with two different carrier proteins, namely, maltose binding protein (MBP) and glutathione S-transferase (GST). C-terminal deletion mutants were cloned into pOPINM expression vector (mutant proteins linked to C-end of His-MBP)* and into pGEX6P-1 (mutant proteins linked to C-end of GST).

In result, all N-terminal deletion mutants with C-terminal His-tag were obtained in inclusion bodies despite different conditions applied for their expression. All N-terminal deletion mutants with N-terminal His-tag were expressed as soluble proteins and purified on Ni-NTA column. Superose 6 column was used

to estimate their aggregation state. Only two mutants: eEF1B γ -del228 and eEF1B γ -del263 were suitable for further work. The mutants eEF1B γ -del33 and eEF1B γ -del92 were present as soluble high molecular weight aggregates.

The expression level of C-terminal deletion mutants eEF1B γ 33 and eEF1B γ 228 fused with GST was higher than that of his-MBP-fused. The mutants were obtained in soluble state and purified on glutathione sepharose. Constructs eEF1B γ 92, eEF1B γ 163 with His-MBP-tag also were expressed as soluble proteins. Unfortunately, the proteins eEF1B γ 92 and eEF1B γ 163 were eluted in and close to the void volume of gel-filtration column, so were in aggregate state.

Thus, for the successful expression of the recombinant truncated forms of eEF1B γ the affinity tag should be attached to the N-end of the protein. The mutants His-eEF1B γ -del263, His-eEF1B γ -del228, GST-eEF1B γ 33 and GST-eEF1B γ 230 were expressed in *E. coli* and purified under the conditions mostly preventing the formation of aggregates. All the obtained protein variants will be used for further study on the protein-protein interaction.

* Constructs were obtained at the EMBO Practical Course on High throughput Protein Production and Crystallization 2013.

ВПЛИВ СТРУКТУРИ ІЗАТИНВМІСНИХ 4-ТІАЗОЛІДИНОНІВ НА АНТИНЕОПЛАСТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ЦИХ РЕЧОВИН

^{1,2}ЧУМАК В. В., ²ПАНЧУК Р. Р., ¹МАНЬКО Н. О., ³ГАВРИЛЮК Д. Я.,
³ЛЕСИК Р. Б., ³ЗІМЕНКОВСЬКИЙ Б. С., ^{1,2}СТОЙКА Р. С.

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

²Інститут біології клітини НАН України, Львів;

³Львівський національний медичний університет

імені Данила Галицького, Україна;

e-mail: virachumak@gmail.com

Сполуки на основі 4-тіазолідинону і його ізатинвмісні похідні виявляють широкий спектр біологічної активності і є потенційними антинеопластичними агентами. Показано, що поєднання 4-тіазолідинонів та ізатину (1H-індол-2,3-діон) у складі однієї молекули посилює цитотоксичну дію новосинтезованих сполук на лейкозні й карциномні клітини *in vitro*. Рівень цитотоксичної дії речовин ID-3833, ID-4522, ID-4523, ID-4524, ID-4525, ID-4526, ID-4527 істотно залежить від наявності атома галогену в 5-му положенні індолінового фрагмента, а також від природи цього атома (Cl чи Br) в арильних групах у 3-му і 5-му положеннях піразоліну. Найвищими індексами цитотоксичності характеризуються речовини ID-3833 ($IC_{50} = 1,5\text{--}4,75$ мкМ залежно від клітинної лінії), що зумовлено наявністю атома Br в 5-му положенні індоліну, а також 4-метоксифенільного фрагмента в 5-му положенні піразолінового циклу і нафтильного фрагмента в 3-му положенні піразоліну і ID-4524 ($IC_{50} = 1,5\text{--}4,7$ мкМ), в молекулі якої є 5-бромоіндолін і дві пара-хлорфенільні групи. Речовина ID-4523 теж характеризується наявністю двох *para*-хлорфенільних груп, але, на відміну від ID-4524, 5-хлоріндоліновим фрагментом і має дещо нижчий рівень цитотоксичності ($IC_{50} = 2,8\text{--}4,6$ мкМ). Речовини, які містять *para*-хлорфенільну і *para*-бромфенільну групу, але відрізняються типом атома галогену в індоліновому фрагменті виявляють ще нижчу цитотоксичну активність щодо пухлинних клітин людини: IC_{50} речовини ID-4526 знаходиться у межах 2,42–6,58 мкМ (5-бромоіндолін), а для ID-4527 $IC_{50} = 4,1\text{--}5,24$ мкМ (5-хлороіндолін). Сполуки ID-4522 ($IC_{50} = 60\text{--}70$ мкМ) і ID-4525 ($IC_{50} = 42\text{--}60$ мкМ) містять негалогеновий індоліновий фрагмент й їхній рівень цитотоксичності приблизно у 10 разів є нижчим порівняно з речовинами, де ізатин галогенований.

Наступним етапом роботи було визначення молекулярних механізмів індукції клітинної смерті ізатинвмісними 4-тіазолідинонами. За допомогою флуоресцентної мікроскопії після фарбування клітин DAPI показано, що всі досліджувані речовини індують апоптоз у злоякісних клітинах. Та-

кож проводився Вестерн-блот-аналіз протеїнів, які задіяні в процесі регуляції апоптозу. Клітини лінії Jurkat (Т-лейкоз людини) інкубували з речовиною ID-3833 в концентраціях 1,5 мкМ (IC_{50}) і 4,5 мкМ (IC_{75}) протягом 3, 6, 12 і 24 годин. За концентрації 1,5 мкМ на 24-ту годину відбувається активація ініціаторних каспаз: каспази-9, яка запускає мітохондріальний апоптоз, і каспази-2, яка опосередковує апоптоз через ендоплазматичний ретикулум, а також ефекторних каспаз-3, -7, -6. За концентрації 4,5 мкМ такі самі ефекти речовини спостерігаються вже на 12 год. Тобто речовина ID-3833 індукує апоптоз змішаного типу: мітохондріальний і ЕПР-опосередкований. Цікаво, що ID-3833 не призводить до істотного підвищення рівня АФК в Jurkat Т-клітинах – тільки 6% зростання порівняно з контролем, тоді як за дії ID-4524 спостерігається зростання на 38%, а за дії ID-4526 – на 39%.

Всі ізатинвімісні 4-тіазолідинони індукують апоптоз у злоякісних клітинах. Проте структурні відмінності молекул, а саме наявність і природа атома галогену мають визначальне значення для реалізації протипухлинної активності нових ізатинвімісних 4-тіазолідонів.

СТЕНДОВІ ПОВІДОМЛЕННЯ**ОЧИСТКА, ВЛАСТИВОСТІ ТА ЗАСТОСУВАННЯ
В ГІСТОХІМІЇ ЛЕКТИНУ СВИНУШКИ ТОНКОЇ
(*Paxillus involutus* (Fr.) Fr.)**¹АНТОНЮК Р. В., ¹ЛУЦИК О. Д., ^{1,2}АНТОНЮК В. О.¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;²Інститут біології клітини НАН України, Львів;

e-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua

Справжні гриби можуть служити джерелом одержання цінних лектинів, які завдяки взаємодії з вуглеводними рецепторами біологічних мембран можуть бути використані для виявлення відповідних вуглеводних структур або макромолекул, які їх вміщують. Найбільшу цінність їх являють лектини, які показують високу селективність до вуглеводних рецепторів клітинних мембран. Під час пошуку лектинів нами було виявлено новий лектин в плодкових тілах свинушки тонкої *Paxillus involutus* (Fr.) Fr.), для якого розроблено метод очистки та досліджено його властивості.

Спосіб очистки включав осадження в'язкого полісахариду етанолом, видалення етанолу діалізом, іонообмінну хроматографію на DEAE-Toyorearl та афінну хроматографію на колонці іммобілізованого манозоспецифічного лектину з купини багатоквіткової (*Polygonatum multiflorum*). Вихід лектину ≈ 60 мг/кг сировини. Нами встановлено, що одержаний лектин є глікопротеїном, який містить у своєму складі $6,5 \pm 1,0\%$ вуглеводів, і складається з 4 ідентичних субодиниць по 16 кДа з Мм 64 кДа. Лектин взаємодіє лише з N-ацетиллактозаміном та з глікопротеїнами, що містять його ланки. Водночас структури, в яких до лактозаміну приєднана L-фукоза або D-галактоза з лектином не взаємодіють. Несподіваним виявилось те, що, не дивлячись на відносно добру взаємодію з тиреоглобуліном бика, α -2-макроглобуліном сироватки крові людини та підщелепним муцином, лектин з цими іммобілізованими глікопротеїнами не взаємодіє, тоді як іммобілізовані манозоспецифічні лектини є добрими сорбентами для лектину, що можливе лише за умови глікопротеїнової природи лектину свинушки тонкої і наявності в його вуглеводній частині вуглеводних ланцюгів, які вміщують манозу. Лектин аглютинуює еритроцити собаки, слабше – барана та коня і не аглютинуює еритроцити людини. Досліджено зв'язування лектину свинушки тонкої з гістологічними структурами органів щура. Встановлено, що практично відсутні рецептори лектину свинушки в серці та надниркових залозах. Такі рецептори виявлені в клітинах проток слинних залоз, але відсутні в клітин ацинусів. Вони наявні в ядрах мезагіоцитів та подоцитів ниркових тілець та в епітеліоцитах звивистих каналців. Лектин селективно взаємодіє з клітинами Пуркінє мозочка щура, виражено взаємодіє зі стовпчастими клітинами тонкої кишки та не взаємодіє з келихоподібними клітинами товстої кишки.

Лектин свинушки тонкої на відміну від лектину рицини (*Ricinus communis*, RCA-120) менш інтенсивно зв'язується з клітинами і стромою зернистого і молекулярних шарів мозочка, краще взаємодіє з клітинами протокової системи підщелепної залози, з стовпчастими клітинами та їхньою щіточковою облямівкою тонкої кишки, менш виразно взаємодіє з стромальними елементами ниркових клубочків та гліканами муцинового бар'єра шлунка. Подібність гістологічної картини при фарбуванні міченими лектинами свинушки тонкої та рицини звичайної можна пояснити тим, що для обох лектинів N-ацетиллактозамін є найкращим інгібітором. В той же час ці два лектини істотно відрізняються за вуглеводною специфічністю. RCA-120 добре взаємодіє з трисахаридними структурами, у яких до лактозаміну приєднані D-Gal або Neu5Ac, а також, можливо, інші вуглеводи, з якими лектин свинушки, швидше за все, не взаємодіє. Про це свідчить відсутність взаємодії із групоспецифічними речовинами крові людини та лужною фосфатазою тонкої кишки теляти.

ОСОБЛИВОСТІ РЕАКЦІЇ СУПЕРПРЕЦИПІТАЦІЇ АКТОМІОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСУ СЕРЦЕВОГО ТА СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ

БОГУЦЬКА К. І., ЦИМБАЛЮК О. В.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: biophys@univ.kiev.ua; otsimbal@univ.kiev.ua*

За дослідження м'язового скорочення можна або вивчати властивості окремих протеїнових компонентів м'яза з метою реконструювання з них модельних механохімічних систем, що імітують процес скорочення, або відтворювати структурно-функціональний стан актоміозинового комплексу під час проведення реакції суперпреципітації (СПП). СПП – процес ущільнення агрегатів міозину з нитками актину, який відбувається тільки за наявності таких агрегатів у суспензіях, осадах та гелях актоміозину, під час гідролізу АТР. Реакція СПП надає певне уявлення щодо процесів скорочення-розслаблення м'язів на молекулярному рівні. Необхідними і достатніми умовами для СПП є утворення агрегатів актоміозину та АТР-азна активність протеїну. У разі додавання АТР до суспензії протеїну мутність розчину в багато разів зростає за кілька секунд або хвилин та досягає межі. Після чого утворюються щільні, швидко осідаючі агрегати – відбувається СПП. Абсорбція суспензії актоміозину на початку реакції і після закінчення СПП лінійно залежить від концентрації протеїну (до 0,2 мг/мл). Мірою швидкості СПП є $t_{1/2}$ – напівперіод процесу або час, за який СПП досягає напівмаксимального рівня $1/2 (A_{\max} - A_0)$. В оптимальних для СПП умовах величина $t_{1/2}$, яка є оберненою константою швидкості СПП, не залежить від концентрації протеїну в суспензії в широких межах (0,01–0,3 мг/мл). Залежність $t_{1/2}$ від $1/[АТР]$ лінійна, за виключенням використання досить низьких концентрацій АТР. Це значить, що СПП проходить як реакція першого порядку та її зазнають не взаємодіючі одна з одною структурні одиниці актоміозину або «центри» СПП одного типу під впливом АТР. У присутності ЕГТА або ЕДТА знижується швидкість СПП, а також змінюється кінетика процесу. Суперпреципітація має дві послідовні стадії: утворення центрів росту, або «зародків», та ріст цих центрів. Обидві стадії потребують гідролізу АТР. Перша стадія йде кооперативно (утворені центри росту стимулюють утворення сусідніх) і значно гальмується дією ЕГТА, стаючи лімітуючою. За відсутності ЕГТА зростання центрів йде повільніше першої стадії. Цю другу стадію, яка визначає швидкість СПП, зазвичай і реєструють. Додавання до суспензії актоміозину АТР в концентраціях вище 10^{-5} М приводить до її просвітлення внаслідок часткової або повної дисоціації актоміозину. Після зниження концентрації АТР до деякої граничної величини комплекс відновлюється і починається СПП. Хоча початкове просвітлення і не є обов'язковою стадією всього процесу, проте дисоціація та подальша рекомбінація комплексу в присутності АТР сприяє його початковій перебудові, що є необхідним для СПП. Чим сильніше просвітлення, тим пропорційно вище величина СПП. Крива мутності в часі утворює плато. Чим вище концентрація АТР, тим плато нижче, і відповідно вище величина СПП.

Характеристики кінетичних кривих (A_{∞} , v_0 , v_n , та $t_{1/2}$), що реєструються в ході СПП актоміозину, дозволяють порівняти перебіг СПП за дії різних фізико-хімічних чинників середовища. Так, показано, що протеїн *A* стафілокока змінює кінетику взаємодії актину та міозину таким чином, що в його присутності утворюються менші за розміром агрегати, але зростає швидкість їх утворення. Іони таких металів, як стронцій, кадмій, цинк можуть забезпечувати перебіг реакції СПП актоміозину, але різною мірою відносно контролю, – залежно від присутності певного іона, який спричинює активацію чи пригнічення цього процесу. У присутності багатостінних карбонових нанотрубок (БКНТ) виявлено протилежні ефекти впливу – пришвидшення реакції СПП актоміозину за дії немодифікованих БКНТ та пригнічення СПП за дії залізовмісних БКНТ. Для СПП актоміозину скелетних м'язів порівняно з актоміозином серцевого м'яза характерно найбільші показники ступеня та швидкості реакції, у свою чергу, вони ще можуть дещо залежати від функціонального стану м'яза. Отже, реакцію СПП можна розглядати як певну модель для дослідження особливостей структурної організації та функціональних властивостей актоміозинового комплексу з метою порівняння м'язового скорочення як в нормі, так і при деяких м'язових патологіях.

ЛІПОПОЛІСАХАРИДИ *Pantoea agglomerans*

БУЛИГІНА Т. В., ВАРБАНЕЦЬ Л. Д., ГАРКАВА К. Г.,
БРОВАРСЬКА О. С.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ;
e-mail: tati20@ukr.net

Основним структурним та функціональним компонентом у бактеріальній клітині є мембрана. Специфічними компонентами зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій є ліпополісахариди (ЛПС), які характеризуються поліфункціональністю. Значною мірою це спричинено фізико-хімічними та їхніми біологічними властивостями. Вивчення структури як полісахаридної, так і ліпідної частини молекули ЛПС, допоможе з'ясувати багато властивостей бактеріальної клітинної поверхні, які визначають специфіку взаємодії бактерії з організмом-господарем.

Pantoea agglomerans – грамнегативна бактерія, яка належить до родини *Enterobacteriaceae*, спорідненість якої з типовим родом *Escherichia* складає 25%. Зазвичай це фітопатогенний мікроорганізм, але деякі штами можуть продукувати антибіотичні речовини, які пригнічують ріст фітопатогенних бактерій і грибів. Оскільки ЛПС *P. agglomerans* майже не вивчені, метою роботи було виділити, хімічно ідентифікувати ЛПС, дослідити їхню біологічну активність.

Об'єктами досліджень були сім штамів *P. agglomerans*, ізольованих із різних рослин-хазяїв та різних географічних зон. Із сухої бактеріальної маси *P. agglomerans* ЛПС було виділено водно-фенольною екстракцією, очищено від нуклеїнових кислот шляхом ультрацентрифугування. Хімічна ідентифікація препаратів ЛПС показала, що вони характеризуються різним відносним виходом залежно від штаму. За моносахаридним складом ЛПС досліджуваних штамів *P. agglomerans* відзначалися гетерогенністю. Так, ЛПС *P. agglomerans* 8606 значною мірою відрізняється від ЛПС інших досліджуваних штамів: домінуючим моносахаридом в його складі є маноза (69,8%), присутні також рибоза (15,1%) та ксилоза (12,6%). В той час як вміст рамнози, одного із переважаючих моносахаридів інших досліджуваних ЛПС, становить лише 2,5%. Аналіз жирнокислотного складу показав присутність жирних кислот, які містять у ланцюгу від 12 до 16 атомів вуглецю. Домінуючою в ліпідах А всіх досліджуваних штамів була 3-ОН-С_{14:0}, від 31,7 до 39,1% залежно від штаму, що характерно для представників родини *Enterobacteriaceae*. Виявлені також С_{12:0} (від 8,2 до 31,5%), С_{14:0} (від 12,9 до 30,8%), С_{16:0} (від 3,4 до 16,9%) кислоти. Дуже цікавим виявився той факт, що ліпополісахариди штамів 8488 та 7969 містили в своєму складі ще і 2-ОН-С_{14:0}. За жирнокислотним складом досліджувані штами *P. agglomerans* можна розділити на три групи. Відмінності обумовлені присутністю або відсутністю двох жирних кислот: 2-ОН-С_{14:0} та С_{16:1}.

У серологічних дослідженнях як антигени використовували ЛПС *P. agglomerans*, а як антитіла – О-антисироватки, одержані до клітин досліджуваних штамів. Реакцією подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні встановлено, що всі досліджувані ЛПС в гомологічних системах виявляли активність антигену. За результатами перехресних реакцій виявлено імунохімічну гетерогенність виду *P. agglomerans*. Порівняльне вивчення комплексу показників клітин периферичної крові здорового донора до і після обробки розчинами ЛПС, вказує на те, що майже всі показники не виходять за межі нормальних значень.

ВИВЧЕННЯ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ У СИСТЕМАХ РНК-БАГАТОАТОМНІ СПИРТИ МЕТОДОМ ІЧ-ФУР'Є СПЕКТРОСКОПІЇ

¹*ВІВЧАРИК М. М.*, ¹*ЛЕВЧЕНКО С. М.*, ²*ІЛЬЧЕНКО О. О.*, ¹*ТКАЧУК З. Ю.*

¹*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;*
²*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;*
e-mail: vivcharykmail1@rambler.ru

Відомо, що новий імуномодулюючий лікарський препарат «Нуклеїнат», складається з РНК та лактози. Водночас, противірусний лікарський препарат «Нуклекс» – складається з РНК та манітолу. У попередніх дослідженнях за допомогою біологічних методів було встановлено оптимальне співвідношення між РНК та багатоатомними спиртами, яке забезпечує їхню біологічну активність. Тому головною метою нашої роботи було визначити можливість комплексоутворення в сумішах РНК-багатоатомні спирти.

Для вирішення поставленого завдання було обрано метод ІЧ-спектроскопії, оскільки він є дуже чутливим до структурних змін, які виникають внаслідок міжмолекулярних взаємодій між досліджуваними компонентами. ІЧ-спектри пропускання були виміряні на спектрометрі Nicolet iS50 із роздільною здатністю 4 см⁻¹. Спектр кожного зразка є результатом усереднення одержаних даних після 32 сканувань. Для кількісного аналізу ІЧ-спектрів, зокрема для встановлення кількості та концентрації компонентів суміші, було використано метод хемометричного аналізу. Цей метод базується на трьохкомпонентному MCR-ALS аналізі одержаних ІЧ-Фур'є спектрів. Для розрахунків було використано графічний інтерфейс користувача GUI в програмному пакеті MATLAB.

В ході роботи було отримано ІЧ-спектри сумішей РНК-манітол, РНК-сорбітол та РНК-лактоза в різних концентраційних співвідношеннях. Проведений аналіз експериментальних даних за допомогою методу хемометричної обробки даних показав, що оптимальне співвідношення, тобто те співвідношення, за якого спостерігається максимальне комплексоутворення (близько 100%) в суміші РНК-манітол становить 3 : 1 відповідно. Водночас відсоток комплексу в суміші РНК-сорбітол (стереоізомер манітолу) є набагато нижчим і складає близько 20%. У разі суміші РНК-лактоза відсоток комплексоутворення становить близько 40% за того ж самого концентраційного співвідношення, що й РНК-манітол, тобто 3 : 1.

Раніше також було показано, що окремо компоненти РНК та манітол не виявляють противірусну активність по відношенню до вірусу грипу, тоді як їх бінарна суміш за вагових співвідношень 3 : 1 виявляє максимальну противірусну активність. У подібних співвідношеннях дріжджова РНК та манітол входять до складу комерційного противірусного препарату «Нуклекс». Заміна манітолу на його стеріоізомер – сорбітол у суміші з РНК не приводить до появи противірусної активності. Така активність відсутня і в комерційного препарату «Нуклеїнат», де в суміші з аналогічною дріжджовою РНК використовують лактозу, що надає йому імуномодулюючої активності.

Таким чином, застосування методів ІЧ-спектроскопії та хемометричної обробки даних дає можливість визначити максимальне комплексоутворення в бінарних сумішах РНК із багатоатомними спиртами. Варто зазначити, що одержані результати добре узгоджуються з попередніми даними, які було одержано під час дослідження біологічної активності цих сумішей.

**FLUORESCENCE STUDY OF THE BINDING
OF NOVEL SQUARYLIUM DYES TO FIBRILLAR
AND MONOMERIC LYSOZYME**

¹VUS K. O., ¹TRUSOVA V. M., ¹GORBENKO G. P.,
²DELIGEORGIEV T., ²VASILEV A., ³KINNUNEN P. K. J.

¹V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine;

e-mail: kateryna_vus@yahoo.com;

²University of Sofia, Sofia, Bulgaria;

³Aalto University, Espoo, Finland

Squarylium fluorophores have been successfully employed as laser dyes, photoconductive materials, protein labels, etc., due to their sensitivity to the surrounding media and photostability. The present study was undertaken to evaluate the ability of the novel squarylium dyes (referred to here as G1, G2, G4, G5, G6 and G7) to associate with protein molecules in their native and aggregated state. As a model protein, we have chosen the lysozyme, a hydrolytic enzyme with well-characterized structure. This protein is currently widely employed while elucidating the nature of protein conversion into pathogenic fibrillar aggregates (amyloid fibrils). To obtain lysozyme fibrils *in vitro*, protein solution was incubated at elevated temperature (65 °C) and low pH (1.6) for 20 days. Analysis of the fluorescence titration data yielding the molar fluorescence (a), binding constant (K) and stoichiometry (n) of the dye-protein binding, was performed in terms of the Langmuir adsorption model using the global fitting approach involving the data sets from direct and reverse titration. The Scatchard transforms for all probes appeared to be linear, except for those of G2 and G5 that indicated the presence of two types of lysozyme binding sites: specific ($K \sim 7.1\text{--}25 \mu\text{M}^{-1}$, $n \sim 0.03$ and 0.025) and nonspecific ($K \sim 0.07 \mu\text{M}^{-1}$, $n \sim 1$). The nonspecific sites could characterize G2 and G5 association with the immature nuclei and protofibrils, possessing the solvent exposed hydrophobic patches, while the mature amyloid fibrils were supposed to be of similar morphology due to linear form of the Scatchard plot for amyloid marker Thioflavin T (ThT). Furthermore, the affinities of the squarylium probes and ThT for the mature amyloid assemblies were found to be ca. $1\text{--}25 \mu\text{M}^{-1}$, i.e. 2–4 orders lower than those for the monomeric lysozyme. In turn, the n values for fibril-bound dyes were ca. 0.02–0.03, i.e. 1–2 orders lower compared to those of the monomer-bound probes. The values of the Gibbs free energy of the dye-protein association were found to be ca. $-41 \text{--} -34 \text{ kJ/mol}$. The lengths, widths and heights of the examined fluorophores were estimated to be ca. 16.3–19.6, 7.5–11 and 4.3–5.4 Å (12.9 Å for G1), respectively, being similar to those of ThT: ca. 15, 6.1 and 4.3 Å. This allowed us to assume that squarylium dyes (except of G1) bind to the grooves running parallel to the fibril axis. The theoretically calculated fluorescence response of the dyes (0.1 μM) incorporated into lysozyme amyloid fibrils and monomers (50 μM) revealed that G5, G7 and G6 display up to 30 fold higher fluorescence enhancement and up to 20 fold stronger binding preference to the amyloid assemblies compared to G1, G2 and G4. Furthermore, the detection limit for these probes was ca. 0.2–4 μM of lysozyme amyloid fibrils. In turn, ThT showed the one order higher fluorescence response and binding preference to the presence of lysozyme fibrils, and the ~ 2 order lower detection limit of the protein. This can originate from the higher sensitivity of ThT to solvent viscosity compared to squarylium probes, possessing the sensitivity to solvent polarity as judged from strong shift of emission maximum in the presence of fibrillar lysozyme. In conclusion, G5, G6 and G7 can be employed for *in vitro* detection of the protein amyloid assemblies.

This work was supported by the grant from Fundamental Research State Fund of Ukraine (project number F.54.4/015) and CIMO Fellowship (KV).

**«ЗЕЛЕНИЙ» СИНТЕЗ НАНОЧАСТИНОК БЛАГОРОДНИХ
ТА ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ МЕТАБОЛІТАМИ
НЕКОНВЕНЦІЙНИХ ДРІЖДЖІВ**

¹ГАЙДА Г. З., ¹СТАСЮК Н. Є., ¹КШЕМІНСЬКА Г. П.,
¹СЕРКІЗ Р. Я., ^{1,2}ГОНЧАР М. В.

¹Інститут біології клітини НАН України, Львів;
e-mail: galina.gayda@gmail.com;

²Інститут прикладної біотехнології та фундаментальних наук,
Кольбушова, Польща

Нанотехнології визначені сучасним науковим світом як сукупність прийомів і методів, що застосовуються для створення, вивчення, виробництва наноматеріалів (НМ) – структур, функціональні властивості яких визначаються впорядкованими фрагментами розміром від 1 до 100 нм. НМ є важливими об'єктами досліджень у галузі біології завдяки новим хімічним, фізичним та біологічним властивостям, зокрема унікальним оптичним та електричним характеристикам, а також здатністю до каталізу. Найцікавішою особливістю наносистем є можливість регулювати фізико-хімічні властивості матеріалів, змінюючи розмір і форми частинок на нанорівні, що може привести до зміни характеристик відомих сполук і відкрити нові можливості їх застосування. Проста процедура синтезу НМ та їхня спорідненість до багатьох біологічних молекул, у тому числі, ензимів, робить їх привабливими для використання в сенсорних технологіях.

Альтернативою фізико-хімічним методам одержання наночастинок (НЧ) різної хімічної природи є біологічні «зелені» способи синтезу. Синтез НЧ золота, срібла, селену, платини, кварцу та інших сполук може здійснюватись бактеріями, зокрема актиноміцетами, грибами, дріжджами, вірусами та екстрактами рослин. Головна перевага біологічних систем для одержання НЧ – невисока вартість культивування, короткий час синтезу кінцевого продукту, біологічна безпека процесу, можливість одержання необхідного об'єму продукції без додаткових енергетичних та фінансових витрат.

У попередніх дослідженнях нами виявлено феномен позаклітинної редукції хромату як результат клітинного метаболізму: показано, що різні типи дріжджів – пекарські та неконвенційні здатні детоксикувати хромат шляхом позаклітинної редукції: Cr(VI) → Cr(V) → Cr(III) з утворенням меншою мірою двох форм стабільних Cr(III)-біохелатів. Додатковим підтвердженням визначальної ролі секреторних метаболітів в процесі редукції хромату слугує здатність культуральної рідини дріжджів *P. guilliermondii* самостійно, без участі клітин, відновлювати хромат.

Внаслідок наших досліджень вивчено динаміку позаклітинної редукції оксіаніонів металів (на прикладі хромату та аурату) неконвенційними дріжджами – *Pichia guilliermondii* та *Hansenula polymorpha* залежно від умов їх культивування та умов інкубації. Розроблено способи концентрування, фракціонування та характеристики одержаних НЧ золота та оксиду хрому(III), а також редуктантів у складі позаклітинної рідини з метою встановлення їхньої природи. Дослідження процесів редукції оксіаніонів металів дріжджами є актуальним для розробки технологій одержання нових наноматеріалів та для з'ясування молекулярних механізмів резистентності клітин до дії стресових факторів.

ІНГІБІТОР АГРЕГАЦІЇ ТРОМБОЦИТІВ З ОТРУТИ *Echis multisquamatis*

ГОРНИЦЬКА О. В., КОРОЛЬОВА Д. С., ЧЕРНИШЕНКО В. О.,
ПЛАТОНОВА Т. М., ЛУГОВСЬКОЮ Е. В.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: olgagorn@yandex.ru

Клітинна ланка гемостазу, до якої належать тромбоцити та ендотеліоцити, першою активуються на шляху формування тромбу. Активація, агрегація та дегрануляція тромбоцитів стає потужним поштовхом для лавиноподібної активації каскаду зсідання крові та генерації тромбіну. Активовані тромбоцити разом з утвореною сіткою полімерного фібрину формують тромб. Для попередження патологічного тромбоутворення застосовують препарати антиагрегантної дії, які знайшли широке застосування в медичній практиці. Серед них: відомі інгібітори циклооксигенази, ADP- та GPIIb/IIIa-рецепторів. Джерелом протеїнів-інгібіторів агрегації тромбоцитів можуть бути отрути деяких видів змій, зокрема роду ефі.

Метою роботи стала характеристика низькомолекулярного компонента отрути *Echis multisquamatis* та вивчення механізму його антиагрегантної дії.

Із використанням гельпроникної хроматографії на супердексі G-75 з отрути *Echis multisquamatis* було виділено пептид із молекулярною масою 6 кДа. Для дослідження його впливу на агрегацію тромбоцитів було визначено параметри ADP-індукованої агрегації тромбоцитів та збагаченої тромбоцитами плазми крові (ЗТПК), а також проведено протокову цитометрію для визначення параметрів, які характеризують функціональний стан тромбоцитів (розміру та гранулярності клітин) в присутності досліджуваного пептиду.

Пептид 6-кДа пептид із отрути *Echis multisquamatis* виявився ефективним інгібітором агрегації тромбоцитів. Процес інгібування є концентраційнозалежним, залежність ступеня агрегації тромбоцитів від концентрації дезагрегатора є експоненційний характер, що свідчить про специфічність його дії. Водночас, навіть високі концентрації інгібітору не призводять до повного пригнічення агрегації ЗТПК, яке не перевищує 90%. Значення концентрації напівмаксимального інгібування (IC_{50}) для агрегації тромбоцитів та ЗТПК становить 1,58 та 0,75 μ M відповідно.

Водночас, досліджуваний пептид не впливає на тромбініндуковану активацію тромбоцитів та ADP-індуковану активацію ЗТПК, визначену цитометрично. Це свідчить про те, що протеїн 6-кДа не порушує процеси клітинного сигналіngu, ініційованого активацією тромбоцитів сильними фізіологічними активаторами, такими як ADP та тромбін, натомість діючи на процес безпосередньої взаємодії тромбоцитів в агрегаті.

Методом ELISA показано, що зв'язування тромбоцитів з антитілами до ІІb-субодиниці рецептора GPIIb/IIIa вірогідно знижується за присутності пептиду 6-кДа з отрути *Echis multisquamatis*.

Отже, низькомолекулярний протеїновий компонент, виділений з отрути *Echis multisquamatis*, є специфічним інгібітором агрегації тромбоцитів, механізм дії якого полягає у блокуванні тромбоцитарних рецепторів GPIIb/IIIa та не торкається сигнальних механізмів, які призводять до активації та дегрануляції тромбоцитів. З огляду на це, виділений інгібітор може стати основою для розробки анти-тромботичного препарату спрямованого антиагрегантної дії.

INFLUENCE OF NICKEL ON MICROTUBULE ORGANIZATION IN *Arabidopsis thaliana* ROOT CELLS

HORIUNOVA I. I., YEMETS A. I.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: innagoriunova@yandex.ua*

Plant cytoskeleton orchestrates such fundamental processes in a cell as division, growth and development, cell support, its inner and outer motility, vesicle transport, polymer cross-linking, membrane anchorage, etc. The dynamic instability of some of the cytoskeletal components allows it to be adaptively rearranged in response to environmental stimuli including an increase in the metal content-pollutants in nature. Nickel (Ni^{2+}) is one of the toxic non-essential heavy metals and an environmental pollutant. But Ni in low concentrations fulfills a variety of essential roles in plants. Therefore, Ni^{2+} deficiency produces an array of effects on growth and metabolism of plants, including reduced growth, and induction of senescence, leaf and meristem chlorosis, alterations in nitrogen's metabolism, and reduced iron uptake. In addition, Ni^{2+} is a constituent of several metallo-enzymes such as urease, superoxide dismutase, NiFe hydrogenases, methyl coenzyme M-reductase, carbon monoxide dehydrogenase, acetyl coenzyme-A synthase, hydrogenases, and RNase-A. Therefore, Ni^{2+} deficiencies in plants reduce urease activity, disturb N assimilation, and reduce scavenging of superoxide free radical (Ahmad M. S., Ashraf M. et al., 2011). Influence of Ni^{2+} as an abiotic stress factor on plant microtubules (MTs) were investigated in this study. 4-day-old seedling primary roots of *A. thaliana* (GFP-MAP4) ecotype Landsberg erecta (Ler) expressing GFP-MAP4 (a green fluorescent protein (GFP)-microtubule-associated protein 4 (MAP4) fusion protein) (Mathur and Chua, 2000) was used in this research. The line was grown as describes by us earlier (Yemets et al., 2008). The seedling primary roots were treated with 1, 5, 10 and 20 mM NiSO_4 for 1 (to study the effects on the cytoskeleton), 24, 48, 72 h (to study the effect of cadmium on growth and morphology of roots). It was established that a high concentrations of Ni^{2+} induce inhibition of growth and changes in the morphology of *A. thaliana* (GFP-MAP4) seedlings primary roots after 24, 48, 72 h of NiSO_4 treatment. Root hair development, structure meristematic and epidermal cells of the differentiation zone, root apex and elongation zone, was extremely sensitive to all tested concentrations of Ni^{2+} . The major reason of these changes is a disruption of the organization of the cytoskeleton, in particular MTs which were visualized *in vivo* by confocal laser scanning microscope LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Germany). Significant changes during treatment with 1 mM in MTs organization we did not observe. But, NiSO_4 (5-20 mM) provoked a dose-dependent MTs reorganization ranging from randomization to short depolymerization in epidermal as well as cortex cells of all *A. thaliana* primary root zones immediately after the exposure. Similar changes were observed in the meristematic cells, which is one reason for inhibiting the growth and morphology of *A. thaliana* seedlings primary roots. Thus, we have found that MTs is one of the targets for heavy metal action.

ADAPTOR PROTEIN INTERSECTIN 1 IS ASSOCIATED WITH ACTIN-RELATED PROTEIN WIP IN INVADOPODIA

*GRYAZNOVA T. A., KROPYVKO S. V., GUBAR O. S., BURDYNIUK M. I.,
TSYBA L. O., RYNDITCH A. V.*

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: t.griaznova@gmail.com*

Intersectin 1 (ITSN1) is an evolutionary conserved adaptor protein engaged in endo- and exocytosis, signal transduction and actin cytoskeleton remodeling. It has two main isoforms: the long (ITSN1-L) and the short (ITSN1-S). ITSN1 is associated with several neurodegenerative pathologies and cancer. In particu-

lar, ITSN1-S is involved in migration and invasion of human glioma cells. Human ITSN1-L regulates actin reorganization by specific activation of the small GTPase Cdc42. The process is enhanced by the ITSN1 binding to N-WASP, a Cdc42 effector and an activator of Arp2/3 (actin-related proteins 2 and 3) complex. In cells, N-WASP is associated with its constitutive partner WIP (WASP-interacting protein), which regulates N-WASP stability, location and function. Human WIP is a proline-rich protein that plays an important role in the actin cytoskeleton organization, immune cell function, neuritogenesis and is a key component of invadopodia, actin-rich membrane protrusions with a matrix degradation activity formed in invasive cancer cells. It was previously shown that actin polymerization driven by the interaction between WIP, N-WASP, Cdc42 and Arp2/3 is required for invadopodia formation. We proposed that ITSN1 may be involved in this complex as well as a possible interaction between ITSN1 and WIP may exist, as the proteins took part in the same processes and possess putative interaction motifs. The study of the ITSN1/WIP interaction will contribute to an understanding of the molecular mechanisms of invadopodia formation in metastatic cells.

First, we performed immunoprecipitation assays with mouse brain total protein lysate to show that ITSN1 and WIP form complex *in vivo*. To determine which ITSN1 domains are responsible for binding WIP, we used *in vitro* binding assays with individual ITSN1 GST-fused SH3A, B, C, D, and E domains. In the range of the five ITSN1 SH3 domains, only the SH3A and SH3C domains mediated the interaction with WIP *in vitro*. To confirm that ITSN1 interacts with WIP/N-WASP complex *in vivo*, we performed immunoprecipitation assays. We found that ITSN1/WIP/N-WASP can form triple complexes in cells. Immunofluorescent data have demonstrated the co-localization of ITSN1 and WIP in clathrin-coated pits and regions of active actin remodeling in breast cancer cell line MDA-MB-231. Besides, using an ECM degradation assay, we have shown that endogenous ITSN1 and cortactin (a marker of invadopodia) are localized in invasive protrusions in MDA-MB-231 cells. Moreover, we have found that ITSN1 and WIP are also co-localized in the invadopodia.

We have demonstrated that WIP is a new binding partner for ITSN1 *in vitro* and *in vivo*. Our data suggest that ITSN1 interaction with WIP could play an important role in invadopodia formation and this association influences downstream signaling pathways that are related to invasion and matrix degradation.

ОЛІГОМЕРНА ФОРМА АМІЛОЇДНОГО β -ПЕПТИДУ 1-42 ІНГІБУЄ ЗЛИТТЯ МЕМБРАННИХ СТРУКТУР НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЕЙ

ГУМЕНЮК В. П.

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

Хвороба Альцгеймера виникає внаслідок підвищення кількості амілоїдних β -пептидів (А β) 1-40 та 1-42, що утворюються внаслідок протеолізу APP (amyloid precursor protein) γ -секретазою та взаємодіють із плазматичними мембранами нейронів і спричинюють порушення їх структури. Завданням роботи було дослідити ефекти амілоїдного β -пептиду 1-42 на процес злиття ізольованих із нервових терміналей мембранних структур у модельній системі.

Синаптичні везикули, плазматичні мембрани та протеїни цитозолу синаптосом було одержано із головного мозку щурів. Кальційініційоване злиття синаптичних везикул з плазматичними мембранами синаптосом реєстрували з використанням флуоресцентного зонда R18. Для одержання мономерної форми А β -пептиду 1-42 його розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО). Олігомери А β -пептиду 1-42 одержували після розведення пептиду, що був розчинений в ДМСО, буферним розчином у декілька раз та інкубації протягом 12 год.

А β -пептид 1-42 в концентрації 1 мкМ не змінював кінетики зростання сигналу флуоресценції зонда R18 за злиття синаптичних везикул із плазматичними мембранами синаптосом. Збільшення часу інкубації мономера пептиду в безклітинній системі до 30, 45 та 60 хв не впливає на рівень стимульованого злиття мембранних структур. Отже, ми стверджуємо, що в досліджуваній моделі мономер

пептиду A β 1-42 в концентрації 1 мкМ не спричинює зміни процесу кальційстимульованого злиття мембран. Разом з тим, інкубація олігомерної форми пептиду A β 1-42 з плазматичною мембраною синапсом призводить до зменшення рівня їх кальційзалежного злиття із синаптичними везикулами на 25% порівняно з контролем. Є підстава вважати, що за взаємодії олігомерної форми пептиду A β 1-42 з плазматичною мембраною нервових терміналей порушується процес екзоцитозу нейромедіаторів, що може бути початковим етапом масової втрати функцій нейронів та їх подальшої загибелі.

ВИКОРИСТАННЯ МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *Hansenula polymorpha* ДЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСІВ, ЯКІ ЛЕЖАТЬ В ОСНОВІ СИНУКЛЕЇНОПАТІЙ ЛЮДИНИ

^{1,2}ДЕНЕГА І. О., ^{1,2}СТАСИК О. Г., ¹КЛИМИШИН Н. І., ¹СИБІРНА Н. О.

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

²Інститут біології клітини НАН України, Львів;

e-mail: deneha.ira@gmail.com

Серед нейродегенеративних захворювань хвороба Паркінсона (ХП) займає друге в світі місце за поширеністю після хвороби Альцгеймера. Це захворювання належить до родини синуклеїнопатій, спільною характерною рисою яких є наявність включень в мозку – амілоїдів, основним компонентом яких є нерозчинний протеїн α -синуклеїн. Вважається, що аномальна олігомеризація та агрегація α -синуклеїну є ключовими подіями в патогенезі ХП. (Chen et al., 2009). До можливих причин місфолдингу та агрегації α -синуклеїну можна віднести точкові мутації у відповідному гені, оксидативний стрес, порушення процесів посттрансляційної модифікації, вплив токсичних речовин (пестициди, сполуки марганцю і т.д.) (Emadi et al., 2007; Verina et al., 2012). Останніми дослідженнями показано існування спільних клітинних механізмів, що потенційно пов'язують нейродегенеративні розлади з порушенням функціонування мітохондрій та дефектним метаболізмом глюкози (Sun et al., 2012; Xu et al., 2011). Проте молекулярні механізми цих процесів наразі є слабо вивченими.

У цій роботі ми вперше використали термотолерантні метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha* для створення моделі для дослідження молекулярних механізмів хвороби Паркінсона. Для цього було сконструйовано штами, здатні продукувати людський α -синуклеїн, мічений зеленим флуоресцентним протеїном (GFP). *H. polymorpha* має низку переваг, зокрема, геном цих дріжджів повністю просеквенований, створені штами для гетерологічної продукції протеїнів, а також суттєвою перевагою як моделі ХП є здатність цього мікроорганізму рости при температурах до 45 °С. Це дозволить використовувати температурну панель для з'ясування залежності агрегаційної здатності людського α -синуклеїну від температури. Поєднання надпродукції α -синуклеїну із дефектним транспортом глюкози (у штама із точковою мутацією в гені *GCR1*, що кодує потенційний сенсор/транспортер глюкози *H. polymorpha*) допоможе дати відповідь на питання, про можливий зв'язок між ХП і порушеннями метаболізму цукрів. Раніше нами було показано, що наслідком точкової мутації в гені *GCR1* є порушення транспорту глюкози всередину клітин такого мутанта, порівняно зі штамом дикого типу.

Гетерологічна продукція α -синуклеїну в досліджуваних штамів впливає на їх життєздатність, знижуючи ростові характеристики, порівняно із вихідними штамами, а також штамами, в яких продукується лише зелений флуоресцентний протеїн. Штам дикого типу NCYC495-SNCA, який продукує GFP-мічений α -синуклеїн не утворює видимих α -синуклеїнових амілоїдів, отже, накопичення α -синуклеїну відбувається переважно в олігомерній формі. Натомість для цього штаму характерною є наявність перфорацій у клітинній мембрані та витік цитозолу, ймовірно спричинені здатністю α -синуклеїнових олігомерів зв'язуватись із ліпідними мембранами та пермеабілізувати їх (Waxman et al., 2008).

Для мутантного штаму *gcr1-2-SNCA* з пошкодженим транспортом глюкози характерне посилене утворення агрегатів флуоресцентно-міченого α -синуклеїну на середовищі з глюкозою. Однак таке

прискорене формування амілоїдів, імовірно, є результатом плейотропного ефекту мутації в гені *GCR1*, а не наслідком порушення транспорту глюкози, оскільки також спостерігається в клітинах, вирощених на гліцеролі. Питання про те, які молекулярні механізми впливу мутації в гені *GCR1* на процеси агрегації α -синуклеїну, будуть розглянуті в наших наступних дослідженнях.

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF *MBL1* GENE BY INTERFERON ALPHA

^{1,2}*DRAGUSHCHENKO O.*, ²*BONDARENKO V.*, ¹*TOKOVENKO B.*,
¹*OBOLENSKAYA M. Yu.*

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*ESC "Institute of Biology", Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: olena.imbig@gmail.com*

Interferon alpha (IFN α) is a cytokine with a wide range of activities, but not all of its target genes are still identified. The IFN α target genes are regulated by dominating transcription factor ISGF-3. The genome wide search in rat genome for genes containing ISGF-3 binding sites in their promoters was conducted by conservation-aided transcription factor binding site finder (<http://biomed.org.ua/COTRASIF/> [Tokovenko B. et al., 2009]) and a list of 162 genes was obtained.

The aim of our study was to analyze the list in order to find the new potential target genes of IFN α and if any to experimentally verify this prediction.

The Gene Ontology (GO) enrichment analysis, in particular, FatiGO and IHOP were applied for evaluation of predicted genes. The experimental verification were conducted using two models - the rats in 3 and 6 h after i/m injection of IFN α 2b (1200 U/100 g body mass) and the rats in 18 h after i/p injection of poly(I):poly(C) (25 μ g/100 g body mass). The total RNA was isolated from the liver samples and the nuclear fraction of the liver. The nuclear RNA was subjected to run-on transcription assay with biotin-16-UTP and the labeled transcripts were sedimented with streptavidin-coated magnetic beads. The total and fractionated RNA were reverse transcribed with random hexamer primers and subjected to qPCR in real time using corresponding standard curves.

The GO enrichment analysis has revealed the sole category of immune response (GO:0006955), containing 9 genes and only two of them (*PF-4*, *Mbl1*) were not experimentally confirmed as IFN α targets. *Mbl1*, our gene of current interest, encodes mannose-binding lectin initiating lectin pathway in complement system.

We have shown that in result of both treatments the abundance of *IFN α* and *Mbl1* RNAs in nuclear fraction increased more than two times in comparison with non-treated rats. The newly synthesized nuclear RNA determined in run-on experiment contained *Mbl1* RNA 10 times and *IFN α* RNA 2 times more than in corresponding control samples.

We suggest that IFN α positively regulates transcription of *Mbl1* gene presumably via two ISGF-3 binding sites in the promoter of this gene. The more direct evidences of *Mbl1* gene regulation by IFN α are under investigation.

**ON THE POSSIBILITY OF APPLICATION OF NOVEL
FLUORESCENT SQUARYLIUM DYES IN MODEL
LIPID MEMBRANE STUDIES**

*¹ZHYTNIKIVSKA O. A., ¹TRUSOVA V. M., ¹GORBENKO G. P., ²DELIGEORGIEV T.,
²VASILEV A., ³TULKKI J., ³KINNUNEN P. K. J.*

*¹V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine;
e-mail: olya_zhitniakivska@yahoo.com;
²University of Sofia, Bulgaria;
³Aalto University, Espoo, Finland*

Lipid bilayer is a main element of biological membranes that insures its integrity and controls functions of membrane proteins. Fluorescent probes represent one of the most powerful tools in studying molecular organization and dynamics of lipid bilayer due to their high sensitivity, suitable time resolution and multiplicity of measurable parameters. Among a wide variety of fluorescent dyes currently used in membrane studies squarylium dyes are particularly interesting due to their absorbance and fluorescence in so-called optical window (600–900 nm) where biological macromolecules are spectroscopically silent. To the best of our knowledge, there are only a few reports about the squaraine probe behavior in membrane systems. Squarylium dyes have attracted attention mainly because of their potential applications in photoconductors, photoreceptors, photodynamic therapy, optical recording media, nonlinear optics, and organic solar cells. To fill this gap, the present study was undertaken to evaluate the sensitivity of newly synthesized squarylium dyes, referred to here as G6 and G7, to the changes in physicochemical properties of lipid bilayer.

At the first step of the study the dye partitioning into the model membranes composed of zwitterionic lipid phosphatidylcholine (PC) and its mixtures with anionic lipids cardiolipin (CL), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylserine (PS) and cholesterol (Chol) has been examined. The binding of G6 and G7 to the lipid membranes was followed by significant increase in fluorescence intensity coupled with the long-wavelength shift of emission maximum. Quantitative interpretation of the binding data yielded the dye partition coefficients (K_p). The values of K_p were found to fall in the range $(1.3–4.1) \times 10^5$ and $(0.5–1.9) \times 10^5$ for G6 and G7 respectively, indicating that the examined dyes possess high lipid-associating ability. Comparison of partition coefficients obtained for different model systems allowed us to conclude that membrane association of squarylium dyes is controlled mainly by hydrophobic interactions, because the extent of their bilayer partitioning appeared to be independent of the membrane surface potential, being elevated by varying the content of anionic lipid and ionic strength of the medium. Fluorescence anisotropy measurements showed that G6 and G7 fluorophores are located in the environment whose properties are slightly sensitive to the chemical nature of lipid headgroups and condensing effect of cholesterol, most probably at the polar/nonpolar boundary of a lipid bilayer.

The results obtained suggest that squaraines may prove of usefulness in monitoring the physicochemical properties of the model and natural membranes.

This work was supported by the grant from Fundamental Research State Fund of Ukraine (project number F.54.4/015) and CIMO Fellowship (OZ).

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА CD44 НА МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТОВ, ВОЗНИКАЮЩИЕ В ПРОЦЕССЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ

ЗЕМЛЯНСКИХ Н. Г., БАБИЙЧУК Л. А.

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

Поверхностный маркер CD44 представляет собой трансмембранную адгезионную молекулу, взаимодействующую с гиалуроновой кислотой и другими компонентами внеклеточного матрикса. В эритроцитах CD44 представлен стандартной изоформой и презентует антигены групп крови двух систем: AnWj и In a/b (Lu). В норме эритроциты человека не проявляют адгезивной активности, но вовлечены в развитие патофизиологических процессов, связанных с вазоокклюзивными состояниями при серповидноклеточной анемии, наследственном сфероцитозе и др. заболеваниях. В связи с этим, исследования изменений поверхностных маркерных структур клеточных мембран, вызванных стрессовыми факторами, сопряженными, в частности, с процессами гипотермического (2–5 °С) и низкотемпературного хранения (-196 °С) несомненно важны для оценки структурно-функциональной полноценности мембран и понимания механизмов, ответственных за повреждения клеток в экстремальных условиях.

Цель данной работы – изучить состояние CD44 в эритроцитах, криоконсервированных в присутствии глицерола и полиэтиленгликоля Мм 1500 (ПЭГ-1500), или хранившихся в гипотермических условиях. Объектом исследования служили эритроциты крови доноров. Связывание эритроцитами маркера CD44-FITC оценивали методом проточной цитометрии (FACS Calibur (Becton Dickenson, США)).

Оценка состояния CD44 в размороженных эритроцитах, выполненная после непродолжительной их экспозиции при 37 °С в присутствии криопротекторов, показала, что количество CD44-позитивных клеток уменьшается и снижается уровень экспрессии маркера, несмотря на использование для защиты клеток при низких температурах глицерола и ПЭГ-1500. После удаления криопротекторов из размороженной суспензии количество CD44-позитивных эритроцитов и уровень экспрессии маркера не отличаются от контрольных значений. Данные результаты указывают на то, что снижение презентации поверхностного маркера в криоконсервированных клетках может быть обусловлено популяцией нестабильных клеток с нарушенной структурой, которые удаляются в процессе отмывки. Хранение нативных эритроцитов в течение 14 дней в гипотермических условиях вызывает снижение экспрессии CD44 и количества CD44-позитивных клеток сходные по оценкам с параметрами размороженных клеток. Изменения структурно-функционального состояния эритроцитов под влиянием замораживания-отогрева, ожидаемо развиваются более быстрыми темпами, чем в нативных эритроцитах в гипотермических условиях. Причиной, способствующей потере CD44 может быть везикуляция мембраны, индуцированная изменениями связей в системе надмолекулярных протеиновых комплексов в мембране с участием CD44 и цитоскелета. В эритроцитах CD44 взаимодействует с цитоскелетом через анкирин и протеин полосы 4.1 и данные взаимодействия являются Ca^{2+} и кальмодулинзависимыми. Повышение уровня Ca^{2+} в эритроцитах в процессе гипотермического и низкотемпературного хранения может служить триггером перестроек взаимодействий между протеинами, приводящими к потере поверхностного маркера CD44.

HPLC STUDY OF THE COMPLEXATION OF (THIA)CALIX[4]ARENOPHOSPHONIC ACIDS WITH AMINO ACIDS AND THEIR DERIVATIVES IN SOLUTION

¹KALCHENKO O. I., ¹CHERENOK S. O., ¹RODIK R. V., ²MELY Y.,
¹KHARCHENKO S. G., ¹KALCHENKO V. I.

¹Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua;

²Universite de Strasbourg, UMR CNRS, France

Calix[n]arenes composed of phenolic units linked via methylene groups have been studied as cavity-shaped host molecules able to recognize a wide range of guest molecules. It was shown by HPLC method (thia)calixarenes form supramolecular complexes with amino acids.

Binding constants of (thia)calixarenephosphonic acids complexes with number of amino acids (Gly, Ala, Arg, Asp, Lys, His, Phe, Pro, Tyr, Trp) and N-acetyltryptophan amide (NATA) in solution had been determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) in water-organic solution. Binding constants of the calixarene complexes (1:1) with amino acids were within the region 1500-40000 M⁻¹. Molecular modeling of the calixarene complexes were performed. The factors influencing the calixarene complexation: a) Conformation and hydrophobicity of calixarene-Host cavity; b) Nature and quantity of the substituents at the upper and the lower calixarene rim; c) Nature, size, structure and quantity of the substituents in the Guest molecules. It was established the correlation between K_A of the calixarene complexes and properties of amino acids (Log P, pKa).

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ІОНІВ ФЕРУМУ, ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА N-ЕТИЛМАЛЕЇМІДУ НА Na⁺,K⁺-АТРази МЕМБРАННОЇ ФРАКЦІЇ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ОБОДОВОЇ КИШКИ ЩУРІВ

КАПЛЯ О. А.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kaplya@biochem.kiev.ua

Дослідження функціональної активності Na⁺,K⁺-АТРази під час мембранотропних впливах важливе для з'ясування тканинно-специфічних структурно-функціональних властивостей мембранних комплексів ензиму та особливостей стійкості до дії певних патофізіологічних чинників.

Мета досліджень – проаналізувати концентраційну залежність інгібування убаїном Na⁺,K⁺-АТРазної активності пермеабілізованої дигітоніном мембранної фракції (ПМФ) гладеньких м'язів ободової кишки щурів (ГМОК) для виявлення окремих молекулярних форм ензиму з різною спорідненістю до серцевого глікозиду. Дослідити особливості чутливості Na⁺,K⁺-АТРази ГМОК за впливу проокисних агентів: Fe²⁺, пероксиду водню, N-етилмалеїмиду (NEM).

Вперше встановлено, що дозова залежність інгібування убаїном Na⁺,K⁺-АТРази ПМФ ГМОК щура має двофазний характер, що вказує на наявність двох рецепторних форм ензиму, з помірним вмістом високоафінного до убаїну компонента активності ($K_{i,1} \sim 0,1$ мкМ) та домінуючого компонента активності з низькою спорідненістю до убаїну ($K_{i,2} = 73,08 \pm 9,43$ мкМ, $V_{\max,2} = 80,77 \pm 1,32\%$, $M \pm m$, $n = 5$), що відповідає $\alpha 1$ -ізоформі Na⁺,K⁺-АТРази нирок щура ($K_{i,2} = 70,24 \pm 7,55$ мкМ, $V_{\max,2} = 99,08 \pm 0,91\%$, $M \pm m$, $n = 4$).

Дослідження інгібування Na⁺,K⁺-АТРази ГМОК іонами двовалентного феруму свідчить, що за концентрації Fe²⁺ 0,1 мкМ активність знижується майже на 30%, а в діапазоні 0,1–10 мкМ – до 45% залишкової активності. У порівнянні з ензимом нирок (виключно $\alpha 1$ -ізоформа) чутливість Na⁺,K⁺-АТРази ГМОК до Fe²⁺ вірогідно вища у разі його субмікромолярних концентрацій. Mg²⁺-АТРаза ГМОК

значно резистентніша до дії іонів феруму, ніж нирок (85 і 50% залишкової активності при 10 мкМ FeSO₄ відповідно). Проте для двох тканин, Mg²⁺-АТРазна активність завжди стійкіша порівняно з Na⁺,K⁺-АТРажною активністю. На фоні 1 мМ ЕГТО Na⁺,K⁺-АТРазна і Mg²⁺-АТРазна активність ГМОК однаково малочутливі до дії гідроген пероксиду в концентраціях до 1 мМ. У присутності 20 мкМ феруму в діапазоні H₂O₂ 1 нМ – 1 мМ Na⁺,K⁺-АТРаза інгібується значно більше (до 50% залишкової активності), ніж Mg²⁺-АТРаза (до 80%). Проте ензими з нирок значно чутливіші до дії Fe²⁺ + H₂O₂ порівняно з ГМОК. Так, Na⁺,K⁺-АТРаза нирок інгібується до 25% залишкової активності, а Mg²⁺-АТРаза – до 60%. Na⁺,K⁺-АТРазна активність ГМОК у значно більшому ступені інгібується сульфгідрильним реагентом NEM порівняно з Mg²⁺-АТРажною активністю, що вказує на відмінності у важливості SH-груп для функціонування двох АТР-гідролазних систем. Конформаційна стабілізація Na⁺,K⁺-АТРази за присутності есенціальних лігандів (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, АТР) значною мірою захищає ензим від інгібування NEM.

Таким чином, кінетичний аналіз гетерогенності чутливості Na⁺,K⁺-АТРазної активності до серцевого глікозиду убаїну в мембранних препаратах гладеньких м'язів ободової кишки щура свідчить про можливість існування, щонайменше, двох ізоформ каталітичної субодиниці ензиму: домінуючої конститутивної низькоафінної до кардіоактивних стероїдів α1-ізоформи та додаткової, супутньої, спеціалізованої ізоформи з високою спорідненістю до убаїну.

Незалежно від окисних шляхів ефект інгібування обумовлений тканинними особливостями здатності до окислення мембранних комплексів ензимів. Ефективність інгібування Na⁺,K⁺-АТРази може бути маркером чутливості мембран до окислення, активність Mg²⁺-АТРази стійка до окислення.

ПОЛІКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА, МОНОСПЕЦИФІЧНІ ДО ФРАГМЕНТА ПЛАЗМІНОГЕНУ КРИНГЛУ 5

КАПУСТЯНЕНКО Л. Г.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kapustyanenko@biochem.kiev.ua*

Крингл 5 – один із структурних доменів молекули плазміногену (Пг). Сайт взаємодії з лігандами, розташований в цьому домені відрізняється за специфічністю від сайтів К 1-3 та К 4. Вважають, що крингл 5 взаємодіє з бічними радикалами лізину або аргініну і забезпечує первинний контакт Пг із полімерним фібрином. Встановлено, що він виявляє потужну антиангіогенну дію через специфічне інгібування міграції і проліферації ендотеліоцитів кровоносних судин. Для з'ясування ролі цього домену в міжпротеїнових та міжклітинних взаємодіях Пг, а також для розробки підходів детекції ангіостатинів у біологічному матеріалі завданням роботи було одержати фрагмент Пг людини К5 та поліклональні антитіла (полАТ) до нього.

Пг виділяли із фракції плазми крові людини за Коном III₂,3 на лізин-сефарозі. Фрагменти Пг – крингл 1-3, крингл 4 та міні-Пг отримували обмеженим гідролізом Пг еластазою із наступною гел'фільтрацією на сефадексі G-75 і хроматографією на лізин-сефарозі. Фрагмент К5 одержували обмеженим протеолізом міні-Пг пепсином із подальшою хроматографією на аміногексил-сефарозі. Одержані електрофоретично чисті протеїни застосували надалі для імунохімічних досліджень, К5 – також як ліганд для синтезу афінного сорбенту та антиген для імунізації тварин з метою одержання полАТ.

Імунізацію лабораторних тварин (самців кролів вагою 3–3,5 кг) проводили через введення у шість точок уздовж парахребетної ділянки тварини в шар шкіри 0,5 мг/тварину К5 Пг людини. Твердофазним імуноензимним аналізом (т-ІЕА) сироватки крові імунованих тварин виявлено, що титр індукованих антитіл сягає 1:40500. Із загальної фракції IgG імуноної сироватки крові полАТ проти К5 виділяли хроматографією на синтезованому нами сорбенті із ковалентно пришитим до ВrCN-активованої сефарози фрагментом К5.

Методом т-ІЕА встановлено, що полАТ до К5 реагують із фрагментом плазмінотеніну К5, значно меншою мірою – з міні-Пг, Ліз-Пг та Глу-Пг, фрагментами К1-3 та К4 Пг (послідовно). Константи дисоціації (K_D) полАТ до К5 в реакціях зв'язування із К5, міні-Пг, Ліз-Пг, К1-3, К4 та Глу-Пг у непрямому конкурентному т-ІЕА визначили за методом Friquet із поправкою на бівалентність АТ за Stevens. Їх показники: $3,89 \times 10^{-10}$ М (К5); $5,46 \times 10^{-9}$ М (міні-Пг) та $2,54 \times 10^{-9}$ М (Ліз-Пг) свідчать про високу афінність одержаних полАТ до своїх епітопів у складі фрагмента К5, міні-Пг та Ліз-Пг. Слід зазначити, що в проведеному експерименті в реакціях зв'язування з К1-3, К4 та Глу-Пг полАТ до К5 K_D не визначалися, що свідчить про незначну афінність такої взаємодії. Цей факт дав змогу зробити висновок про моноспецифічність одержаних антитіл до антигену К5.

Таким чином, одержано полАТ до фрагмента К5, моноспецифічні та високоафінні до антигену. Такі антитіла є придатними для створення на їх основі імунохімічних та імуносенсорних методів кількісного визначення ангіостатину К5 у біологічному матеріалі.

ІНГІБУВАННЯ ПРОТЕЇНТИРОЗИНФОСФАТАЗ ПОХІДНИМИ ФУЛЕРЕНІВ

¹КОБЗАР О. Л., ¹ТРУШ В. В., ¹ТАНЧУК В. Ю., ²ЖИЛЕНКОВ А. В.,
²ТРОШИН П. А., ¹ВОВК А. І.

¹Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;

²Інститут проблем хімічної фізики РАН, Чорноголовка;

e-mail: kobzar@bpci.kiev.ua

Фулерени та їх похідні, що являють собою класичні нанорозмірні частинки, широко досліджуються як потенційно біологічно активні молекули. Один із механізмів біоактивності фулеренів включає інгібування терапевтично важливих ензимів і протеїнів. Нами вперше показано, що мішенями такого впливу можуть бути протеїнтирозинфосфатази – ензими, що контролюють ключові стадії багатьох клітинних процесів. Метою цієї роботи була оцінка інгібуючого впливу похідних фулерену C_{60} , таких як полігідроксифулерен та фулерен- C_{60} -піролідин-трис-кислота, на активність протеїнтирозинфосфатаз: РТР1В, SHP2, CD45, ТС-РТР та РТРβ.

Внаслідок досліджень *in vitro* з використанням 4-метилумбеліферилфосфату як штучного субстрату встановлено, що активність протеїнтирозинфосфатаз знижується в області субмікромолярних концентрацій фулеренів. Одержані значення IC_{50} знаходяться в діапазоні від мікромолярних до наномолярних концентрацій інгібіторів. Вплив полігідроксильованого фулерену лише дещо більший порівняно з дією фулерен- C_{60} -піролідин-трис-кислоти. Загалом, досліджені сполуки найкраще інгібують CD45. При цьому вони виявляють незначну селективність стосовно РТР1В і SHP2 та приблизно на один порядок активніші порівняно з ТС-РТР і РТРβ.

Для аналізу механізму зв'язування похідних фулеренів в активному сайті ензиму було використано програму AutoDock 4.2. Як ліганд застосовано фулерен- C_{60} -піролідин-трис-кислоту, а як центроїд – два кристали РТР1В з відкритою і закритою WPD-петлею (PDB коди: 1NL9 і 2CM8). З'ясовано, що відкрита конформація ензиму є прийнятнішою для зв'язування інгібітору. В ході комп'ютерного дослідження з'ясувалося, що найвірогіднішою є модель ензим-інгібіторного комплексу з орієнтацією фулеренового ядра до каталітично важливого Cys215. Згідно з розрахунками, комплекс ензиму з інгібітором стабілізується завдяки взаємодії фулеренового ядра із залишками Tyr46, Lys116, Ala217 та Gln262. Іонізовані карбоксильні групи інгібітору утворюють водневі зв'язки з амінокислотними залишками Arg221, Gln183 і Gln266.

Таким чином, похідні фулеренів можуть бути ефективними інгібіторами протеїнтирозинфосфатаз. Це створює підґрунтя для подальшого пошуку інгібіторів CD45, РТР1В та інших ензимів з метою розробки нових ліків для лікування імунних хвороб, діабету 2-го типу та багатьох інших захворювань.

**GENE EXPRESSION OF THE BIOSYNTHETIC ENZYMES
OF FOLATE-MEDIATED 1-CARBON METABOLISM AND ENZYMES
OF CYSTEINE METABOLISM IN HUMAN PLACENTAS OF THE FIRST
AND THE THIRD TRIMESTERS OF GESTATION**

¹*KORNIEIEVA K.*, ¹*RODRIGUEZ R.*, ²*RALCHENKO S.*,
²*VAKYLENKO A.*, ¹*OBOLENSKAYA M.*

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: kate_romanets@yahoo.com*

The metabolic network of folate-mediated interdependent reactions is responsible for the synthesis of nucleic acids precursors, mitochondrial translation, remethylation of homocysteine to methionine and the maintenance of the balance of methionine and common amino acids participating in this network. The aim of our study was to examine the expression of the genes encoding the enzymes catalysing the synthesis of nucleic acids precursors (*GART*, *ATIC*), methionine (*MTR*) and cysteine metabolism namely catabolism to taurine and synthesis of glutathione (*CDO*, *CSAD* and *GCL*). The object of the study was human placenta from the first and the third trimester of uncomplicated pregnancy.

Gene expression was evaluated by the amount of individual RNAs detected with RT-PCR in real-time using standard curves for absolute quantification of the values.

The analysis of gene expression at mRNA level has revealed that in the first trimester the abundance of examined RNAs is in the range between the minimal values of 7.0 copies per ng of total RNA and the maximal one - 320.0 copies. In the third trimester the corresponding values for all examined RNAs but *CDO* decrease with the rate of changes typical for each RNA. The abundance of both RNAs referring to two sequential steps of purine ring synthesis, *GART* and *ATIC*, substantially differ at both terms of gestation. The level of *ATIC* mRNA is nearly three times higher than that of *GART* mRNA though at term the abundance of both RNAs is three times less than at early gestation. The level of *MTR* RNA is two times more in the first than in the third trimester. It is probably connected with the higher requirements for SAM activity in the first trimester. The similar though low level of *CDO* and *CSAD* RNAs may support the conversion of cysteinesulfinate to hypotaurine in the early gestation while the dramatically disproportional changes of both RNAs at term (the abundance of *CDO* RNA becomes approximately ten times more while the abundance of *CSAD* mRNA is half as much as in the first trimester) would be more favored for changes of *CDO* enzyme preference for substrate, may be for aspartate aminotransferase pathway instead of taurine one. Also, in this study we have observed a decrement of *GCLC* RNA abundance in the third trimester in comparison with the first one. The down-regulated *GCLC* mRNA at term may be partly accounted for the dramatic increase of *CDO* mRNA. The *CDO* and *GCLC* enzymes use the same substrate - cysteine for production of cysteinesulfinate and glutamylcysteine, respectively.

The higher level of mRNAs encoding biosynthetic enzymes (*GART*, *ATIC*, *MTR*) in placenta at early gestation than at term could be explained by the elevated needs of the developing fetus in building materials. We hypothesize that the difference at RNA level between *CDO* and *GCLC* might predetermine the difference in the main metabolic pathways of cysteine metabolism at the early and late gestation.

ВИЯВЛЕННЯ ПРЕТРОМБІНУ 1 *IN VIVO* ТА ЙОГО РОЛЬ У ПРОЦЕСІ ЗСІДАННЯ КРОВІ

*КОРОЛЬОВА Д. С., ЧЕРНИШЕНКО В. О., ЧЕРНИШЕНКО Т. М.,
ПЛАТОНОВА Т. М.*

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

Однією з центральних реакцій плазмового гемостазу є активація протромбіну – попередника центрального регуляторного ензиму системи гемостазу тромбіну. В модельних системах показано, що за появи тромбіну в плазмі крові можливе накопичення претромбіну 1 – молекули, яка утворюється внаслідок розщеплення протромбіну тромбіном. Претромбін 1 не містить активного центру і не перетворюється в активний тромбін протромбіназним комплексом. Однак перетворення протромбіну в претромбін 1 супроводжується появою в його молекулі екзосайту I, який відповідає за взаємодію зі спектром протеїнів, зокрема з GРІbІІІа-рецептором тромбоцитів.

Тому метою роботи стало виявлення претромбіну 1 у плазмі крові за низки патологій, які супроводжуються активацією системи зсідання крові, та встановлення його можливої ролі у функціонуванні тромбоцитарної ланки гемостазу.

Проаналізовано стан системи зсідання крові пацієнтів з анеризмою черевної аорти (група 1, $n = 7$), ендопротезуванням кульшового суглобу (група 2, $n = 43$), інсультом головного мозку (група 3, $n = 22$) та групи хворих із серцево-судинними захворюваннями, яким проводили терапію антикоагулянтами непрямої дії (АНД) (група 4, $n = 6$).

За допомогою екамулінового та протромбінового тестів у 39% хворих виявлено значне зменшення функціонально активного протромбіну в плазмі крові та пригнічення роботи системи зсідання в тесті АЧТЧ (активованій частковий тромбопластиновий час) з використанням хромогенного субстрату тромбіну. Причиною цього може бути як перетворення частини протромбіну у претромбін 1, так і поява в кровотоці декарбоксильованих факторів зсідання крові (II, VII, IX, X).

Для виявлення причин встановленого нами порушення роботи системи зсідання крові було проведено модифіковану інгібіторно-корекційну пробу в тесті АЧТЧ. Показано, що внесення в плазму крові частини пацієнтів протромбіну людини (в кількості 2 мкг/мл) не приводить до нормалізації показників тесту АЧТЧ. Це свідчить про порушення роботи каскаду зсідання крові внаслідок появи декарбоксильованих факторів зсідання крові. До цієї групи увійшли п'ять із шести хворих, яким проводили терапію АНД, безпосередньо спрямовану на появу декарбоксильованих факторів зсідання крові.

Внесення протромбіну в плазму крові пацієнтів 2-ої групи сприяє нормалізації показників тесту АЧТЧ. Це свідчить про дефіцит протромбіну та відсутність декарбоксильованих факторів зсідання, зокрема декарбоксильованого протромбіну. Дефіцит протромбіну може бути результатом перетворення його на претромбін 1.

Методом вестерн-блот-аналізу з використанням поліклональних антитіл специфічних до протромбіну, виявлено претромбін 1 у плазмі крові пацієнтів 2-ої групи, але не 1-ої.

В модельних системах було показано, що претромбін 1 в субмікромолярних концентраціях не активує і не спричинює агрегацію тромбоцитів, але істотно пригнічує колаген-, ADP-, адреналініндуковану агрегацію тромбоцитів.

Отже, вперше безпосередньо показано, що претромбін 1 з'являється *in vivo* в кровотоці за активації системи зсідання крові, і це може бути зафіксовано за комплексного дослідження стану системи гемостазу тестами лабораторної діагностики. Можна дійти висновку, що претромбін 1 здійснює негативну зворотну регуляцію як плазменного, так і тромбоцитарного гемостазу.

**ВПЛИВ НОВИХ ПОХІДНИХ АКРИДИНУ НА АКТИВНІСТЬ
ТОПОІЗОМЕРАЗИ І В СИСТЕМІ РЕЛАКСАЦІЇ ДНК *IN VITRO***

¹КОСТИНА В. Г., ²МИХАЙЛЮК В. В., ¹НЕГРУЦЬКА В. В.,
¹ЛИСЕНКО Н. А., ¹ДУБЕЙ І. Я.

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: dubey@imbg.org.ua

Топоізомерази є життєво необхідними для клітини ензимами системи біосинтезу нуклеїнових кислот, основною функцією яких є релаксація суперспіралізованої ДНК в процесі її реплікації та репарації. Тому топоізомерази стали важливими мішенями для протипухлинних, протимікробних і противірусних препаратів. Протягом останніх двох десятиліть було досліджено вплив сотень різноманітних сполук на enzymaticну активність топоізомераз. Сьогодні численні інгібітори enzymів цієї родини використовуються для лікування онкологічних та інфекційних захворювань. Виходячи з цього, пошук нових ефективних інгібіторів топоізомераз і вивчення їхньої біологічної активності й молекулярних механізмів дії, зокрема взаємодії сполук з ДНК та enzymaticним комплексом, важливі як з теоретичного, так і практичного погляду.

Нами одержано серію нових похідних акридину, що містять приєднані через алкільні лінкери основні фрагменти як потенційних інгібіторів топоізомерази І (Топо І). Структури сполук було сконструйовано на основі таких міркувань: усі вони містять трициклічне гетероароматичне ядро, для якого характерні хороші інтеркаляційні властивості. Оскільки незаміщений акридин практично не інгібує процес релаксації ДНК за участю Топо І, в його ядро ввели групи, здатні забезпечити додаткові взаємодії лігандів із ДНК і enzymом. Досліджувані сполуки містили замісники з піридилними, N,N-диметиламіноалкільними, морфоліновими та піперазиновими фрагментами. Ці основні групи за фізіологічних умов протонуються і здатні утворювати іонні зв'язки з фосфатним остовом ДНК та взаємодіяти із залишками деяких амінокислот в активному центрі enzymу.

З метою оцінки інгібуючої дії та дослідження взаємозв'язку структури й активності в ряду синтезованих сполук було проведено їх тестування в модельній системі релаксації суперспіралізованої ДНК плазмиди pBR322 топоізомеразою І *in vitro*. У процесі enzymaticної реакції суперспіралізована ДНК переходить у релаксовану форму, яка добре відділяється від вихідної під час електрофорезу в агарозному гелі. Інгібувальна здатність препаратів відображається в зменшенні кількості продуктів релаксації ДНК enzymом порівняно з контрольною реакцією за відсутності інгібітору, в якій утворюється повністю релаксована форма ДНК.

Досліджено активність серії із 17 похідних акридину. Серед них виявлено 6 сполук, що інгібують процес релаксації ДНК у низьких мікромолярних концентраціях ($IC_{50} < 15$ мкМ), причому їхня активність має концентраційну залежність. Найактивнішими є препарати D6 та D12, для яких IC_{50} становить відповідно 2,5 та 3,1 мкМ. Проведено аналіз залежності «структура–активність» в ряду досліджених сполук. Визначено структурні елементи (тип замісника, довжина лінкера тощо), які забезпечують високу активність сполук як інгібіторів Топо І. При цьому активні інгібітори містять по 2 замісники основного характеру.

Роботу виконано за підтримки програми НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва» (грант 11-14).

ХАРАКТЕР РОСТУ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ ВЕНИ ЛЮДИНИ НА ПОКРИТТЯХ ІЗ ФІБРИНУ desAB, desA ТА desAB β (15-42)

^{1,3}КУЧМА М. Д., ¹ЧЕРНИШЕНКО В. О., ¹ШАБЛІЙ В. А.,
⁴КИРИК В. М., ²ЧЕРНИШЕНКО Т. М., ¹ЛОБИНЦЕВ Д. В.,
¹ЛОБИНЦЕВА Г. С., ²ПЛАТОНОВА Т. М., ²ЛУГОВСЬКОЇ Е. В.

¹Інститут клітинної терапії, Київ, Україна;

²Інститут біохімії ім. О. В. Паллдіна НАН України, Київ;

³Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;

⁴ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна;
e-mail: k.maria@ua.fm

Функціональні сайти В β N-домену фібриногену та фібрину безпосередньо взаємодіють із рецепторами ендотеліоцитів: VE-кадгерином та VLDLP-рецептором (Yakovlev, 2012). Показано проліферацію ендотеліальних клітин і фібробластів на плівці з фібрину desAB та стимуляцію ним капіляроутворення в культурі ендотелію (Spon, 1995). Метою нашої роботи було вивчення проліферації ендотеліоцитів пуповинної вени людини (HUVES) на фібринових підложках та впливу В β N-домену фібрину на цей процес за кількарязового пасажування клітин.

Було одержано три форми мономерного фібрину: фібрин desAB (α 17-610; В β 15-461; γ 1-411), який одержували дією на фібриноген тромбіну, фібрин desA (α 17-610; В β 1-461; γ 1-411), одержаний за дії тромбінподібного ензиму анциструну; фібрин desAB β (15-42) (α 17-610; В β 43-461; γ 1-411) за паралельної дії на фібриноген тромбіну і фібриногенази з отрути *Echis multisquamatis*.

Поверхню чашки для культивування вкривали фібрином із розрахунку 35 мг/см². Як контроль клітини вирощували в чашках Петрі з необробленого пластику, вкритих колагеном I типу. Ендотеліальні клітини виділяли з пуповини, яку отримували після народження дитини зі згоди проінформованих жінок. Для імунофенотипування використовували моноклональні антитіла, мічені флуорохромом (Becton Dickinson, США): anti-CD34 APC, anti-CD90 FITC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD105 PerCP-Cy 5.5, anti-CD73 PE, anti-CD31 PE. Аналіз проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми FACSDiva 6.1.2. Імунофенотиповий аналіз HUVES показав, що клітини, які росли на чашках, вкритих усіма типами фібринів та контрольних на 6-му пасажі мали фенотип CD31+CD105+CD73+CD90-CD34-CD45-.

Для характеристики культур клітин обчислювали час генерації. Подовження часу генерації вказує на уповільнення проліферативної активності клітин у культурі.

Показано, що час генерації за культивування на фібринах desA та desAB був стабільним протягом усього дослідження і становив $1,68 \pm 0,33$ та $1,76 \pm 0,42$ відповідно. Для порівняння, час генерації у разі культивування на стандартних підложках – культуральному пластику та колагені – становив на всіх етапах дослідження $1,79 \pm 0,28$ і $2,02 \pm 0,47$ відповідно. Водночас, за культивування на фібрині desAB β (15-42) спостерігали зростання значень часу генерації з кожним наступним пасажуванням: від $1,76 \pm 0,8$ на початкових пасажах до $3,85 \pm 0,1$ на 6-му та 7-му. Мікроскопічні дослідження показують, що клітини, культивовані на фібрині desAB та desA схильні до утворення моношару, водночас на фібрині desAB β (15-42) спостерігали розрізнені клітини та поодинокі групи клітин.

Таким чином, відсутність послідовностей В β (15-42) у фібрині desAB β (15-42) призводить до зниження проліферативної активності клітин, культивованих на такому фібрині. Показано, що спорідненість різних форм фібрину до ендотеліальних клітин на ранніх пасажах істотно не відрізняється, однак за подальшого пасажування придатнішим покриттям є фібрин desA та desAB. Це свідчить про те, що взаємодія ендотеліоцитів з В β (15-42) грає суттєву роль в механізмі їхньої проліферації. При цьому, відщеплення фібринопептиду В, всупереч даним (Bunce, 1992), не є критичним для цих взаємодій в умовах тривалого пасажування клітин.

Одержані дані про вплив домену фібрину В β (15-42) на процес проліферації ендотеліоцитів важливі для вивчення механізмів васкуляризації та атерогенезу.

**ВЗАЄМОДІЯ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-99 З МІОЗИНОМ
ТА АКТИНОМ В МІОЦИТАХ МАТКИ ЩУРА***ЛАБИНЦЕВА Р. Д., БЕВЗА А. А.**Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;**e-mail: labyntseva@biochem.kiev.ua*

Порушення скоротливої функції гладенького м'яза матки в жінок часто стає причиною різноманітних патологій: слабкості пологової діяльності, передчасних пологів, викиднів тощо. У зв'язку з цим виникає потреба в розробленні ефективних методів корекції порушень скоротливої активності міометрія, зокрема в проведенні досліджень, спрямованих на створення та вивчення закономірностей дії нових фармакологічних високоєфективних сполук, здатних нормалізувати контрактильну функцію матки. Перспективними в цьому плані є каліксарени. Це чашоподібні макроциклічні (поліфенольні) сполуки, функціоналізовані за верхнім та нижнім вінцями макроциклічного остова. Вони здатні проникати в клітину та впливати на перебіг багатьох біохімічних процесів. Раніше в досліджах *in vitro* нами було виявлено, що калікс[4]арен С-99 (5,17-біс(дигідроксифосфонілметилол)-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) інгібує біохімічний процес, який є найважливішим елементом молекулярного механізму скорочення міометрія – АТРазну реакцію, що каталізується актоміозином та субфрагментом-1 міозину матки свині.

Встановлено, що АТРазна активність міозину, одержаного з міоцитів матки щура, попередньо інкубованих з 100 мкМ калікс[4]ареном С-99, майже на 50% нижче порівняно з міозином контрольних клітин; це може свідчити про проникнення каліксарену С-99 до міоцитів матки та його взаємодію зі скоротливими протеїнами. Для перевірки припущення щодо взаємодії калікс[4]арену С-99 зі скоротливим комплексом нативних клітин матки, ми візуалізували за допомогою FITC-мічених моноклональних антитіл розташування міозину II та гладеньком'язового α -актину в контрольних (без каліксарену) та дослідних (попередньо інкубованих із калікс[4]ареном С-99) клітинах матки та аналізували локалізацію міозину і актину за допомогою конфокальної мікроскопії. Міозин II в контрольних клітинах розташований поблизу плазматичної мембрани клітини, що узгоджується з даними літератури. За порівняння конфокальних знімків контрольних та дослідних міоцитів було виявлено відмінності у структурованості міозину в міоцитах матки. У дослідних клітинах міозин розташований дискретніше, на відміну від клітин без додавання калікс[4]арену С-99, в яких забарвлений міозин має вигляд більш цілісної структури. За інкубації міоцитів міометрія з калікс[4]ареном С-99 спостерігається також втрата цілісності актинових волокон. У контрольних клітинах, які не були інкубовані з калікс[4]ареном С-99, на конфокальних знімках добре помітні актинові філаменти, розташовані в міоцитах переважно поздовжньо. У дослідних клітинах, які були інкубовані з калікс[4]ареном у концентрації 25 мкМ, помітна часткова втрата філаментної структури актину та поява його дисперсного забарвлення. У разі підвищення концентрації калікс[4]арену С-99 до 100 мкМ спостерігається практично повна релокалізація актину, а саме, повна втрата актинових філаментів та дифузне (дискретне) його забарвлення. Можна припустити, що синхронність у зміні локалізації актину та міозину в міоцитах матки за дії калікс[4]арену С-99 є наслідком асоціації та скоординованої роботи двох скоротливих протеїнів (міозину та актину) в м'язових клітинах.

Одержані експериментальні дані свідчать на користь проникнення калікс[4]арену С-99 всередину нативних клітин матки та його взаємодії з міозином і актином. Вони можуть бути використані для досліджень, спрямованих на створення нових фармакологічних препаратів, здатних нормалізувати скоротливу функцію матки за патологічних станів.

Автори вдячні співробітникам Інституту органічної хімії НАН України член-кор. НАН України В. І. Кальченку та канд. хім.наук С. О. Черенку за наданий калікс[4]арен С-99.

СИНТЕЗ ФІТОГОРМОНІВ-ІНГІБІТОРІВ СИМБІОТИЧНИМИ ТА ПАТОГЕННИМИ ДЛЯ СОЇ БАКТЕРІЯМИ

ЛЕОНОВА Н. О., ДАНКЕВИЧ Л. А., ДРАГОВОЗ І. В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: ldankevich@ukr.net

Мікробно-рослинні взаємодії регулюються сигнальними молекулами різної хімічної природи, зокрема фітогормонами. Здатність до синтезу фітогормонів властива не тільки рослинам, а й широкому спектру фізіологічних груп мікроорганізмів, серед яких переважають саме ті, що є асоційованими з рослинами. Відомо, що ці мікроорганізми синтезують фітогормони стимулювальної дії, до яких належать ауксини, цитокиніни та гібереліни. Проте синтез фітогормональних сполук з інгібувальною дією та їх роль у регуляції мікробно-рослинних взаємовідносин практично не досліджена. Так, відомо, що для фітопатогенних бактерій синтез окремих класів гормонів-інгібіторів є додатковим, а в окремих випадках – ключовим фактором їхньої патогенності. Водночас, синтез абсцизової кислоти (АБК) та етилену симбіотичними бактеріями вивчено недостатньо, а фізіологічне значення такого синтезу є дискусійним.

Тому метою наших досліджень був порівняльний аналіз синтезу позаклітинних фітогормонів-інгібіторів різними за ефективністю симбіотичними бактеріями сої *Bradyrhizobium japonicum* та патогенними для даної культури моно- і поліфагами родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas* і *Pantoea*. Об'єктами досліджень були високоефективні і неефективні штами ризобій сої *B. japonicum* із колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології ІМВ НАН України та високо- і середньоагресивні штами фітопатогенних бактерій сої видів: *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. agglomerans*, *X. axonopodis* pv. *glycines* і *P. savastanoi* pv. *glycinea* з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України.

Показано, що синтез АБК симбіотичними бактеріями сої є штамовою особливістю і не пов'язаний з їхньою нітрогеназною активністю в симбіозі, а прямо корелює з високою вірулентністю штамів і здатністю формувати на коренях рослин велику кількість бульбочок. Згідно з даними літератури, цей факт може свідчити, що в різних штамів ризобій АБК може як збільшувати, так і, навпаки, зменшувати активність нітрогеназного комплексу, а відтак знижувати ефективність симбіотичної азотфіксації. Водночас, здатність ризобій синтезувати АБК є додатковим чинником, що визначає їх потенціал в інфікуванні рослин. Так, показано, що АБК може нівелювати токсичну дію рістстимулювальних речовин і є антагоністом певних класів фітогормонів. У фітопатогенних бактерій рівень синтезу АБК також прямо корелює з їхньою агресивністю. Зокрема, штами, що вражають широке коло рослин, продукують у 8,7 рази більшу кількість АБК порівняно зі штамми, що спричиняють захворювання виключно сої.

Встановлено, що симбіотичні бактерії сої *B. japonicum* синтезують газоподібний фітогормон-інгібітор етилен у невеликій кількості. Прямої залежності між рівнем синтезу цього гормону і нітрогеназною активністю штамів у симбіозі ми не спостерігали. Згідно з даними літератури, відносно невисокий пул етилену в рослині важливо для ризобій, оскільки цей гормон істотно пригнічує процес нодуляції. Цим, імовірно, і пояснюється невисокий рівень синтезу етилену всіма дослідженими штамми *B. japonicum*. Подібно до характеру синтезу етилену симбіонтами сої, особливості синтезу цього гормону патогенними для сої бактеріями також штам- та видоспецифічні. Але фітопатогенні бактерії синтезують етилен у порівняно більшій кількості, ніж ризобії, що можна розглядати як додатковий фактор їхньої патогенності. Таким чином, синтез фітогормонів – інгібіторів росту і розвитку рослин як симбіотичними, так і патогенними бактеріями сої безпосередньо пов'язаний з особливостями їх взаємодії з рослиною.

ВПЛИВ ДИКАРБОКСИЛАТІВ ДИРЕНІЮ НА СТРУКТУРУ ТА АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ

ЛЕУС І. В., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет
імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: ingaleus@mail.ru*

У сучасних роботах, присвячених біохімії редокс-системи клітини і організму підкреслюється, що антиоксидантні властивості протипухлинних препаратів можуть відігравати вирішальну роль у кореляції патологічних станів (Bruijninx & Sadler, 2008; Novo & Parola, 2008; Wondrak, 2009; Zhang & Lippard, 2003). Сполуки ренію мають біядерний кластерний центр $Re\equiv Re$ зі зв'язком метал-метал, який є унікальним реакційним центром з окисно-відновними і координаційними властивостями (Shtemenko, 2009). Активність супероксиддисмутази (СОД) є важливою ланкою антиоксидантного захисту організму у разі патологій, у тому числі й за онкогенезу. Отже, актуальним є дослідження зміни активності СОД в крові щурів за розвитку карциноми Герена та проведенні протипухлинної терапії сполуками ренію, а також з'ясування можливості СОД-подібної активності в сполук ренію, або їхнього безпосереднього впливу на активність ензиму в експериментах *in vitro*.

Дослідження *in vivo* проводили на білих щурах із трансплантованою карциномою Герена (Т8), яким вводили *цис*-тетрахлороди- μ -ізобутиратодиреній(III) – Re1 та *транс*-тетрахлороди- μ -ізобутиратодиреній(III) – Re2. В експерименті *in vitro* проводили спектрофотометричні дослідження СОД-подібної активності сполук ренію та їх вплив на активність Cu,Zn -СОД з еритроцитів бика на ксантин-ксантинооксидазній модельній ензимній системі, взаємодія СОД та сполук ренію вивчалася флуоресцентним методом та методом кругового дихроїзму (КД) (Леус, 2012).

Розвиток карциноми Герена призводить до підвищення активності СОД в еритроцитах крові щурів-пухлиноносіїв на 42% порівняно з контролем. У разі введення Re1 активність ензиму підвищується на 147%, а введення Re2 – на 70% порівняно з групою Т8. Отже, вплив сполуки ренію *цис*-конфігурації на активність СОД *in vivo* у 2 рази перевищує вплив сполуки *транс*-конфігурації ($P < 0,01$). Методами тирозинової флуоресценції та кругового дихроїзму *in vitro* показано, що сполуки ренію *цис*- і *транс*-конфігурації взаємодіють з еритроцитарною СОД та здійснюють практично однакову зміну вторинної структури протеїну: збільшується кількість елементів α -спіралізованої ділянки (на 6–7%) та нерегулярної структури (на 12–13%) і зменшується відсоток елементів β -листа (на 16–18%) та β -вигинів (на 1–3%). Зроблено припущення про приєднання сполук ренію до гістидинових залишків, що знаходяться на віддалених ділянках протеїнової молекули від флуорофора Tyr-108. Шляхом застосування модельної ксантин-ксантинооксидазної ензимної системи *in vitro* показано, що швидкість реакції між СОД та генерованим супероксид-аніоном практично не змінюється в присутності Re1 та Re2 (на 6–12%) порівняно з нативним ензимом, що свідчить про незначний вплив цих сполук на активний центр СОД. Знайдено СОД-подібну активність Re1, яка не є характерною для Re2. Особливості взаємодії сполук ренію з СОД *in vitro* свідчать про те, що знайдені закономірності зміни активності цього ензиму в експерименті *in vivo* роблять певний внесок у феномен активації СОД. Проте цей феномен не може бути повністю поясненим безпосередньою взаємодією цих сполук з протеїном.

**DO ALPHA-TUBULIN ACETYLATION AND DETYROSINATION
MEDIATE STARVATION-INDUCED AUTOPHAGY
IN TOBACCO CELLS?**

LYTVYN D. I., FEDYNA V. D., YEMETS A. I., BLUME Ya. B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: dmytro.lytvyn@gmail.com*

Recent data discover a novel functions of microtubules (MT) in the regulation of autophagy development under physiologic and stress conditions in yeast and animal cells. It involves a role of MTs in maturation and traffic of autophagosomes by means of its dynamic state changes and post-translational modifications of tubulin, including acetylation in the first place. But participation manner of plant cytoskeleton remains unclear in this field of cellular functions. In present work an experimental approach of prolonged cultivation of tobacco BY-2 suspension cells was performed to clarify an involvement of plant MTs in the development on starvation induced autophagy via tubulin acetylation and denitrotyrosination. Induced metabolic stress caused by prolonged cultivation was resulted in glucose depletion in culture medium and following increased levels of protein hydrolysis and autophagy. Western-blotting of the samples relevant to different culture stages revealed that development of autophagy is strongly accompanied by α -tubulin acetylation and detyrosination. Both post-translational modifications were caused changes in its molecular microenvironment that was revealed by Co-IP assay. The termination of autophagy induced by prolonged starvation led to the development of programmed cell death that was characterized by nucleosomal DNA fragmentation and decreasing of mentioned tubulin modifications. Obtained data suggest a functional link between cytoskeleton and autophagy development in plants via changes of tubulin post-translational modifications and its protein microenvironment.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЙ ПОЛІМІКСИНУ В
ТА ЙОГО ПОХІДНИХ ІЗ ЛІПІДОМ А ЗОВНІШНЬОЇ
МЕМБРАНИ ГРАМНЕГАТИВНОЇ БАКТЕРІЇ**

ЛІСНЯК Ю. В.

*ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова
НАМН України», Харків;
e-mail: yulisnyak@gmail.com*

В останнє десятиріччя антимікробні пептиди (АМП) інтенсивно досліджуються в світі з метою створення ефективних засобів проти інфекцій, які спричиняються надзвичайно резистентними штамми грамнегативних бактерій. Спроможність АМП швидко вбивати бактерії; відносні труднощі формування резистентності до них, а у разі циклічних пептидів ще й надзвичайна стійкість до процесу травлення, роблять АМП дуже привабливими базовими сполуками для розробки на їх основі ефективних антибактеріальних ліків. Одними з перспективних сполук цього класу є поліміксини, зокрема поліміксин В, циклічний ліподекапептид R-Dab1-Thr2-Dab3-cyclo[Dab4-Dab5-(D)Phe6-Leu7-Dab8-Dab9-Thr10], де R – метилоктаноїл, а Dab – діамінобутанова кислота. Передумовою спрямованого вдосконалення терапевтичних властивостей цього відомого антибіотика є розуміння молекулярних механізмів його взаємодії зі своїми клітинними мішенями, яке наразі не є достатньо повним. Первинною мішенню поліміксину, взаємодія з якою значною мірою зумовлює його подальший антибактеріальний ефект, є ліпід А, внутрішня частина ліпополісахаридного компонента зовнішньої мембрани грамнегативної бактерії. Наші дослідження було спрямовано на аналіз особливостей міжмолекулярних взаємодій «поліміксин В – ліпід А» за допомогою розрахункових методів молекулярного моделювання (молекулярна динаміка, докінг).

Метою роботи було виявлення структурних елементів молекули поліміксину, які зумовлюють його високу антибактеріальну активність. За допомогою комп'ютерного «аланінового сканування» – послідовної заміни («мутації») кожної амінокислоти поліміксину на аланін – ми дослідили вплив різних амінокислот поліміксину на його зв'язування з ліпідом А. Характеристикою зв'язування була енергія зв'язування комплексу «похідна поліміксину–ліпід А», яку розраховували у водному розчині при рН 7,0 із масовою часткою NaCl 0,9% при температурі 298 К в силовому полі AMBER03. Показано, що заміна залишків Dab в положеннях 1, 3, 5, 8 та 9 поліміксину на аланін помітно знижує енергію його зв'язування з ліпополісахаридом; тоді як заміна на аланін залишків у положеннях 2, 6, 7 і 10 залишає її практично незмінною. Одержані нами результати добре узгоджуються з літературними експериментальними даними щодо гасіння інтенсивності флуоресценції міченого поліміксину у разі витіснення його з комплексу з ліпополісахаридом аналогічними похідними поліміксину, що є аргументом на користь адекватності наших модельних представлень. Як показує порівняння величин енергій зв'язування комплексів «похідна поліміксину–ліпід А» з даними літератури з мікробіологічного тестування цих похідних, зміни мінімальних інгібувальних концентрацій залежно від положення аланінового замісника на молекулі поліміксину відбуваються корельовано зі змінами енергії зв'язування комплексів відповідних похідних поліміксину з ліпідом А.

Таким чином, заміна залишків Dab1, Dab5, Dab8 і Dab9 молекули поліміксинуВ на аланін ослаблюють його зв'язування з ліпідом А; ці залишки є важливими для прояву антибактеріальної активності поліміксинів.

CONSEQUENCE OF TEMPERATURE GRADIENT ON THE 3D STRUCTURE OF THE EMAP II CYTOKINE AS STUDIED WITH HETERONUCLEAR NMR SPECTROSCOPY

¹LOZHKO D. M., ^{2,3}ZHUKOV I. Yu., ¹KORNELYUK A. I.

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*nstitute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy
of Sciences, Warsaw, Poland;*

³*NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland;
e-mail:dloshko@ukr.net*

Endothelial and monocyte-activating polypeptide II (EMAP II) is the C-terminal domain of p43 precursor protein known as a proinflammatory cytokine and chemoattractant for monocytes. EMAP II apparently plays an important role in inflammation, apoptosis and angiogenesis processes in tumour tissues. Determined recently 3D structure of EMAP II protein facilitate an interaction with tRNA biomolecules. In this report, we present detail analysis of temperature dependence of ¹H and ¹⁵N chemical shifts obtained with heteronuclear high-resolution NMR spectroscopy.

The ¹⁵N- and ¹³C,¹⁵N-double labeled EMAP II protein was obtained in according previously developed protocol (Lozhko et al., 2013). The experimental data were recorded as 2D ¹H-¹⁵N HSQC spectra at four temperatures (293, 298, 310, and 315 K) on Varian VNMRS 600 NMR spectrometer operating at 14.7 T magnetic field.

Analysis of NMR data revealed the most temperature-sensitive regions of EMAP II in solution: Leu9-Lys21, S27-G36, Arg41-Arg59, Cys65-Lys68, Val75-Met82, Ser85-Gln129, G153-Lys166. It is interesting to note, the C-terminal subdomain is more stable to temperature shock. In case of N-terminal subdomain, the high csp values caused by temperature observed for N-termini cytokine motif (Asp10 - Lys20) (Kim et al., 2000) and two β-turns (β1-β2 and β1'-β2') served as additional place for tRNA binding (Renault et al., 2001).

This work was supported by grant N30107131/2150 from Polish Ministry of Sciences and High Education, Slovenian-Ukrainian bilateral project (BI-UA/09-10-004) and FP7 EastNMR project (contract no. 228461)

inside of transnational access program (for D.L. and A.K.). This work was partly performed inside JRA activity of BioNMR project (contract no. 261863) between Slovenian NMR Centre and Faculty of Chemistry, University of Warsaw.

**ИОНЫ ХЛОРА СПЕЦИФИЧЕСКИ ИНГИБИРУЮТ ЭКСПОЗИЦИЮ
САЙТА ЛАТЕРАЛЬНОЙ АССОЦИАЦИИ В УЧАСТКЕ В β 121-135
МОЛЕКУЛЫ ФИБРИНОГЕНА В ПРОЦЕССЕ
ЕЁ ТРАНСФОРМАЦИИ В ФИБРИН**

*МАКОГОНЕНКО Е. М., БЕРЕЗНИЦКИЙ Г. К., ПИРОГОВА Л. В., ЦАП П. Ю.,
УРВАНТ Л. П., КОЛЕСНИКОВА И. Н., ДУБОВЕЦКИЙ А. С.,
ЛУГОВСКОЙ Э. В., КОМИСАРЕНКО С. В.*

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины. Киев;
e-mail: lpurvant@gmail.com*

Ранее нами было установлено, что трансформация молекулы фибриногена (Fg) в фибрин (f) под действием тромбина (Thr) сопровождается структурной перестройкой в её суперспиральном коннекторе с формированием сайта латеральной ассоциации (СЛА) протофибрилл в 121–135 участке В β -цепи молекулы f. Известно, что ионы хлора (Cl⁻) являются специфическими ингибиторами латеральной ассоциации протофибрилл. Целью работы было установить, ингибируют ли ионы Cl⁻ формирование СЛА в молекуле Fg в ходе её трансформации в молекулу f под действием тромбина. В работе использовали Fg, Thr, выделенные из плазмы крови доноров, и fdesAB-мономер, полученный из Fg. Влияние солей NaF и NaCl на полимеризацию f в системе Fg + Thr исследовали турбидиметрически при 350 нм. Экспозицию СЛА в Fg в системе Fg + Thr регистрировали с помощью метода ППР по связыванию образующегося *in situ* f с монАТ I-3с, иммобилизованном на чип, в 0,02 М HEPES-буфере, содержащем соли NaF или NaCl и 1 мМ GPRP пептид. Поскольку ионы F слабо и неспецифически угнетают полимеризацию f по сравнению с ионами Cl⁻, они были использованы в качестве ионов сравнения. В системе Fg + Thr при увеличении концентрации солей 0,1 до 0,225 М параметры процесса полимеризации в присутствии NaF и NaCl изменяются следующим образом: время образования протофибрилл в обоих случаях увеличивается в 2 раза; скорость латеральной ассоциации протофибрилл уменьшается в присутствии NaF в 2, а в присутствии NaCl в 13,8 раза; мутность сгустка в присутствии NaF не изменяется, а в присутствии NaCl уменьшается в 6,2 раза. Связывание мономерного f desAB с монАТ I-3с, иммобилизованным на чип, в 0,15 М NaCl уменьшается в 2 раза по сравнению с таковым в 0,15 М NaF. Связывание f, образующегося в системе Fg + Thr, уменьшается в 4 раза в 0,15 М NaCl, по сравнению с таковым в 0,15 М NaF и в 12,2 раза в 0,225 М NaCl по сравнению с таковым в 0,225 М NaF. Полученные результаты позволяют сделать вывод о торможении ионами Cl⁻ экспозиции СЛА в В β 121-135 участке молекулы фибрина. Мы полагаем, что установленное ранее ингибирование латеральной ассоциации протофибрилл ионами Cl⁻ сопряжено с торможением структурной перестройки в суперспиральном коннекторе молекулы в процессе трансформации Fg в фибрин.

СТАБІЛІЗАЦІЯ СТРУКТУРИ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНУ ЕМАР II В НАНОКОМПЗИТНОМУ КОМПЛЕКСІ З γ -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

^{1,2}МАЛИНА А. Е., ^{1,2}ДРАГАН А. І., ¹КОЗЛОВ О. В., ^{1,2}КОРНЕЛЮК О. І.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
²Інститут високих технологій, Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: malinaalona@gmail.com

Використання рекомбінантних протеїнів як лікарських препаратів набуває широкого розповсюдження в сучасній фармакології. Проте основною проблемою використання таких препаратів є нестабільність протеїнових компонентів. В сучасних підходах до стабілізації протеїнів у складі терапевтичних препаратів широко використовуються природні олігосахариди – циклодекстрини (α -циклодекстрин, β -циклодекстрин та γ -циклодекстрин) та їх похідні. Циклодекстрини здатні стабілізувати структуру протеїнів, запобігати їх агрегації, підвищувати стійкість до протеаз та збільшувати їхню розчинність. Цитокін ЕМАР II (ендотеліальний моноцитаактивуючий поліпептид II) – це мультифункціональний протеїн, попередником якого є компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетази вищих еукаріот – протеїн АІМР1/p43. Цей цитокін має здатність індукувати прокоагуляційну активність тканинного фактора в ендотеліальних клітинах і спричинювати міграцію моноцитів та гранулоцитів.

Метою роботи є створення нанокмпозитних комплексів цитокіну ЕМАР II з γ -циклодекстрином та дослідження їхніх властивостей.

Рекомбінантний цитокін ЕМАР II одержано шляхом бактеріальної експресії в клітинах *E. coli* за оптимізованою методикою. Рекомбінантний протеїн ЕМАР II_f (212 а.з.) очищали методом металхелатуючої хроматографії, після чого проводили протеоліз із використанням рекомбінантної ентерокінази (НЕВ, Велика Британія) та отримували цитокін ЕМАР II (169 а.з.). Дослідження взаємодії ЕМАР II з γ -циклодекстрином проводили методом флуоресцентної спектроскопії з реєстрацією триптофанової флуоресценції. Комп'ютерний аналіз експонованості ароматичних амінокислотних залишків на молекулярній поверхні цитокіну ЕМАР II проводили за допомогою програми PyMOL.

За вивчення взаємодії ЕМАР II з γ -циклодекстрином встановлено, що інтенсивність флуоресценції ЕМАР II зростає зі збільшенням концентрації ліганду. Це дає підстави стверджувати про специфічне зв'язування γ -циклодекстрину з цитокіном ЕМАР II. Розрахована константа зв'язування циклодекстрину з протеїном складає $23,02 \pm 4,52$ мМ, причому стехіометрія зв'язування ліганду складає 1 : 1.

У разі підвищення температури від 25 до 60 °С в цитокіні ЕМАР II спостерігається локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишку Trp128 на поверхні протеїну. Під час вивчення комплексів ЕМАР II з γ -циклодекстрином в цих умовах виявлено блокування локального конформаційного переходу та стабілізацію протеїнової глобули ЕМАР II в складі нанокмпозитного комплексу.

Встановлено, що γ -циклодекстрин специфічно зв'язується з цитокіном ЕМАР II і стабілізує його структуру, причому вірогідним сайтом зв'язування є конформаційно рухлива ділянка на поверхні ЕМАР II, в якій Trp128 локалізований поряд із функціонально важливим лізинбагатим кластером.

**СТРУКТУРА І ДИНАМІКА ТИРОЗИЛ-тРНК
СИНТЕТАЗИ *Mycobacterium tuberculosis* У КОМПЛЕКСІ
З ІНГІБІТОРОМ SB-219383**

^{1,2}МИКУЛЯК В. В., ^{1,2}КОРНЕЛЮК О. І.

¹*Інститут високих технологій, Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, Україна;*

²*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: vm@univ.kiev.ua*

Тирозил-тРНК синтетаза патогенної еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* (*MtTyrRS*) є ензимом, що належить до I-го класу аміноацил-тРНК-синтетаз, які каталізують приєднання амінокислоти до відповідної тРНК на дорибосомному етапі синтезу протеїну. *MtTyrRS* розглядається як перспективна мішень для пошуку та розробки нових антибактеріальних препаратів, оскільки специфічне інгібування цього ензиму може суттєво пригнічувати ріст патогенних бактерій. Відомо, що *TyrRS* прокаріотичного і еукаріотичного типів нездатні до перехресного розпізнавання та аміноацилювання відповідних тРНК_{Tyr}. Нами проведено моделювання молекулярної динаміки *MtTyrRS* і траєкторії збережені в базі даних віртуальної лабораторії MolDynGrid. У цій роботі ми проводили дослідження динамічних фармакофорних ознак *MtTyrRS* у комплексі з інгібітором SB-219383.

Для побудови комплексу *MtTyrRS* з інгібітором використано кристалографічну структуру комплексу *S. aureus* *TyrRS* з інгібітором SB-219383 (PDB код – 1JII). Конформацію зв'язування інгібітора в активному центрі *MtTyrRS* було одержано шляхом накладання активних центрів ензимів. Обрахунки молекулярної динаміки проведено за допомогою програмного забезпечення GROMACS 4.5, із використанням силового поля Amberff99SB-ILDN. Температура і тиск підтримувались постійними при 210 K та 1 Атм відповідно. Час розрахунку динаміки *MtTyrRS* – 100 нс.

Встановлено, що інгібітор SB-219383 формує дев'ять водневих зв'язків із амінокислотними залишками активного центру ензиму: Tyr36, Gly38, Asp40, His50, Asp178, Asp196 та Gln197. Тривалість існування водневих зв'язків коливається від 35 до 99% від всього часу динаміки (100 нс). Інгібітор SB-219383 зв'язується в активному центрі ензиму, взаємодіючи з ділянкою зв'язування L-тироzinу та фосфатної групи. Його розміри менші за розміри тирозиладенілату, тому інгібітор не може взаємодіяти з каталітичною петлею. Відомо, що в бактеріальних *TyrRS* мотив KMSKS грає важливу роль в каталітичному механізмі, тому інгібітори, що взаємодіють з цим мотивом мають більшу афінність до активного центру бактеріальних *TyrRS*, ніж до еукаріотичних гомологів.

**СПОЛУКИ РЯДУ БОРАДИПРОЛОМЕТЕНУ (BODIPY) –
НОВИЙ КЛАС ІНГІБІТОРІВ ТЕЛОМЕРАЗИ**

¹НЕГРУЦЬКА В. В., ²ЯКУБОВСЬКИЙ В. П., ²ШАНДУРА М. П.,
²КОВТУН Ю. П., ¹ДУБЕЙ І. Я.

¹*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;*

²*Інститут органічної хімії НАН України, Київ;
e-mail: dubey@imbg.org.ua*

Високий рівень активності теломерази в більшості злоякісних пухлин і відсутність її в нормальних соматичних клітинах дає підстави вважати активну теломеразу однією з важливих характеристик ракових клітин. Теломерна ДНК містить багаті гуаніном послідовності, здатні утворювати специфічні структури, т.зв. G-квадруплекси (G4), що побудовані на основі стопок квартетів гуанінових основ. Якщо стабілізувати G4-структури теломерної ДНК специфічним низькомолекулярним лігандом, елонгація теломер ензимом значною мірою блокується, внаслідок чого пухлинна клітина втрачає

здатність ділитися необмежено. Можливе створення протипухлинних засобів на основі інгібіторів теломерази – лігандів G-квадруплексних структур теломерної ДНК. Більшість ефективних G4-лігандів (порфірини, циклічні поліоксазоли, похідні антрахінону, карбазолу, ціаніни та ін.) містять ароматичні системи, здатні до π -електронного перекривання з G-квартетами.

Нами виявлено цілком новий клас інгібіторів теломерази – арилзаміщені похідні борадипіролометену (BODIPY) та відповідні вільні основи (без фрагмента BF2). Такі сполуки вперше досліджено як можливі ліганди G4. Ми виходили з того, що їхні структури містять гетероароматичні фрагменти великого розміру, теоретично здатні, подібно до порфіринів, добре перекриватися з G-квартетами. Водночас атоми фтору, розміщені в аксіальних положеннях відносно плоского хромофору BODIPY, можуть перешкоджати ефективній взаємодії π -електронних систем ліганду та G4. Проте ми припустили, що ці аксіальні групи можуть локалізуватися в центральному каналі G-квадруплексу. У вільних же основ диріолометенів такі стеричні перешкоди відсутні.

Розроблено новий метод модифікації ядра BODIPY, що ґрунтується на реакції його ацетальдегідної похідної з первинними амінами з наступною циклізацією енамінових інтермедіатів. Цей загальний підхід дозволяє вводити в BODIPY різноманітні замісники, що важливо для отримання бібліотеки сполук для скринінгу. Слід зазначити, що численні похідні BODIPY є інтенсивними флуорофорами.

Для аналізу протителомеразної активності нових сполук було використано метод TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol, метод ампліфікації теломерних повторів). Він ґрунтується на ПЛР-ампліфікації продуктів теломеразної реакції, одержаних за подовження ензимом специфічного праймера, що є субстратом теломерази, яка здійснює додавання до нього повторів TTAGGG. Метод застосовується для визначення активності теломерази та виявлення її інгібіторів. Джерелом ензиму був лізат пухлинних клітин лінії MCF-7 (карцинома молочної залози людини) з високим рівнем теломеразної активності.

Біологічне тестування серії сполук ряду BODIPY та відповідних основ підтвердило потенційну можливість їх взаємодії із квадруплексною ДНК. Серед них знайдено низку речовин, що повністю інгібують теломеразну реакцію *in vitro* в концентрації 50 мкМ, одна сполука активна і за 25 мкМ. При цьому до інгібіторів належать як похідні BODIPY, так і вільні основи. Особливо важливо, що досліджені сполуки в умовах аналізу TRAP, на відміну від багатьох інших інгібіторів теломерази, в робочих концентраціях не впливають на активність *Taq*-ДНК-полімерази, а також не інгібують топоізомеразу I в системі релаксації ДНК *in vitro*. Таким чином, інгібітори виявилися досить специфічними щодо теломерази.

Виходячи з цього, ми вважаємо перспективними подальші дослідження цього нового класу інгібіторів теломерази, включаючи хімічну модифікацію й оптимізацію їхніх структур і дослідження механізмів біологічної активності сполук.

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКИСЛЮВАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ТІАМІНУ ТА ПІРИДОКСИНУ НА МОДЕЛІ ОКИСНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ПРОТЕЇНІВ

НИЖЕНКОВСЬКА І. В., АФАНАСЕНКО О. В., ОСІНСЬКА Л. Ф.

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна;
e-mail: loraosi@mail.ru

Метою роботи було визначення антиокислювальної активності тіаміну та піридоксину на моделі окислювальної модифікації протеїнів.

Досліджували спонтанну окислювальну модифікацію протеїнів (СОП), тобто не стимульоване активаторами окислення протеїнів, а також металокаталізовану окислювальну модифікацію протеїнів (МКО), стимульовану реактивом Фентона, і пероксидом водню як в системі із сироваткою крові, так і з альбуміном. Для аналізу ступеня окислення протеїнів використовували 0,1 мл сироват-

ки крові. Внаслідок реакції окислення протеїнів можуть утворюватися альдегідні і кетонні угруповання амінокислотних залишків, які взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДФГ). Утворені комплекси реєстрували при $\lambda = 370$ і 430 нм. Основна кількість утворених динітрофенілгідразонів належить до альдегідів і кетонпохідних нейтрального характеру ($\lambda = 370$ нм). Концентрація тіаміну і піридоксину становить 1 мМ.

За стимуляції моделі спонтанного окислення протеїнів комплексом Fe^{2+} -ЕДТА як у системі із сироваткою крові, так і в моделі із внесенням альбуміну, спостерігається активація цих систем до ~ 139 – 140% . Одержані результати за стимуляції окислення протеїнів сироватки крові та альбуміну пероксидом водню свідчать, що їх значення були відповідно $140,5$ та $129,5\%$ (відносно моделі спонтанного окислення).

Під час обговорення результатів впливу тіаміну на інтенсивність металокаталізованого окислення протеїнів виявлено зниження утворення карбонільних сполук – альдегідів і кетопохідних нейтрального характеру як у сироватці крові, так і у разі використання альбуміну відповідно до $73,45$ та $76,92\%$. Це зниження спостерігається в системі, стимульованій пероксидом водню (в дослідях з альбуміном) і було вираженішим. Так, інгібуюча дія тіаміну складає $49,7\%$. Разом з тим вплив тіаміну на ту саму систему, але в сироватці крові виявляє активуючий характер. Підвищення концентрації фенілгідразонів нейтрального характеру складає до $133,01\%$. Аналізуючи результати впливу тіаміну на окислювальну модифікацію протеїнів – альдегідів і кетопохідних основного характеру, слід відзначити, що тіамін виявляє вираженішу інгібуючу дію на утворення карбонільних фенілгідразонів. Так, у металокаталізуючій системі сироватки крові і в системі з альбумінів, він знижує утворення фенілгідразонів основного характеру відповідно до $58,57$ та $67,16\%$. У системі сироватки крові, ініційованій H_2O_2 , це зниження становить до $31,7\%$. Інгібуюча дія піридоксину в модельній системі з альбуміном для карбонільних сполук нейтрального характеру за МКО становить 69% , а в H_2O_2 -стимулюючій – $13,5\%$. Цей характер змін спостерігали і при оцінці утворення продуктів основного характеру. Відповідно до контрольних значень ці показники зниження дорівнюють $55,15\%$ і 40% .

Внаслідок проведеної роботи пропонується використання дослідження окисної модифікації протеїнів за утворенням карбонільних сполук як методу оцінки антиоксидантної активності тіаміну та піридоксину в дослідях *in vitro*. Встановлено, що тіамін здатен пригнічувати окислювальну деструкцію протеїнів; піридоксин пригнічує утворення альдегідів і кетопохідних як нейтрального походження, так і основного за дослідження впливу піридоксину в модельній системі на стан металокаталізованої та індукованої H_2O_2 модифікації протеїнів сироватки крові і модельної системи з альбуміном.

МОБІЛЬНІ ГЕНЕТИЧНІ ЕЛЕМЕНТИ В ІНТРОНАХ ГЕНА *MGMT* ЛЮДИНИ ЯК ДЖЕРЕЛО ПОТЕНЦІЙНИХ РЕГУЛЯТОРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

ПІДПАЛА О. В., ЛУКАШ Л. Л.

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ,
e-mail: pidpala@ukr.net*

Ген *MGMT* людини кодує репаративний ензим O^6 -метилгуанін-ДНК метилтрансферазу, який видаляє алкільні групи з O^6 -позиції гуаніну в ДНК і захищає клітини від їхнього токсичного та мутагенного впливів. Експресія цього гена та активність самого ензиму мають широкі межі як між-, так і внутрішньоіндивідуальної варіації, що вказує на складну його регуляцію. Дослідження останніх років зконцентровані на залученні мобільних генетичних елементів (МГЕ) до генної регуляції, оскільки показано, що МГЕ можуть бути джерелом різноманітних регуляторних послідовностей (сайтів альтернативного сплайсингу, *cis*-регуляторних модулів або альтернативних промоторів). Вивчаючи розподіл МГЕ в гені *MGMT* людини в межах промоторної ділянки, нами виявлено послідовність частково делетованого *AluSp*-повтору, що має гомологію із сайтами зв'язування для восьми транскрипційних

факторів. У структурній ділянці гена МГЕ присутні лише в інтронних послідовностях. У двох інтронах МГЕ утворюють композиційні кластерні структури. Метою роботи був аналіз зазначених композиційних кластерних структур на наявність послідовностей, які гомологічні сайтам зв'язування транскрипційних факторів.

Нуклеотидні послідовності гена *MGMT* людини взято на сайті Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Результати пошуку та ідентифікації МГЕ здійснено за допомогою програми CENSOR (<http://www.girinst.org>). Функціональні сайти визначено програмою TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

Із шести композиційних кластерних структур в інтронних послідовностях гена *MGMT* людини для подальшого аналізу відібрано ті, які, крім фрагментів *LINE*-елементів, містять і *Alu*-повтори. Таких композиційних кластерів виявлено по одному в інтроне 2 та в інтроне 3. Довжина першого кластера становить 1339 п.н. До його складу, крім повнорозмірного *AluSg*-повтору, який розташований у протилежному до транскрипції напрямку, входять фрагменти двох *LINE*-елементів. У межах *AluSg*-повтору виявлено гомологію із сайтами зв'язування для чотирьох транскрипційних факторів (YY1, р300, C/EBP і HSF2). У межах фрагментів *LINE*-елементів виявлено гомологію із сайтами зв'язування для 17 транскрипційних факторів. Серед низки виявлених потенційних сайтів є сайти зв'язування для HSF2, C/EBP, SRY, STAT, Oct, GATA і AP-1. Крім того, виявлено TATA бокс і сайти для зв'язування із глюкокортикоїдним рецептором і потенційний гормонасоційований елемент для ретиноїдного орфанового рецептора RORalpha1. Наявність TATA боксу може бути передумовою для існування альтернативного промотору в гені *MGMT* людини в межах інтрону 2. Другий досліджений композиційний кластер розташований в межах інтрону 3 гена *MGMT* людини. Він має довжину 1533 п.н. і складається із двох фрагментів *LINE*-елементів і повнорозмірного *AluSz6*-повтору. Напрямок транскрипції усіх складових частин кластерної композиційної структури в цьому разі збігається з напрямком транскрипції гена. Як і в разі *AluSg*-повтору із кластера в інтроне 2, цей *AluSz6*-повтор також містить елемент відгуку на протеїни теплового шоку HSF2. У межах фрагментів *LINE*-елементів, як і в попередньому кластері, серед інших потенційних сайтів виявлено гомологію із сайтами зв'язування для C/EBP, SRY, STAT, Oct, GATA і AP-1, TATA-бокс і сайти для зв'язування з RORalpha1.

Композиційні кластерні структури МГЕ в інтронах 2 і 3 гена *MGMT* людини збагачені промотороспецифічними елементами і мають потенціал для формування альтернативних промоторів.

ВПЛИВ КАЛІКСАРЕНУ C-145 НА ГІДРОЛІЗ ПОЛІМЕРНОГО ФІБРИНУ ПЛАЗМІНОМ, ЩО УТВОРЮЄТЬСЯ ЗА АКТИВАЦІЇ ПЛАЗМІНОГЕНУ ТКАНИННИМ АКТИВАТОРОМ І СТРЕПТОКІНАЗОЮ

ПОПАДЮК В. В., САВЧУК О. В., ГРИНЕНКО Т. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: viktoriya.popadyuk@yandex.ua*

Плазмін (3.4.21.7) є основним ензимом фібринолітичної системи крові, який циркулює в кровообігу у формі свого попередника – плазміногену. За фізіологічних умов перетворення плазміногену до плазміну здійснюється двома сериновими протеїназами – тканинним активатором плазміногену (3.4.21.68) та урокіназою (3.4.21.73) шляхом обмеженого протеолізу активаційного пептидного зв'язку Arg561-Val562 з наступним формуванням активного центру ензиму. Стрептокіназа – активатор плазміногену бактеріального походження, який утворює комплекс з плазміногеном людини, спричинює конформаційні перебудови в його серинпротеїназному домені, що приводить до формування активного центру і появи каталітичної активності без розщеплення активаційного пептидного зв'язку. Плазмін, крім основної функції – гідролізу фібринового згустку, бере участь у багатьох інших біологічних процесах: ангіогенезі, ремоделюванні тканин, інвазії та метастазуванні злоякісних пух-

лин, розвитку запалення. Оскільки плазмін бере участь в різноманітних процесах в організмі людини, в тому числі і патологічних, то пошук шляхів регуляції його багатофункціональності є актуальним завданням. Одним із способів регуляції функціонування плазміну є використання низькомолекулярних інгібіторів.

Каліксарени – циклічні олігомери, які складаються з фенольних фрагментів, сполучених метиленовими містками. Унікальною здатністю каліксаренів є розпізнавання та зв'язування в стійкі комплекси біологічні макромолекули, розділення близьких за властивостями катіонів, аніонів та нейтральних молекул. В теперішній час проводяться дослідження щодо виявлення можливих антибактеріальних, антитромботичних, мембранотропних, протівірусних та протипухлинних властивостей каліксаренів. Показано, що каліксарен C-145 – водорозчинна натрієва сіль калікс[4]арену, яка містить чотири залишки негативно зарядженої метилбіфосфонової кислоти, інгібує полімеризацію des АВ фібрину за рахунок блокування центру полімеризації «А», залученого в процес формування протофібрил. Відомо, що активація плазміногену відбувається на поверхні фібрину, тому виникло питання щодо здатності C-145 діяти на лізис фібринового згустку плазміном. Метою роботи було дослідження впливу каліксарену C-145 на гідроліз полімерного фібрину плазміном, що утворюється під час активації плазміногену тканинним активатором та стрептокіназою.

Методом турбідиметрії показано, що каліксарен C-145 інгібує деградацію полімерного фібрину плазміном. Швидкість гідролізу зменшується прямо пропорційно в межах концентрацій каліксарену 1–5 мкМ. За концентрації 10 мкМ фібриновий згусток не гідролізується протягом 50 хв, тоді як за відсутності каліксарену час гідролізу складає 2 хв. Каліксарен збільшує час гідролізу фібрину, не впливаючи на швидкість перетворення плазміногену в плазмін. Водночас каліксарен C-145 за різних концентрацій (1–10 мкМ) не змінює швидкість гідролізу специфічного хромогенного субстрату S2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA·2HCl) плазміном, що свідчить про відсутність його дії на каталітичний центр ензиму. Зроблено припущення, що каліксарен C-145 діє як неконкурентний інгібітор плазміну, проте питання про механізм інгібування потребує подальших досліджень.

Каліксарен C-145 був синтезований співробітниками відділу хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України під керівництвом доктора біологічних наук, члена-кореспондента НАН України В. І. Кальченка.

ПОШУК ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗ 1 (PKD1) ТА 2 (PKD2)

РАЄВСЬКИЙ О. В., САМОФАЛОВА Д. О., КАРПОВ П. А., БЛЮМ Я. Б.

*Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ;
e-mail: samofalova.dariya@gmail.com; rayevsky85@gmail.com*

Протеїнкінази D (PKD) належать до родини серин/треонін протеїнкіназ, які відіграють важливу роль в регуляції онкологічних процесів, імунних реакцій, апоптозі та проліферації клітин. Родина PKD представлена трьома протеїнами (PKD1, PKD2 і PKD3) гомологічними за структурою і функціями. Найбільшим за розміром є PKD1 людини (912 амінокислот, мол. маса 115 кДа). Інші два – PKD2 довжиною 878 амінокислот (Мм 105 кДа) і PKD3 (раніше PKC ν /PKC η) довжиною 890 амінокислот (Мм 110 кДа). Члени родини PKD мають спільну доменну архітектуру, що складається з N-кінцевої області регуляторних доменів і C-кінцевої області, представленої каталітичним доменом.

Аналіз літератури виявив, що натеper будь-які кристалграфічні дані щодо цих протеїнів відсутні. Також зараз відомо лише три досить селективних інгібітори: CID 755673 (IC_{50} = 0,182 і 0,280 мкМ для PKD1 і PKD2) і kbNB142-70 (IC_{50} = 28,3 та 58,7 нМ для PKD1 і PKD2). Обидва інгібітори є алостеричними, тобто їх сайт зв'язування знаходиться в межах неструктурованої області C-кінця молекули. Третій інгібітор – CID 2011756 (IC_{50} = 0,6; 0,7 і 3,2 мкМ для PKD2, PKD3 і PKD1 відповідно).

З метою пошуку потенційних інгібіторів саме для PKD1 і PKD2 було побудовано моделі тривимірних структур цих протеїнів. За допомогою PDB-BLAST – послідовності мішеней було порівняно із базою Protein Data Bank. Було відібрано 5 кристалічних структур: 1ql6, 2bdw, 3mfr, 2jam і 2u7j. Останні було використано як шаблонні згортки під час профільного моделювання за допомогою серверу I-TASSER. Після верифікації результатів реконструкції каталітичного домену представленого в межах 580–840 амінокислотних залишків було з'ясовано, що за даними ANOLEA ProCheck лише дві з десяти структур можуть бути використані у подальших дослідженнях.

Для встановлення найвигідніших конформацій PKD1 і PKD2 використовувався пакет молекулярної динаміки (МД) GROMACS і силове поле amber99sb. Вільна динаміка тривала протягом 20 нс на 32 ядрах IFBG Claser. Як контроль було використано результати молекулярної динаміки шаблонних структур 1ql6 і 3mfr, які пройшли всі етапи молекулярної динаміки за загальним протоколом. На підставі RMSD і RMSF було проаналізовано траєкторії МД 4 досліджених протеїнів та для кожного одержано до 20 кластерних груп, кожна з яких була автоматично створена на основі обробки RMSD матриць і рівномірності знаходження цих конформацій протягом МД.

Гнучкий докінг АТФ і CID2011756 в АТФ-зв'язуючу кишеню було виконано за допомогою GOLD CCDC. Було перевірено контроль і реконструйовані моделі та обрано найзручніші конформації молекул для подальшого аналізу. Для підвищення точності докінгу для деяких ключових амінокислот було призначено використання бібліотеки ротамерів. Кращі позиції лігандів було відібрано на підставі показників ASP і GoldScore. На наступному етапі було створено електростатичні мапи і мапи граничного об'єму сайту за допомогою програми UCSF Dock 4.2. Бібліотека хімічних сполук була підготовлена за допомогою OpenBabel для скринінгу проти dock-моделей. За результатами скринінгу, з 3000 сполук було відібрано 6, що можуть бути використані для подальшого молекулярного дизайну. Тим не менше, всі вони не селективні на рівні окремих ізоформ PKD. Тому наступним нашим кроком буде застосування QSAR і фармакофорного пошуку для дослідження сайтів алостеричної взаємодії.

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF D-TYR-TRNA^{TYR}-DEACYLASE FROM *Thermus thermophilus*

¹RYBAK M. Yu., ^{1,2}KOVALENKO O. P., ^{1,2}TUKALO M. A.

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²State Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Institute of Molecular
Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: mariia.rybak@gmail.com

D-amino acids were detected in various living organisms from bacteria to mammals. Although most D-amino acids cannot be incorporated into proteins, D-amino acids still have toxic effects in both prokaryotes and eukaryotes. Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS), being specific to L-amino acids, ensure the first step of exclusion of D-amino acids. However, the stereospecificity of these enzymes is not absolute: several aaRS have been found to load tRNAs with D-amino acids. D-Tyr-tRNA^{Tyr}-deacylase (DTD) is the conservative enzyme, found in all domains of life, which ensures an additional checkpoint in the recycling of misaminoacylated D-Tyr-tRNA^{Tyr}. DTD doesn't hydrolyze stereospecific L-amino acids, being peculiar to D-amino acids. Structural bases of such specificity as well as mechanism of hydrolysis realized by DTD are considered.

The gene of D-Tyr-tRNA^{Tyr}-deacylase from *T. thermophilus* was cloned into pET15b, pET28b, pET29b vectors (under control of T7 promoter and lac-operator) and pProExHTb vector, controlled by Trc promoter and lac-operator. All constructions were expressed in BL21(DE3)pLys and Rozetta *E. coli* strains. pET-based DTD constructions displayed low expression levels in BL21(DE3)pLys, and Rozetta strain couldn't provide effective cultivation. In contrast, pProExHTb-DTD showed a high expression level (>30 mg of protein per 1

liter of bacterial culture). Obtained His-tagged DTD was purified by chromatography on Ni-NTA agarose. His-residues were cut off by TEV (tobacco etch virus) protease.

Activity of enzyme was tested. The addition of DTD caused the decrease of the level of D-Tyr-tRNA^{Tyr}, generated *in situ*, and did not have an influence on the level of L-Tyr-tRNA^{Tyr}. On the other hand, excess accumulation of AMP was observed, when TyrRS, tRNA^{Tyr} and DTD were incubated in presence of D-Tyr, but not in the presence of L-Tyr, suggesting the editing process against D-Tyr.

D-Tyr-tRNA^{Tyr}-deacylase from *T. thermophilus*, cloned into pProExHTb vector, permits to obtain high amounts of purified protein for further structural and functional investigations.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ НУКЛЕЇНАТУ ТА НУКЛЕКСУ НА ЕКСПРЕСІЮ ДЕЯКИХ ГЕНІВ СИСТЕМИ ВРОДЖЕНОГО ПРОТИВІРУСНОГО ЗАХИСТУ

РИБЕНЧУК А. О., ГЕРАЩЕНКО Г. В., ЯКОВЕНКО Т. Г.,
СЕМЕРНИКОВА Л. І., ТКАЧУК З. Ю.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: alinarybenchuk@gmail.com*

Олігорибонуклеотиди разом із дсРНК та осРНК взаємодіють із рецепторами і запускають сигнальні шляхи, що призводять до активації транскрипційних факторів, які ініціюють процес транскрипції генів інтерферонів, системи 2'-5'ОАС/РНКазы L, протеїнази, цитокінів та інших факторів вродженого імунітету. Метою нашої роботи було порівняти вплив препаратів «Нуклексу» та «Нуклеїнату», створених на основі олігорибонуклеотидів дріжджової РНК на експресію генів системи вродженого противірусного імунітету.

Експресію генів (ЕГ) *ifna*, *ifnb*, *ifny*, *mx1*, *oas1* та *rnase1* вивчали в клітинах легень інфікованих вірусом грипу мишей методом RT-PCR за профілактичного і лікувального застосування препаратів на основі дріжджової РНК. Нуклекс – 100% комплекс РНК та манітолу; нуклеїнат – механічна суміш РНК та лактози.

Введення препаратів, на основі дріжджової РНК як для профілактики, так і для лікування, супроводжувалося значними змінами експресії інтерферонстимулюючих генів. За профілактичного введення нуклексу експресія гена *ifna* знизилась у 2 рази, а за введення нуклеїнату – лише в 1,3 рази порівняно з вірусінфікованими тваринами. Значне інгібування експресії *ifna* спостерігається, коли препарати використовувалися з лікувальною метою. Зокрема, ЕГ *ifna* знижується в 3 рази у разі лікування нуклексом, та в 2,5 рази – нуклеїнатом. Значно ефективнішим профілактичним і терапевтичним препаратом в плані інгібувального впливу на експресію гена *ifnb* виявився нуклекс, який знижує її в 3 рази порівняно із нуклеїнатом, який знижував її лише в 1,5 рази. Цікаво відмітити помітне зниження експресії *ifny*, коли препарати дріжджової РНК використовувалися і для лікування, і для профілактики. Зокрема, за введення нуклеїнату з лікувальною метою, експресія гена *ifny* знижується в 15 разів.

Важливо зазначити відмінності в експресії гена *mx1* (важливого компонента противірусного імунітету) за введення цих препаратів. Зокрема, за введення нуклекса з профілактичною метою, експресія цього гена була в 1,4 рази вища, ніж за введення нуклеїнату. Якщо вводили препарати для лікування вірусінфікованих тварин, то експресія гена *mx1* вища більше, ніж у два рази за введення нуклекса.

Помітні зміни спостерігаються і в експресії гена – ключового компонента вродженого противірусного імунітету, який відповідає за інгібування протеїнового синтезу в заражених вірусом клітинах. Експресія гена *oas1* знижується на 40% у разі введення нуклекса вірусінфікованим тваринам з метою і профілактики, і лікування. Варто зазначити, що за введення в організм нуклеїнату з лікувальною метою, експресія *oas1* знижується більше ніж у 3 рази.

Значно інтенсивніше на експресію гена *rnase1* впливає нуклеїнат. А саме, ЕГ *rnase1* знижується в 1,5 рази, за його введення з профілактичною метою та в 2 рази – з лікувальною порівняно із групою тварин, яким вводили нуклекс і в яких вірогідних змін не спостерігається.

Одержані нами дані щодо особливостей експресії генів інфікованих вірусом грипу мишей свідчать про відмінності на рівні молекулярно-біологічного впливу, які характерні в клінічному прояві протівірусного препарату «Нуклексу» порівняно з імуномодулюючим препаратом «Нуклеїнатом», незважаючи на їх спільне походження із дріжджової рибонуклеїнової кислоти.

РОЛЬ ДОМЕНІВ ПЛАЗМІНОГЕНУ В ЗАБЕЗПЕЧЕННІ ІНГІБУВАННЯ LYS-ПЛАЗМІНОГЕНОМ АГРЕГАЦІЇ ТРОМБОЦИТІВ

РОКА-МОЙЯ Я. М., БІЛОУС В. Л., КАПУСТЯНЕНКО Л. Г., ЖЕРНОСЄКОВ Д. Д.

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

Мембрана тромбоцитів – місце локалізації протеїнів системи активації плазміногену: плазміногену, активаторів плазміногену та плазміну. На поверхні клітин крові Glu-плазміноген шляхом обмеженого протеолізу може перетворюватися на Lys-форму, що має відкриту конформацію і з підвищеною швидкістю активується до плазміну. Нами показано, що екзогенний Lys-плазміноген (Lys-Пг), на відміну від нативної Glu-форми, пригнічує агрегацію тромбоцитів людини, стимульовану ADP, тромбіном та колагеном. Тому метою роботи було встановлення ролі окремих структурних компонентів молекули плазміногену в забезпеченні виявленого ефекту.

У наших експериментах аналог лізину 6-аміногексанова кислота (6-АГК) (0,05–1 мМ) знімає інгібувальний ефект Lys-Пг на тромбінстимульовану агрегацію тромбоцитів людини. Беручи до уваги діапазон діючих концентрацій 6-АГК, можна зробити висновок про те, що взаємодія Lys-Пг із протеїнами тромбоцитарної мембрани опосередкована лізинзв'язувальними сайтами високої та низької афінності, що знаходяться в кринглових доменах молекули зимогену. Інгібітор серинових протеїназ апротинін (5,5 МО/мл) не впливає на інгібувальний ефект Lys-Пг щодо агрегації тромбоцитів. Отже, можливі домішки плазміну в препараті Lys-Пг не чинять ефекту на агрегацію в умовах експерименту.

Вивчали дію очищених препаратів крингльмісних фрагментів плазміногену – кринглів 1-3, кринглу 4, кринглу 5 та мініплазміногену, який являє собою 5 крингл та каталітичний домен плазміногену. Встановлено, що, на відміну від цілісної молекули, K1-3, K4 та їх комбінація не впливають на тромбініндуковану агрегацію тромбоцитів. Препарат мініплазміногену, в якому каталітичну активність заінгібовано апротиніном або *n*-нітрофенілгуанідинбензоатом, також не пригнічує агрегацію. Проте передінкубація суспензії тромбоцитів з еквімолярними концентраціями препаратів K1-3, K4 та K5 запобігає прояву інгібувальної дії Lys-Пг: спостерігається відновлення швидкості та ступеня агрегації до контрольних значень. Варто зазначити, що K5 у концентрації 0,12 мкМ, відновлює агрегацію тромбоцитів на 80%, в той час як K1-3 та K4 в цих концентраціях відновлюють агрегацію лише на 60% порівняно з контрольним рівнем.

Обробка Lys-Пг моноспецифічними до K5 поліклональними антитілами не впливає на інгібувальний ефект цього зимогену в умовах експерименту. Ймовірно, антитіла взаємодіють з епітопами K5, що знаходяться поза межами сайтів зв'язування плазміногену з поверхневими протеїнами тромбоцитарної мембрани.

Одержані дані дозволяють припустити, що крингльмісні фрагменти плазміногену блокують сайти зв'язування цього проензиму на тромбоцитарній мембрані і, тим самим, запобігають його взаємодії із тромбоцитами. Не виключено, що ефективне інгібування Lys-Пг (але не Glu-формою зимогену!) агрегації тромбоцитів обумовлене саме мультицентровим характером його взаємодії із залученням ЛЗС кількох кринглових доменів водночас.

MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF AKT1 ACTIVATION BY MOLECULAR CHAPERON HSP60

ROYUK M. V., KROUPSKAYA I. V., MARKELOVA E. Yu., SIDORIK L. L.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: i.v.kroupskaya@imbg.org.ua*

In the failing heart molecular chaperones play important regulatory role in stress induced cell signaling. Hsp60 is one of the highest scientific and pharmacological interests due to recently described its antiapoptotic function in the cytoplasm of cardiomyocytes. It is revealed that cytosolic Hsp60 can directly interact and regulate activation of some kinases, sequester some proapoptotic molecules avoiding apoptosis. On the other hand serine-threonine kinase Akt is a critical enzyme in signal transduction pathways involved in multiple cellular processes. There are three Akt isoforms in mammals – Akt1, Akt2 and Akt3. In the heart Akt1 activation has been demonstrated to increase cell size and decrease apoptosis. In its fully activated state, Akt is phosphorylated on the activation loop (A-loop) at residue Thr308. Phosphorylation of Akt1 at Thr308 stimulates enzymatic activity at least 100 fold.

We used molecular dynamics (MD) simulations to study the initial stages of the active-inactive transition in the kinase catalytic domain. We carried out MD simulations of the inactive Akt molecule in the complex with Hsp60. MD simulation of the Akt1-Hsp60 molecule was performed using NAMD soft. It was solvated with TIP3P water using VMD soft. We used standard conditions of NVE-ensemble at the temperature of 310K (37 °C). Simulation was conducted for 10 ns. During MD optimization some changes were shown in the Akt1 molecule orientation inside the enzyme active site: Akt1 protein in complex with Hsp60 changes its conformation (inactivated-activated form). The formation of Hsp60-Akt1 complex to convert of Akt1 conformation from closed to open (activated) form allowing the protein to be sensitive for phosphorylation of active Akt1 amino acid derivatives, such as Thr 308.

We suggest that the inactive stable link between amino acids His194-Thr 308-Arg274-Asp292 in key signature of Akt1 is responsible for the effective phosphorylation of Thr 308.

MOLECULAR DYNAMICS OF HUMAN TYROSYL-tRNA SYNTHETASE ACTIVE CENTER IN THE COMPLEX WITH TYROSYL-ADENYLATE

SAVYTSKYI O. V., KORNELIYUK A. I.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: savytskyi@moldyngrid.org*

Tyrosyl-tRNA synthetase (TyrRS) is a key enzyme of protein biosynthesis, which catalyzes the aminoacylation of tRNA^{Tyr} via tyrosyl-adenylate intermediate formation. Once formed, the aminoacyl-adenylate is stabilized by specific interactions at the enzyme active site.

In this work we have studied the conformational changes in human tyrosyl-tRNA synthetase induced by tyrosyl-adenylate formation using computational MD simulations.

Three-dimensional structure of the complex of full-length HsTyrRS with tyrosyl-adenylate and K⁺ ion was constructed in Modeller 9.7 using structure templates from RCSB PDB. The 100 ns MD simulations were performed in grid environment using the services of MolDynGrid virtual laboratory (<http://moldyngrid.org/>) and computed using NAMD 2.10 software in Charmm27 force field. The Distributed Analyzer Script was used for analytical tools automation (Savytskyi et al, 2011).

Root mean square deviation (RMSD) analysis revealed relaxation period after 20 ns of MD simulation time. It was found that tyrosyl-adenylate bound at the active site via hydrogen bonds interactions with more than 10% of time: Thr42 – 76.08%, Asp173 – 76.08%, Tyr39 – 71.24%, Trp40 – 46.14%, Gln170 – 42.46%, Ala43 – 16.85%, Asn212 – 16.33% and Val215 – 13.49%. The lowest values (~ 0.06 nm) of root mean square fluctuation (RMSF) in active site were observed for the catalytic KMSSS loop in monomer A in the complex with substrate, while in monomer B in the absence of substrate they were much higher (~ 0.2 nm). The α -helix and β -turn formations in Asp343 – Asp369 region were revealed for 5-90 ns time interval at the inter-domain linker.

The conformational changes both at the active site and at the interdomain linker of human tyrosyl-tRNA synthetase in the complex with tyrosyl-adenylate were observed during MD simulations. The active site of monomer A in the complex revealed more compact conformation with lower values of RMSF in comparison with free monomer B. Some local conformational changes, i.e. antiparallel β -sheet and β -turn formations have been observed at the linker.

This work was supported by National Academy of Sciences of Ukraine (grants 15/2010-2014). O. S. was supported by the Federation of European Biochemical Societies for Youth Travel Funds (Y/10/35, Y/11/38, Y/13/24).

EVOLUTIONARY ANALYSIS OF ARCHITECTURE AND EXTRACELLULAR DOMAIN SEQUENCE OF SID-1 FAMILY PROTEINS

SAPOZHNIKOVA V. O., BARANNIK T. V.

*V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine;
e-mail: valeria93@ukr.net*

Systemic RNA interference-defective-1 (SID-1) family includes transmembrane dsRNA channels, that passively transport dsRNA and do not require ATP. Proteins play role in systemic RNA interference and are widely spread among animals (Feinberg E.H., 2003). In human two paralogues are present: SIDT1 playing role in systemic RNA interference and SIDT2 transporting dsRNA into lysosomes. Bioinformatics and biochemical data predict SIDT1 to contain a large (300 amino acids) extracellular domain (ECD) and 11 transmembrane domains, but the exact mechanisms of RNA transport are unknown (Elhassan M.O., 2011). ECD could play role in substrate recognition and transport regulation through Cys-Pro motifs having been predicted as potential heme-binding sites in our previous investigation. So the aim of this research was to analyze domain structure and evolutionary conservation of ECD in SID-1 family in *Metazoa*.

The search of homologous protein sequences was performed using BLASTP algorithm against non-redundant database with SIDT1 protein of *Homo sapiens* as query (NP_060169). Only sequences with a threshold value lower than 10^{-10} were chosen for the analysis. Domain architecture was analysed using Pfam server (<http://pfam.sanger.ac.uk>). Multiple alignment was constructed in MEGA 6.0 tool using ClustalW algorithm. Phylogenetic trees were built in MEGA 6.0 tool using Neighbor Joining and Maximum Likelihood method with 1000 bootstrap replicates.

Sequence analysis showed SIDT1 homologues to exist in most *Metazoa*, *Choanoflagellata* and *Amoebozoa* taxa sequenced for today. So SID-1 gene possibly emerged in common ancestor of these groups and was lost later in fungi and some invertebrates. For example, SID-1 homologue is absent in *Drosophila melanogaster*. The analysis of phylogenetic trees also revealed the presence of one to six SID-1 paralogues with different domain architecture in one specie. Thus the evolution of this gene was accompanied by several gene duplications and losses.

The sequence analysis showed domain architecture of this protein to be very diverse in invertebrates with one to five dsRNA-gated channel SID-1 domains. Some of homologues contain other functional domains involved in reception or in signal transduction, such as scavenger receptor cysteine rich domain in *Strongy-*

locentrotus purpuratus (Echinodermata), protein kinase domain in *Danaus plexippus* (Insecta) and WD40 domain in *Crassostrea gigas* (Mollusca). Several SID-1 homologues with different domain architecture may be present in one organism as it is shown in *Amphimedon queenslandica* (Spongia) having four different SID-1 homologues with 1, 2, 3 and 5 SID-1 domains. Comparing with SID-1 domain ECD is poorly conserved in invertebrates and varies greatly by length from absence (*Amoebozoa*, *Placozoa*) to more than 400 amino acid residues (*Mollusca*). In vertebrates these proteins share one type of domain architecture with one SID-1 domain and ECD of about 300 amino acid residues.

Cys-Pro-Val (CPV) motif has evolved in *C. elegans* in CHUP-1 protein but is absent in SID-1 protein involved in capture of environmental RNA. Starting from nematode this motif is present in SID-1 proteins of all invertebrates taxa with exception of some species like *Apis mellifera*. Vertebrates have ECD with absolutely conservative CPV motifs and new vertebrate-specific PC motif. Cysteines in both motifs are predicted not to form disulfide bridges. Taking into account the wide involvement of cysteine residues in redox regulation and metal or heme binding we can suggest the regulatory role of ECD with conservative CP/PC motifs. The fact that the single type of SID-1 architecture with one type of ECD was inherited in common ancestor of vertebrates suggests the importance of these structural features for systemic RNA interference in vertebrates.

КАРБОНГІДРАЗНА АКТИВНІСТЬ ПРОТЕЇНОВИХ КОМПЛЕКСІВ ТИЛАКОЇДНИХ МЕМБРАН ХЛОРОПЛАСТІВ ШПИНАТУ

СЕМЕНІХІН А. В., ЗОЛОТАРЬОВА О. К.

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: membrana@ukr.net*

Мембранозв'язаний бікарбонат виконує кофакторну роль у хлоропластах, стимулюючи фотосинтетичний електронний транспорт і фотофосфорилування. Ефект бікарбонату може бути опосередкований множинними формами тилакоїдної карбоангідрази (КА), локалізація яких визначена лише частково, а функціональну роль дотепер не встановлено. Раніше за вивчення тилакоїдів гороху і арабідопсису було показано, що в складі фотосистеми II присутні два компоненти, що виявляють карбоангідразну активність. У мембранних фрагментах тилакоїдів, збагачених ФСІ, також було знайдено зв'язану КА. Метою роботи було визначення активності КА основних поліпептидних комплексів тилакоїдних мембран хлоропластів шпинату (*Spinacia oleracea* L.).

Хлоропласти ізолювали із свіжого листя шпинату, гомогенізуючи їх у крижаному ізоосмотичному буфері. Після порушення хлоропластів в гіпотонічному середовищі осад тилакоїдів збирали центрифугуванням і декілька разів промивали від розчинних компонентів. Для солюбілізації протеїнових комплексів очищені тилакоїдні мембрани інкубували протягом 30 хв у 10%-му розчині дигітоніну за співвідношення детергент/протеїн 8 : 1 у присутності інгібіторів протеїназ 0,75 М амінокапронової кислоти і 1 мМ фенілметилсульфонілфториду. Солюбілізовані протеїни відокремлювали центрифугуванням при 140 000 g. Головні інтегральні поліпептидні комплекси фотосинтетичних мембран хлоропластів шпинату – фотосистеми I і II (ФСІ і ФСІІ), цитохромний b6f комплекс і АТР-синтазу розділяли методом нативного електрофорезу зі зміщенням заряду. Положення зон гелю, які містили АТР-синтазний комплекс і його відокремлену каталітичну частину (CF₁), визначали за допомогою кольорової реакції на АТРазну активність. Цитохромному b6f комплексу тилакоїдів відповідала зона, яка завдяки присутності цитохромів має червоний колір в нефарбованому гелі. Локалізацію цитохромного b6f комплексу, АТР-синтази і CF₁ підтверджено аналізом субдинічного складу відповідних протеїнових зон нативного гелю після електрофоретичного розділення в другому напрямку в системі Леммлі за присутності DSNa. Карбоангідразну активність в поліпептидних смужках нативного гелю визначали за допомогою рН-залежної кольорової реакції з використанням індикатора бромтимолового блакитного. Наявність КА показано в комплексі фотосистеми 2, в цитохромному b6f

комплексі і в АТР-синтазі. Показано, що поліпептидні зони, які виявилися каталітично активними в реакції гідролізу АТР, виявили також і карбоангідразну активність, тобто здатними каталізувати інтерконверсію вуглекислого газу в бікарбонат із вивільненням і поглинанням протонів відповідно.

Одержані дані підтверджують наявність множинних форм карбоангідрази, пов'язаних із поліпептидними комплексами тилакоїдних мембран хлоропластів шпинату, і свідчать на користь їх участі в перенесенні протонів від центрів утворення до АТР-синтази.

ВПЛИВ ЦИТОТОКСИЧНОГО ЛЕКТИНУ *Bacillus subtilis* НА ДОЗРІВАННЯ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН *in vitro*

СИДОР Р. І., ХРАНОВСЬКА Н. М., СКАЧКОВА О. В.,
СВЕРГУН Н. М., ГОРБАЧ О. І.

Національний інститут раку, Київ, Україна;
e-mail: creatogen@gmail.com

Використання протипухлинних автовакцин займає одне із провідних місць у структурі імунотерапевтичних методів лікування хворих на злоякісні новоутворення. Включення до складу протипухлинних вакцин антигенпрезентуючих дендритних клітин (ДК), що використовуються як природні ад'юванти, сприяє посиленню імунної відповіді на антигени пухлини. Дозрівання ДК може бути досягнуто кількома стимулами: патогенасоційованими молекулами або ендогенними сигналами небезпеки.

Метою роботи було вивчити вплив екзогенних цитотоксичних лектинів (ЦЛ) непатогенних бактерій *Bacillus subtilis* на дозрівання ДК для створення ефективніших конструкцій протипухлинної вакцини.

Для вивчення впливу ЦЛ на ступінь зрілості ДК та їхню здатність продукувати ІЛ-12 було використано ДК 10 здорових донорів. ДК генерували з моноцитів периферичної крові *ex vivo* в присутності GM-CSF та ІЛ-4 протягом 8 днів. ЦЛ *B. subtilis* додавали до незрілих ДК на 6-й день культивування. Рівень зрілості і функціональну активність ДК оцінювали за експресією поверхневих маркерів CD83, CD86 та HLA-DR методом проточної цитометрії та за рівнем експресії мРНК ІЛ-12p35, ІЛ-12p40 методом ПЛР у реальному часі.

ЦЛ у різних концентраціях значно підвищують рівень експресії мРНК ІЛ-12p40, ІЛ-12p35. Інкубація ДК у присутності ЦЛ спричинює збільшення рівня експресії мРНК цитокінів в 2–10 разів порівняно з ДК, що культивувалися в присутності тільки ростових факторів. Ефект ЦЛ на рівень зрілості ДК дозозалежний, про що свідчить аналіз поверхневих маркерів ДК. ЦЛ сприяють істотному збільшенню експресії CD86/HLA-DR (до $(89,44 \pm 5,26)$ % проти $(55,94 \pm 12,0)$ % у контролі, $P < 0,05$) і незначно збільшують експресію CD83. Найпомітніші зміни в експресії маркерів зрілості ДК спостерігаються за дії ЦЛ в концентраціях 0,04–0,1 мг/мл.

Таким чином, культивування ДК у присутності цитотоксичних лектинів *B. subtilis* є ефективним способом стимулювати дозрівання ДК. Найвищу активність у стимуляції дозрівання ДК виявляють ЦЛ в концентраціях 0,04–0,1 мг/мл.

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

*СИЧЕВСКАЯ Л. В., ОВСЯННИКОВА Т. Н., КРАСОВА Н. С.,
ГЛАДКИХ А. И., ПЛАТОНОВА А. А.*

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: ta_ov10@mail.ru*

В организме животного и человека в состоянии гипергликемии усиливаются окислительные процессы и увеличивается образование и накопление свободных радикалов. Прежде всего растет концентрация супероксиданиона, который, вступая в реакции, генерирует такие радикальные формы, как гидроксил-радикал, пероксид водорода. Супероксиданион, взаимодействуя с оксидом азота, генерирует образование пероксинитрита (ONOO^-), который обладает цитотоксическим действием. Накопление его в живом организме активизирует процессы пероксидного окисления, нитрозилирования протеинов, генерирует разрывы ДНК и т.д. Одним из ранних показателей наличия или развития осложнений при сахарном диабете (СД) является высокое содержание нитротирозинмодифицированных протеинов в тканях организма, что влияет на структурно-функциональное состояние клеточных мембран. В данной работе была предпринята попытка оценить степень структурных изменений мембран эритроцитов крови кроликов с экспериментальным СД 2-го типа. Изменения поверхностных свойств эритроцитарных мембран оценивали с помощью флуоресцентного зонда АНС, по степени эксимеризации пирена оценивали изменение гидрофобной области липидного бислоя мембран. Структурную динамику мембранных протеинов эритроцитов крови кроликов исследовали методом тушения триптофановой флуоресценции ионами иода и акриламидом. Как следует из полученных нами данных, изменение интенсивности флуоресценции АНС в препарате эритроцитарных мембран экспериментальной группы животных указывает на более эффективное взаимодействие молекул зонда с поверхностно локализованными центрами связывания. Константа связывания зонда для экспериментальной группы ($K_c = (12,2 \pm 0,5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) на 34% превышает значение константы ($K_c = (9,1 \pm 0,2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) для контрольной группы животных. Увеличение интенсивности флуоресценции АНС свидетельствует о перераспределении поверхностных заряженных групп на мембране и об уменьшении ее отрицательного поверхностного заряда. Расчеты показывают, что поверхностный потенциал мембран эритроцитов экспериментальной группы уменьшается на 7,7 мВ по сравнению с контролем. Изменение зарядной структуры биомембран обусловлено, прежде всего, изменением молекулярной организации мембранной поверхности. Результаты исследований эксимеризации пирена не показывают значимых изменений структуры гидрофобной области липидного бислоя эритроцитарных мембран при СД 2-го типа. Рассчитанные значения степени эксимеризации зонда для препаратов мембран контрольной группы и группы с экспериментальным СД составляют $0,32 \pm 0,04$ и $0,34 \pm 0,01$ соответственно. Структурную подвижность протеиновых молекул эритроцитарных мембран оценивали по изменению константы Штерна–Фольмера (K_{sv}). Эффективность тушения ионами йодида поверхностной протеиновой флуоресценции мембран эритроцитов экспериментальной группы животных ($K_{sv} = 0,72 \pm 0,03$) на 19% меньше по сравнению с мембранами контрольной группы ($K_{sv} = 0,88 \pm 0,06$). В условиях модельной гипергликемии не наблюдается достоверных отличий структурной подвижности гидрофобной области протеиновых глобул эритроцитарных мембран при тушении триптофановой флуоресценции акриламидом ($K_{sv} = 4,06$ для образцов обеих групп). Полученные результаты позволяют предположить, что изменения при гипергликемии происходят в основном в поверхностных слоях мембран эритроцитов, а образующиеся в этих условиях в организме свободные радикалы могут быть нейтрализованы ассоциированным с внутренним поверхностным слоем мембраны гемоглобином, имеющим сопряженную систему пи-электронов, легко присоединяющую и отдающую электроны.

ПОШУК ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ ASK1 СЕРЕД ПОХІДНИХ 1-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-3-ГІДРОКСІ-5-ФЕНІЛ-1,5-ДИГІДРО-ПІРОЛ-2-ОНУ

*СТАРОСИЛА С. А., ВОЛИНЕЦЬ Г. П., БДЖОЛА В. Г.,
ЯРМОЛЮК С. М.*

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: starosila@gmail.com*

Протеїнкіназа ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) є важливою ланкою сигнальних каскадів, які регулюються мітогенами (МАРК). ASK1 активує два шляхи трансдукції сигналів: (МКК4)/МКК7-JNK та МКК3/6-p38, що залучені до регуляції процесів проліферації, диференціювання та апоптозу клітин. Підвищена активність ASK1 спостерігається за розвитку низки серцево-судинних, нейродегенеративних, запальних, інфекційних захворювань та кількох різновидів раку. Таким чином, ASK1 є важливою терапевтичною мішенню.

Метою роботи була розробка нових низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази ASK1 із використанням методів комп'ютерного моделювання та біохімічного тестування.

На першому етапі за допомогою пакету програм DOCK 4.0 проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки, що налічувала 94 126 сполук. Для тестування *in vitro* відібрано 186 лігандів із показниками енергії їх взаємодії з АТР-зв'язувальним сайтом ASK1 нижче -50 ккал/моль. Виявлено, що сполука 5-(4-хлоро-феніл)-4-(фуран-2-карбоніл)-3-гідроксі-1-(6-метоксі-бензотіазол-2-іл)-1,5-дигідро-пірол-2-он пригнічує активність ASK1 із $IC_{50} = 3,5 \mu\text{M}$. Для вивчення залежності активності класу 1-бензотіазол-2-іл-3-гідроксі-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-онів від їх хімічної структури, було синтезовано 94 похідних. Ці сполуки протестовано *in vitro*. Серед них виявлено 34 активні речовини зі значеннями IC_{50} в діапазоні від 520 nM до 63 μM . Спираючись на ці дані та ретельне вивчення комплексів активного центру протеїнкінази ASK1 з досліджуваними сполуками, одержаними внаслідок проведення докінгу, було побудовано залежність «структура-активність» цього класу інгібіторів та запропоновано два способи зв'язування з АТР-акцепторним сайтом ензиму.

У процесі аналізу взаємодій сполук класу 1-бензотіазол-2-іл-3-гідроксі-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-онів із амінокислотними залишками активного центру протеїнкінази ASK1 встановлено, що ключову роль в інгібувальній здатності сполук відіграють гідрофобні ефекти. Більшість сполук мають подібний механізм зв'язування з активним центром ензиму. 1,5-дигідро-пірол-2-онове кільце взаємодіє з шарнірною ділянкою протеїнкінази, утворюючи один або два водневі зв'язки з V757 та E755. Ароматичні кільця сполук утворюють гідрофобні та π -катионні зв'язки з низкою амінокислотних залишків. Альтернативний спосіб зв'язування виявляє інша група інгібіторів, на фенільному кільці яких є великі гідрофобні замісники. Інгібітори цієї групи, на відміну від попередніх, повернуті майже на 180° в активному центрі ензиму. При цьому вищезгадані гідрофобні замісники спрямовані в гідрофобну кишеню активного центру, а 1,5-дигідро-пірол-2-онове кільце утворює водневі зв'язки із S761 в шарнірній ділянці. Це забезпечує сильнішу взаємодію лігандів із протеїнкіназою і тому більшість інгібіторів цієї групи мають кращу інгібувальну активність.

Застосування рецепторно-орієнтованого віртуального скринінгу дозволило ідентифікувати новий клас інгібіторів протеїнкінази ASK1 – похідні 1-бензотіазол-2-іл-3-гідроксі-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-ону, що можуть бути використані в наступних біологічних експериментах із застосуванням культур клітин.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ НА ОТДЕЛЬНЫХ ЭТАПАХ ЭКЗОЦИТОЗА *IN VITRO*

ТРИКАШ И., ГУМЕНЮК В.

*Институт биохимии им. А. В. Паладина НАН Украины, Киев;
e-mail: trikash@biochem.kiev.ua*

Синаптическая передача осуществляется многократными раундами процессов эндоцитоза и экзоцитоза синаптических везикул (СВ), которые, в основном, изучаются на уровне клетки. Нами были разработаны методические подходы, которые позволили визуализировать процессы эндо- и экзоцитоза в изолированных нервных окончаниях, а также изучить два отдельных этапа экзоцитоза – докинг СВ и их Ca^{2+} -регулируемое слияние с мембранами-мишенями в бесклеточной системе.

Квантовые точки Q620 и конфокальная микроскопия дают уникальную возможность визуализировать процессы эндо- и экзоцитоза в синапсом. Размер квантовых точек (около 15 нм) позволяет поместить их внутрь СВ, но не позволяет им диффундировать через мембрану. Синапсомы представляют собой замкнутые нервные окончания и содержат необходимые протеиновые компоненты для рециклинга СВ. Окрасивание плазматических мембран флуоресцентным зондом R18 позволило визуализировать границы синапсом. Добавление 30 мМ KCl к суспензии синапсом стимулирует эндоцитоз, что позволяет ввести наночастицы (квантовыми точками) внутрь нервных окончаний. Такой подход позволил нам получить изображение отдельных фаз цикла СВ, а именно эндо- и экзоцитоз.

Методами лазерно-корреляционной спектроскопии и электронной микроскопии было обнаружено, что в среде, содержащей цитозольные протеины синапсом, образуются кластеры СВ диаметром 200–400 нм. Кластеризацию СВ в бесклеточной системе мы рассматриваем как моделирование одного из этапов экзоцитоза – докинга СВ, при котором липидные бислои взаимодействующих мембран не сливаются. Стимулированное кальцием слияние СВ с мембранами-мишенями *in vitro* отражает последний этап экзоцитоза. С помощью флуоресцентного зонда R18 нами было изучено кальцийрегулируемое слияние СВ друг с другом (гомотипные мембраны) или с плазматической мембраной синапсом (гетеротипные мембраны). Использование сканирующей конфокальной микроскопии позволило визуализировать и отделить изучаемые в бесклеточной системе этапы экзоцитоза – докинг/кластеризацию СВ от Ca^{2+} -индуцированного слияния мембранных структур нервных окончаний.

Выражаем глубокую признательность компании ОПТЭК за поддержку этой работы.

ЕСТЕРИ ТІА- ТА СУЛЬФОНІКАЛІКСАРЕНМЕТИЛФОСФОНОВИХ КИСЛОТ ЯК ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНТИРОЗИНФОСФАТАЗ

*¹ТРУШ В. В., ²ХАРЧЕНКО С. Г., ²БОРЕЦЬКИЙ А. Л., ¹ТАНЧУК В. Ю.,
²КАЛЬЧЕНКО В. І., ¹ВОВК А. І.*

*¹Институт біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;
²Институт органічної хімії НАН України, Київ;
e-mail: trush@bpci.kiev.ua*

Каліксарени – макроциклічні молекули з унікальною тривимірною структурою є перспективними для досліджень в біоорганічній хімії та медицині. Похідні каліксаренів виявляють антибактеріальні, протівірусні та протиракові властивості. Однак їх аналоги – тіакалікс[4]арени з біологічно активними фрагментами, які містять в макроциклічному кістяку чотири атоми сірки замість СН₂ груп, в літературі майже не описані. Введення чотирьох атомів сірки в молекулярний кістяк приводить до збільшення розміру її порожнини та відображається на геометрії макроциклу порівняно з класичними

каліксаренами. Наявність сірки також дає можливість модифікації сульфідних містків окисненням до сульфоксидних або сульфонових фрагментів.

В цій роботі нами вивчено вплив похідних тіакалікс[4]аренів на активність людських протеїнтирозинфосфатаз SHP2, CD45, MEG2, MEG1, TC-PTP та PTP1B. Встановлено, що естери тіа- та сульфонілкалікс[4]аренметилфосфонових кислот можуть ефективно і селективно інгібувати активність PTP1B. Відомо, що цей ензим, включаючись до регуляції інсулінзалежних сигнальних процесів, може сприяти розвитку діабету 2-го типу, ожиріння та раку молочної залози.

Аналіз кінетичних даних показав, що дані сполуки можуть конкурувати із субстратом за місце зв'язування в активному центрі PTP1B з константами інгібування в наномолярному діапазоні значень. За допомогою флуоресцентної спектроскопії показано здатність фосфонатних похідних тіа- та сульфонілкалікс[4]аренів, взаємодіяти з людським сироватковим альбуміном, що може вказувати на можливі механізми біологічного транспорту подібних макроциклічних сполук.

За допомогою молекулярного докінгу з використанням програми AutoDock 4.2 з'ясовано можливі способи розміщення інгібіторів в активному центрі PTP1B. Для розрахунків використано декілька кластерів ензиму з відкритою та закритою WPD-петлею. Виходячи з отриманих енергій докінгу, зроблено висновки щодо найвигіднішої конформації ензиму, яка бере участь в комплексоутворенні. Показано, що значну роль у формуванні ензим-інгібіторного комплексу відіграють гідрофобні зв'язки.

Отже, фосфоровмісні похідні тіа- та сульфанилкалікс[4]аренів можуть бути використані як перспективна молекулярна платформа для конструювання неіоногенних фосфонатних інгібіторів протеїнтирозинфосфатаз, спрямованого на пошук нових ліків від поширених хвороб.

КАРБОАНГІДРАЗНА АКТИВНІСТЬ ІЗОЛЬОВАНОГО ЧИННИКА СПРЯЖЕННЯ CF₁ ХЛОРОПЛАСТІВ ШПІНАТУ

ХОМОЧКІН А. П., СЕМЕНІХІН А. В., ЗОЛОТАРЬОВА О. К.

*Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: membrana@ukr.net*

У хлоропластах, мітохондріях і бактеріях синтез і гідроліз АТР, сполучений з трансмембранним перенесенням протонів, здійснюється мембранозв'язаним ензимом – АТР-синтазою. Він складається з гідрофобної частини – F_o, функціонуючої як протонний канал, і гідрофільної частини – чинника спряження F₁, що містить нуклеотидзв'язуючі центри і виконує каталітичні функції. Чинник спряження хлоропластів – CF₁, подібно каталітичним частинам мітохондріальних і бактеріальних АТР-синтаз, складається з п'яти типів поліпептидів в стехіометричному співвідношенні $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. На відміну від інших F₁АТРаз АТРазна активність ізольованого CF₁ є латентною (скритою) і зростає за нагрівання, обробки тіоловими сполуками, трипсином, спиртами, оксіаніонами або детергентами.

Тилакоїди одержували із свіжого листа шпинату. Водорозчинну CF₁АТРазу ізольовали, обробляючи тилакоїдні мембрани розчином ЕДТА. Чистоту ізольованого CF₁ тестували електрофорезом в нативних умовах, а його субодиничний склад – денатуруючим електрофорезом у присутності DSNa. Латентну ізольовану CF₁АТРазу активували прогріванням при температурі 60 °С протягом 2 хв або обробкою трипсином. Розчин трипсину в 1 мМ НСІ вносили до концентрації 100 мкг/мл до 30–40 мкг очищеного ензиму або грубого ЕДТА-екстракту. Дія трипсину зупинялася додаванням дворазової кількості соєвого інгібітора трипсину. Са-залежну АТРазну активність ензиму виміряли за вивільненням неорганічного фосфату методом Лоурі і Лопеса. Активність латентного ензиму становила 0,9 мкмоль Фн/хв на 1 мг протеїну.

Карбоангідразну активність ізольованого CF₁ визначали безпосередньо в гелі за допомогою рН-залежної кольорової реакції в присутності індикатору бромтимолового блакитного або у розчині за допомогою інфрачервоного газового аналізатора (ІФГА) (S151, Qubit Systems Inc., Канада). Швидкість

дегідратації HCO_3^- визначали ІФГ-аналізом за збільшенням концентрації CO_2 в газовій фазі над реакційним середовищем у відповідь на додавання надлишку бікарбонату натрію.

Аналіз ізольованого препарату CF_1 в нативному гелі за допомогою рН-індикатора бромтимолового синього показав, що під час занурення гелю в буферний розчин, насичений CO_2 , в місцях локалізації CF_1 колір поліпептидної зони змінюється із синього на жовтий, що вказує на активацію конверсії вуглекислого газу з утворенням бікарбонату і протонів. За додавання препарату CF_1 до розчину бікарбонату натрію швидкість дегідратації HCO_3^- значно зростає. Водорозчинний інгібітор карбоангідрази ацетазоламід подавляє ензиматичну активність. Інший інгібітор сульфаніламідної природи – ліпофільний етоксизоламід на швидкість дегідратації HCO_3^- майже не впливає.

Таким чином, ізольована каталітична частина АТР-синтази – мультисубодиничний чинник спряження CF_1 поряд з АТРазною має також і карбоангідразну активність. Здатність CF_1 каталізувати взаємоперетворення форм вугільної кислоти можливо має функціональне значення для забезпечення ефективної роботи АТР-синтазного комплексу, полегшуючи протонний обмін, пов'язаний з фотофосфорилуванням і гідролізом АТР.

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИФІДАНТНИХ РЕЧОВИН У ГРИБІВ РОДУ *Lactarius*

^{1,2}ЦИВІНСЬКА М. В., ³АНТОНЮК В. О.

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

²Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
при ГУМВС України у Львівській області;

³Інститут біології клітини НАН України, Львів;
e-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua

Антифідантними називають такі біологічно активні речовини, що виділяють деякі живі організми для відлякування потенційних ласунів. Термін *Антифіданти* близький за значенням до терміну *репеленти*. Репеленти (від латинського *repello* — відштовхую, відганяю), речовини, що відлякують членистоногих (комахи і кліщів), ссавців і птахів. Всі гриби роду *Lactarius* виділяють молочний сік, які містять антифідантні речовини, але в деяких з них цей сік є надзвичайно пекучим. Такі гриби, поки вони молоді і містять молочний сік, не поїдаються тваринами і комахами і не бувають червивими. Особливо пекучий (перцевий) молочний сік у видів *Lactarius pergamenus*, *L. vellereus*, *L. piperatus*, *L. controversus*. Пекучі речовини цих видів дуже лабільні і пекучий смак їхніх плодових тіл зникає у разі висушування та заморожування. Екстракція метанолом також призводить до втрати цих речовин. Однак їх можна екстрагувати метиленхлоридом або петролейним ефіром в інертній атмосфері. Тонкошарові хроматограми екстрактів зі свіжих, заморожених і висушених грибів в УФ-світлі мають відмінності. Розділення метиленхлоридного екстракту свіжих грибів здійснювалось на колонці силікагелю елюцією органічними розчинниками. Колонки послідовно промивали: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{EtAc} 2:1 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{EtAc} - \text{CH}_3\text{OH} 4:2:1 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$, внаслідок чого виділено 6 фракцій. Хімічний склад одержаних окремих фракцій встановлювали за допомогою газо-рідинної хроматографії–мас-спектрометрії (ГРХ–МС). Встановлено, що речовини пекучого смаку належать до сесквітерпенів і містяться у фракції № 3. За даними ГРХ–МС у молочному соці *Lactarius pergamenus* ідентифіковано понад 40 речовин. Виявлено, що молочний сік *Lactarius pergamenus* є складною сумішшю речовин, в якій домінують три групи речовин: 1) сесквітерпени, 2) фталати, 3) вищі жирні кислоти та їх похідні (ефіри або аміди). Слід відмітити, що такий високий вміст фталатів є доволі рідкісним явищем для базидіомікотових грибів та вищих рослин. На наш погляд, функція фталатів та сесквітерпенів – антифідантна і репелентна, жирних кислот та їх похідних – стабілізація молочного соку як емульсії.

Нами також встановлено, що фракція з найвищим вмістом сесквітерпенів має антимікробну та протигрибкову дію і може бути використана для лікування мікозів стоп. Фталати (зокрема диме-

тилфталат) використовуються в кремах, аерозолях, емульсіях, лосьйонах для відлякування комарів і кліщів (Дифталар крем, Тайга, камарант, кедр-лосьйон). Тому імовірно, що такий високий вміст фталатів у плодкових тілах *Lactarius pergamenus* служить грибам для захисту від комах.

Сесквітерпени грибів роду *Lactarius* виявляють також виражену цитостатичну дію відносно клітин лінії L1210 мишачого лейкозу. Основний сесквітерпен висушених грибів – 3,14,15-триметилфурано-лактаран-8-ол. Цю речовину можна виявити на хроматограмах за інтенсивною жовто-зеленою флуоресценцією, являє собою густу рідину жовтого кольору, що застигає при мінус 17 °С і є відносно стійкою при зберіганні при низькій температурі без доступу повітря. У свіжих грибах вона відсутня.

Звертає на себе увагу також дуже високий вміст стеаринової кислоти в плодкових тілах *Lactarius pergamenus* та *L. piperatus*, яка може бути хімічним ідентифікатором цих грибів.

Очевидно, що молочний сік грибів роду *Lactarius* є збалансованою сумішшю речовин, необхідних для захисту їх від поїдання або пошкодження різноманітними мікро- та макроорганізмами та речовин, що обумовлюють їх рівномірний розподіл та стійкість емульсії, яка вдосконалювалась внаслідок багаторічної еволюції цих організмів.

КАЛІКСАРЕН С-90 ЯК МОДИФІКАТОР СКОРОТЛИВОЇ АКТИВНОСТІ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

ЦИМБАЛЮК О. В.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

e-mail: otsymbal@bigmir.net

Кальцієва помпа плазматичної мембрани (ПМКА) виконує роль головної, високоафінної системи викачування іонів Са з міоплазми. Крім цього, ПМКА також виконує сигнальну функцію. Так, доведені взаємодії ПМКА з конститутивними ізоформами NO-синтази (NOS); ці контакти, за умови активного функціонування ПМКА, обумовлюють утримання NOS в пригніченому стані. Отже, можливість спрямованої модуляції активності ПМКА відкриває широкі перспективи корегування багатьох патологій. Тому питання розробки та дослідження сполук зі спрямованою дією на ПМКА є актуальним.

Відомі на сьогодні інгібітори ПМКА або не є селективними, або мають невелику спорідненість. Новою перспективною сполукою-інгібітором ПМКА є каліксарен С-90, який селективно та з високою спорідненістю інгібує Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу препаратів плазматичної мембрани міоцитів матки. Тому важливим було перевірити ефективність дії С-90 на багатоклітинних фрагментах гладеньких м'язів міометрія.

Було здійснено дослідження закономірностей впливу каліксарену С-90 (10 мкМ) на спонтанні та зумовлені (гіперкалієвим розчином і утеротонічним гормоном окситоцином) скорочення поздовжніх гладеньких м'язів матки щурів. Скоротливу активність досліджували тензометрично в ізометричному режимі; аналіз кінетичних властивостей скорочень здійснювали з розрахунком нормованих максимальних швидкостей, окремо фаз скорочення (V_{nc}) і розслаблення (V_{nr}).

Каліксарен С-90 змінює спонтанну скоротливу активність, спричинюючи вірогідне зменшення амплітуди і не впливаючи на частоту; при цьому має місце уповільнення фази розслаблення окремих скорочень (зменшення параметра V_{nr}). На фоні дії неселективного інгібітору NO-синтаз L-NAME (100 мкМ) каліксарен С-90 не спричинює зниження амплітуди спонтанних скорочень, а швидкість фази розслаблення повертаються до контрольного рівня.

Також каліксарен С-90 однаковою мірою спричиняє зниження сили як окситоциніндукованих (0,1 МО), так і K^{+} -спричинених (80 мМ) скорочень, не впливаючи на характер наростання сили скоротливих відповідей (нормовані максимальні швидкості фази скорочення залишаються на рівні контрольних показників). Швидкість розслаблення гладеньком'язових препаратів зазнає різноспрямованих

змін залежно від характеру стимулювання скоротливих відповідей: у разі окситоцинових скорочень знижується, а для K^+ -спричинених скорочень – зростає.

На фоні дії L-NAME каліксарен С-90 не пригнічує максимальну силу K^+ і окситоцинузмовлених скорочень, але спричиняє відносні зміни кінетичних параметрів скоротливих відповідей (в обох випадках – зниження V_{nr}). Таким чином, блокування синтезу NO призводить до усунення інгібування як спонтанних, так і спричинених скорочень гладеньких м'язів міометрія за дії каліксарену С-90.

Одержані результати дозволяють припустити, що зниження сили скорочень гладеньких м'язів міометрія за дії каліксарену С-90 відбувається за NO-залежним шляхом, тоді як уповільнення розслаблення (зменшення нормованої максимальної швидкості розслаблення V_{nr}) пов'язане із пригніченням Ca^{2+} -транспортувальної функції кальцієвої помпи плазматичної мембрани.

Автор висловлює щире подяку члену-кореспонденту НАН України професору В. І. Кальченку (ІОХ НАН України) за люб'язно наданий для досліджень каліксарен С-90 та члену-кореспонденту НАН України професору С. О. Костеріну (ІБХ НАН України) за обговорення експериментальних результатів.

ЛОКАЛІЗАЦІЯ ТА СТРУКТУРНЕ ОТОЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ ТРИПТОФАНУ В ЕВКАРІОТНІЙ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗІ

ЧИСТА С. В., ДРАГАН А. І., КОРНЕЛЮК О. І.

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: chistayasofia@gmail.com*

Тирозил-тРНК синтетаза ссавців складається з двох структурних модулів: NH₂-кінцевого каталітичного модуля (міні-TyrRS) та COOH-кінцевого некаталітичного ЕМАР II-подібного модуля. Відомо, що міні-TyrRS містить 3 триптофанових залишки (Trp40, Trp87 та Trp283), які є природними флуоресцентними зондами в просторовій структурі протеїну, причому Trp40 знаходиться в області активного центру ензиму, а Trp283 – в області зв'язування антикодона гомологічної тРНК. Завдяки цим зондам можна отримувати інформацію про властивості мікрооточення флуорофорів в протеїні та проводити моніторинг його конформаційних змін, які мають функціональне значення.

Мета роботи – аналіз динамічних аспектів функціонування тирозил-тРНК синтетази та характеристика локальних конформаційних змін ензиму.

Рекомбінантний протеїн міні-TyrRS одержано шляхом бактеріальної експресії в *E. coli* BL21(DE3) рLysE за стандартною методикою. Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), обладнаним термостатованим кюветотримачем. Комп'ютерний аналіз локального оточення залишків Trp в структурі протеїну проведено за допомогою програми PyMOL 1.3.

Аналіз експонованості залишків Trp40, Trp87 та Trp283 в міні-TyrRS проведено за допомогою сервера <http://curie.utmb.edu/getarea.html>. Розрахунки експонованості залишків триптофану в TyrRS вказують на екранований характер Trp40 (експонованість становить 8,8%) та експонований характер Trp87 (62,1%) і Trp283 (56,6%). Проаналізовано мікрооточення триптофанових залишків у сфері з радіусом 5 Å. Обчислювальний аналіз показав, що в заданій області навколо Trp40 знаходиться 5 гідрофобних та 2 гідрофільних залишки, в області Trp87 – 5 гідрофобних та 2 негативно заряджених (Glu88, Glu91) залишки, в області Trp283 – 3 негативно заряджених (Asp280, Glu281, Asp308) та 3 позитивно заряджених залишки (Arg279, Lys282, His305).

Вивчено параметри триптофанової флуоресценції тирозил-тРНК синтетази в розчині та виявлено локальну конформаційну зміну в температурному інтервалі 25–42 °С, який супроводжується зміщенням максимуму триптофанової флуоресценції від 337 до 340 нм.

Досліджено гасіння триптофанової флуоресценції тирозил-тРНК синтетази іонами Cs^+ , I^- та нейтральним гасником акриламідом. Константи Штерна–Фольмера для міні-TyrRS становлять 3,75; 6,26 та 13,22 M^{-1} у разі гасіння іонами Cs^+ , I^- та акриламіду відповідно, тоді як для L-Trp константи Штерна–

Фольмера дорівнюють 2,87; 12,94 та 16,37 М⁻¹. Відомо, що частота зіткнень гасника із флуорофором залежить від електростатичної взаємодії у разі протилежних знаків заряду гасника і протеїнової глобули або її окремої області в оточенні поверхні флуорофора. Високу ефективність гасіння флуоресценції міні-TyrRS іонами Cs⁺ можна пояснити наявністю негативно заряджених залишків в оточенні Trp87 та Trp283. Аналіз одержаних даних свідчить про ефективне гасіння флуоресценції залишків триптофану в міні-TyrRS, причому висока ефективність гасіння екранованого залишку Trp40 вказує на високу конформаційну рухливість активного центру ензиму завдяки флуктуаціям в наносекундному часовому інтервалі.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ НАТИВНОГО Glu-ПЛАЗМИНОГЕНА В ЧАСТИЧНО ГИДРОЛИЗОВАННУЮ ФОРМУ (Lys-ПЛАЗМИНОГЕН) НА ПОВЕРХНОСТИ АКТИВИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ

ЮСОВА Е. И., САВЧУК О. В.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: yusova07@mail.ru*

Плазминоген взаимодействует с плазматическими мембранами различных типов клеток и активируется до пламина (3.4.21.7), который принимает участие в регуляции их функциональной активности. Установлено, что на мембранах моноцитоидных клеток и эндотелиоцитов превращение плазминогена в активную протеиназу происходит через образование Lys-плазминогена – частично деградированной формы, отличающейся от нативной молекулы отсутствием N-концевого пептида и открытой конформацией с экспонированными лигандсвязывающими участками крингловых доменов. Показано, что экзогенный Lys-плазминоген, в отличие от Glu-плазминогена, ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную тромбином и коллагеном. Эффект Lys-плазминогена проявляется в присутствии апротинина и зависит от наличия 6-аминогексановой кислоты, блокирующей лизинсвязывающие участки. Возможно, ингибирующее влияние Lys-плазминогена обусловлено его взаимодействием с мембранносвязанными протеинами, которые экспонируются во время активации тромбоцитов и принимают участие в процессе агрегации. Однако данные об образовании Lys-плазминогена на поверхности тромбоцитов отсутствуют.

Целью работы было определить возможность перехода Glu-плазминогена в Lys-форму на поверхности активированных тромбоцитов.

Тромбоциты, полученные из плазмы крови человека, инкубировали непродолжительное время с Glu-плазминогеном и активировали тромбином. Агрегированные тромбоциты промывали дважды для удаления несвязавшегося плазминогена. Клетки выдерживали в гипотоническом растворе (0,2% NaCl) и отделяли мембранную фракцию центрифугированием. К ней добавляли 6-аминогексановую кислоту для десорбции плазминогена. В полученной надосадочной фракции плазминоген определяли по амидолитической активности после активации стрептокиназой. Идентификацию форм плазминогена устанавливали с помощью электрофореза в ПААГ при кислых значениях pH. Наблюдали прямую зависимость количества pNA, освобождаемого из специфического хромогенного субстрата пламина – S2251, от объема вносимой в инкубационную среду надосадочной жидкости, что свидетельствует о наличии в ней плазминогена. Данные электрофореза показали, что плазминоген, десорбированный с мембран тромбинактивированных тромбоцитов, находится в Lys-форме.

Таким образом, показана принципиальная возможность превращения Glu-плазминогена, ассоциированного с мембранами активированных тромбоцитов, в Lys-форму вследствие действия пламина, образующегося при участии эндогенных активаторов.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФРАГМЕНТІВ ПРОШИТОГО ФІБРИНУ
НА АКТИВАЦІЮ Glu-ПЛАЗМІНОГЕНУ ТКАНИННИМ
АКТИВАТОРОМ І ГІДРОЛІЗ ФІБРИНУ ПЛАЗМІНОМ**

ЯЦЕНКО Т. А., РИБАЧУК В. М., ГРИНЕНКО Т. В.

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

У процесі гідролізу фібринового згустку плазміном утворюються продукти деградації – проміжні високомолекулярні сполуки, що являють собою ділянки протофібрил – DDE-полімери, які гідролізуються до DDE-комплексів із подальшим утворенням корових фрагментів DD і E₃. Метою роботи було вивчення впливу фрагментів прошитого фібрину на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором та гідроліз фібрину плазміном.

Показано, що продукти гідролізу фібрину плазміном, за виключенням корового фрагмента E₃, виявляють стимулюючий вплив на активацію Glu-плазміногену tPA. Швидкість реакції активації в присутності DDE-полімерів і DDE-комплексу близька до такої полімерного фібрину. Стимулюючий ефект DD-фрагмента виявляється за відсутності E-фрагмента і становить близько 50% від ефекту фібрину. Одержані результати свідчать про те, що центри зв'язування плазміногену і tPA, які експонуються під час переходу фібриногену у фібрин і локалізовані в D-доменах молекули, за гідролізу фібрину плазміном залишаються на DD-фрагментах, тобто процес експонування має необоротний характер.

Дослідження впливу DDE-полімерів, DDE-комплексу та DD-фрагмента на гідроліз полімерного фібрину за активації плазміногену tPA показало, що DDE-полімери та DDE-комплекс зменшують швидкість лізису фібрину, виявляючи конкуренцію із фібрином за ензим, тоді як DD-фрагмент не впливає на V_{\max} лізису фібрину. Одержані дані про те, що ранні продукти гідролізу полімерного фібрину стимулюють активацію плазміногену tPA та зменшують швидкість лізису фібрину, свідчать, що на цих молекулах центри зв'язування проензиму та tPA ідентичні центрам зв'язування на фібрині.

Особливий інтерес має DD-фрагмент, що впливає на різні процеси: інгібує агрегацію тромбоцитів, гальмує полімеризацію фібрину, виявляє спорідненість до фібринового згустку і стимулює активацію Glu-плазміногену тканинним активатором.

З використанням методу ізомолярних серій було досліджено вплив DD-фрагмента на процес активації Glu-плазміногену tPA. Виявилось, що максимальний ефект спостерігається за молярного співвідношення проензим/фрагмент 1,0/1,3. Враховуючи структуру DD-фрагмента (ідентичні D-домени двох сусідніх молекул фібрину, прошиті ковалентно по γ -ланцюгам) і одержані дані, можна припустити, що сайт зв'язування плазміногену знаходиться в районі γ - γ -прошивки.

Одержані результати можуть бути основою для розробки тест-систем для визначення показників фібринолітичної системи, а також створення лікарських препаратів фібринолітичної дії.

II. РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ТА КЛІТИННИХ ФУНКЦІЙ

ДОПОВІДІ

**КОРРЕКЦІЯ ЭТОПОЗИДИНДУЦІРОВАНОГО СНИЖЕННЯ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТІ М'ЯШЕЧНОЇ ТКАНИ МОЛОДЫХ КРЫС
К ДЕЙСТВИЮ ИНСУЛИНА ПРИ ПОМОЩІ ИНГІБИТОРА
НЕЙТРАЛЬНОЇ СФИНГОМИЕЛИНАЗИ**БАБЕНКО Н. А., ТИМОФІЙЧУК О. А.НИИ биологии, Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: olga.timofijchuk@gmail.com

Церамиды (ЦЕР) – не только компоненты мембранных рафт, но и медиаторы клеточного сигнала в процессах пролиферации, онкогенеза, старения и развития инсулинорезистентности (ИР). Известно, что прединкубация различных типов тканей молодых крыс в присутствии С2- и С6-ЦЕР индуцирует увеличение уровня эндогенного ЦЕР, который приводит к нарушениям сигналинга инсулина через ингибирование фосфоинозит-3-киназы, протеинкиназы В/Акт и активации протеинфосфатазы 2А. Полагают, что, кроме синтеза ЦЕР *de novo*, одной из причин увеличения базального уровня липида в периферических тканях является повышение активности сфингомиелиназ (СФМаз). Известно, что важную роль в развитии резистентности тканей к действию инсулина, индуцированную пищевым рационом, обогащенного насыщенными жирами, играют церамиды, синтезированные *de novo*. Целью настоящей работы было изучение роли нСФМазы в развитии резистентности мышечной ткани к действию инсулина и возможности коррекции экспериментально индуцированного нарушения инсулин-стимулированного поглощения глюкозы при помощи ингибирования активности нСФМазы.

Исследования проводили на длинном разгибателе пальцев (ДРП) 3-месячных самцов крыс линии Wistar. В экспериментах *in vitro* мышцы опытной группы инкубировали: с 1) этопозидом (15 нМ, 90 мин); 2) GW 4869 (100 мкМ; 2 часа); 3) N-ацетилцистеином (НАЦ, 3 мМ, 2 ч), с последующим внесением в буфер этопозида, а мышцы контрольной группы – с 1) ДМСО; 2) NaCl (0,9%), которые добавляли в инкубационную среду (Кребс/бикарбонатный буфер; 37 °С, рН 7,5). По истечении 2 ч инкубации мышцы помещали в чистый Кребс/бикарбонатный буфер и одну из мышц каждой пары стимулировали инсулином (100нМ), а другую – 0,9%-ым NaCl. Через 30 минут инкубации добавляли [³H]-D-глюкозу (0,5 мКи/мл; 10 мин). После включения метки ткань отмывали 0,9%-ым NaCl и лизировали в 1 N NaOH (10 мин; 80 °С). Радиоактивность меченой [³H]-D-глюкозы определяли с помощью счетчика радиоактивности БЕТА. Экстракцию липидов выполняли методом Bligh и Dyer.

Показано, что инкубация ДРП 3-месячных крыс в присутствии этопозида приводит к повышению содержания ЦЕР на 53% в сравнении с контрольными животными, что сопровождается снижением чувствительности мышечной ткани к действию инсулина на 76% относительно контроля. Введение в среду инкубации НАЦ или специфического ингибитора нСФМазы GW4869 препятствует индукции этопозидом накопления ЦЕР в ДРП, что свидетельствует о том, что этопозидиндуцированное накопление ЦЕР обусловлено повышением активности именно нСФМазы. Прединкубация ДРП молодых крыс с НАЦ или GW4869 полностью отменяет эффект этопозида на инсулининдуцированное поглощение глюкозы в ткани-мишени, восстанавливая чувствительность скелетной мышечной ткани к действию инсулина до уровня контрольных животных.

Таким образом, этопозидиндуцированное снижение чувствительности скелетной мышечной ткани к действию инсулина коррелирует с накоплением ЦЕР в ДРП молодых крыс. Поскольку НАЦ, будучи предшественником глутатиона – негативного регулятора активности нСФМазы, нивелирует действие этопозида, и этот эффект имитируется специфическим ингибитором энзима, можно предположить, что церамид, образованный в клетках в процессе активации нСФМазы является важным модулятором инсулинового сигналинга в тканях-мишенях.

ІОНИ Ca ТА ПОЛЯРИЗАЦІЯ МЕМБРАН МІТОХОНДРІЙ МІОМЕТРІЯ*¹БАБІЧ Л. Г., ¹КАНДАУРОВА Н. В., ²БОЙКО В. І.**¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: babich@biochem.kiev.ua;**²Інститут органічної хімії НАН України, Київ*

Рівень поляризації мембран мітохондрій та обмін іонів Ca в них – ключові параметри, які відображають функціональний стан цих субклітинних органел. Гладеньком’язові клітини матки, оброблені розчином дигітоніну, накопичують 1900 ± 450 пмоль Ca^{2+} на 10^6 міоцитів за 5 хв при 37°C . У відсутності в середовищі інкубації АТР накопичення Ca^{2+} зменшується на 90% відносно контролю. При тих самих умовах фракція мітохондрій із міоцитів матки акумулює 149 ± 18 нмоль Ca^{2+} на 1 мг протеїну за 5 хв. У цьому разі за відсутності АТР у середовищі інкубації накопичення катіона зменшується на 98% відносно контролю. У подальших експериментах показано, що інкубація мітохондрій міометрія з 1 мкМ СССР, 10 мМ NaN_3 або 100 мкМ Ca^{2+} (середовище інкубації без АТР та Mg) призводить до швидкої деполіризації мітохондріальних мембран (рівень поляризації мітохондріальних мембран визначали за допомогою потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM). Введення у середовище інкубації АТР та іонів Mg запобігає Ca^{2+} -індукованій деполіризації мембран мітохондрій. Проте за відсутності АТР та Mg^{2+} внесення іонів Ca до інкубаційного середовища супроводжується збільшенням інтенсивності флуоресценції Ca^{2+} -чутливого зонда fluo 3AM, навантаженого в ізолюванні мітохондрії міометрія, що свідчить про акумуляцію катіона в матриксі. При цьому рівень іонізованого Ca в матриксі залежить від концентрації катіона в середовищі інкубації. Деполіризація мітохондріальних мембран, як відомо, веде до гальмування функціонування Ca^{2+} уніпортеру. Ми припускаємо, що у деполіризованих мітохондріях міометрія $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обмінник може виконувати роль системи, що забезпечує надходження іонів Ca до матриксу за наявності градієнта Ca^{2+} , спрямованого всередину органел. Пошук оборотних ефекторів, здатних модулювати рівень поляризації мітохондріальних мембран, має важливе як теоретичне, так і практичне значення. Останнім часом все більше уваги дослідники приділяють каліксаренам – макроциклічним сполукам, які одержують прецизійною циклоконденсацією *para*-заміщених фенолів та формальдегіду. Ми показали, що попередня інкубація пермеабілізованих клітин міометрія з 10 мкМ калікс[4]ареном C-136 або C-137 веде до збільшення поляризації мітохондріальних мембран, що може мати застосування за необхідності корекції величини мембранного потенціалу мітохондрій.

ПРОДУКУВАННЯ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ПУХЛИННИМИ КЛІТИНАМИ ЗАЛЕЖИТЬ ВІД РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk/CIN85*¹БАЗАЛІЙ А. В., ¹ПЕТУХОВ Д. М., ²ВОРОТНИКОВ О. В., ²ТКАЧУК В. А.,
¹КОМІСАРЕНКО С. В., ¹ДРОБОТ Л. Б.**¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
²Московський державний університет ім. М. В. Ломоносова, Росія;
e-mail: bazalii@biochem.kiev.ua*

Дослідженнями останніх років продемонстровано, що SH3-вмісний адаптерний протеїн Ruk/CIN85 залучений не тільки до регуляції нормального гомеостазу клітин, але й може відігравати важливу роль у канцерогенезі. Зокрема, у 2009 році було здійснено ідентифікацію протеїнів, які зв’язуються з SH3 доменами адаптерного протеїну Ruk/CIN85 *in vitro*, методом LC-MS/MS (Havrylyov et al., 2009). Серед нових потенційних зв’язувальних партнерів протеїн Tks4, один із компонентів інвадоподій, посів одне з перших місць за кількістю ідентифікованих пептидів і загальному перекриттю всієї

амінокислотної послідовності. Згодом було показано, що Tks4 є організатором NADPH-оксидазного комплексу, опосередкованого NOX1, взаємодіючи безпосередньо з NOXA1 (Gianni et al., 2009). Встановлено також, що надекспресія Ruk/CIN85 у слабоінвазивних аденокарциномних клітинах людини лінії MCF-7 призводить до посилення їх міграції, конститутивної активації Src-кінази і потужнішої та тривалішої активації Src, PI3K/Akt і Erk1/2 кіназ за дії EGF (Samoylenko et al., 2012). Наявні експериментальні дані дозволяють вважати, що рівень активності і тривалість активації сигнальних каскадів, що ініціюються рецепторними тирозиновими кіназами і контролюють такі важливі функції клітин як поділ і рух, залежать від функціонування пероксиду водню як нового вторинного посередника. Враховуючи сказане, проведені дослідження було скеровано на з'ясування ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у функціонуванні NADPH-оксидазного комплексу в пухлинних клітинах.

На моделях клітин аденокарциноми грудної залози людини (лінії MCF-7 та MDA-MB-231), карциноми ободової кишки людини (лінія HT-29) за допомогою хемілюмінесцентного методу з використанням люмінолу і пероксидази було продемонстровано залежність продукування активних форм кисню (АФК) від рівня експресії Ruk/CIN85. Попередня інкубація клітин з інгібітором збирання NADPH-оксидазного комплексу апоциніном супроводжувалась пригніченням продукування АФК, що дозволило припустити існування функціонального зв'язку між Ruk/CIN85 та NADPH-оксидазою. Обробка клітин MCF-7 зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 (сублінія G10) апоциніном призводить до зміни динаміки EGF-залежної активації кінази Akt – від тривалої до тимчасової. При цьому спостерігається пригнічення рухливості досліджуваних клітин у модифікованій камері Бойдена. На наступному етапі роботи було отримано рекомбінантні вектори HyPer-N1 та Ruk-HyPer-N1 для високоефективної експресії відповідних рекомбінантних протеїнів (сенсорів пероксиду водню) в клітинах ссавців, перевірено ефективність їх експресії в клітинах HEK293 методами Вестерн-блот аналізу та конфокальної мікроскопії. За допомогою прижиттєвої мікроскопії підтверджено співлокалізацію Ruk/CIN85 із продукцією пероксиду водню.

Дослідження здійснене за часткової фінансової підтримки спільного українсько-російського гранту 2012 р. між НАН України та Російським фондом фундаментальних досліджень.

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *PERP*, *EPAS1*, *E2F8* І *ATF3* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЗАЛЕЖНО ВІД ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ERN1

БОВА Д. О., МІНЧЕНКО Д. О., КАРБОВСЬКИЙ Л. Л., МІНЧЕНКО О. Г.

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

Характерною ознакою злоякісного росту є активація сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума. Недавно було показано, що ERN1 (endoplasmic reticulum – nuclei-1), один із сенсорно-сигнальних ензимів стресу ендоплазматичного ретикулума, є необхідним для проліферації клітин гліоми та неоваскуляризації пухлин. Пригнічення функції ERN1, що виявляє ензиматичну активність (кіназну та ендорибонуклеазну), блокує процеси ангиогенезу та проліферації і знижує інтенсивність росту гліоми. У зв'язку з цим, дослідження механізмів, за якими відбувається пригнічення проліферації клітин гліоми за відсутності функціональної активності ERN1, є надзвичайно актуальним. Протеїни, що кодуються генами *PERP* (p53 apoptosis effector related to PMP-22), *EPAS1* (Endothelial PAS Domain Protein 1), *E2F8* (E2F transcription factor 8) та *ATF3* (Activating Transcription Factor 3) є важливими факторами регуляції процесів апоптозу та проліферації клітин і тісно пов'язані зі злоякісним ростом. Ми дослідили рівні експресії мРНК генів *PERP*, *EPAS1*, *E2F8* та *ATF3* у клітинах гліоми лінії U87 та в сублініях цих клітин із повним пригніченням функції ERN1 (як кіназної, так і ендорибонуклеазної активності) або частковим (лише ендорибонуклеазної активності), що було підтверджено визначен-

ням рівня фосфорильованої форми ERN1 та наявності альтернативного сплайсингу мРНК ХВР1 (X-box-binding protein 1) в умовах індукції стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином.

Встановлено, що повне виключення функції сигнального ензиму ERN1 призводить до зменшення рівня експресії гена *PERP* майже вдвічі. В той самий час, пригнічення лише ендорибонуклеазної активності цього ензиму ініціювало протилежні зміни – зростання рівня експресії мРНК *PERP* у 2,5 раза порівняно з контрольними клітинами гліоми. Рівень експресії мРНК *EPAS1* у клітинах гліоми знижується більше ніж у 20 разів за умови повного виключення функції ERN1, а за відсутності лише ендорибонуклеазної активності ERN1 експресія цього гена знижується лише у 2,5 раза. Під час дослідження рівня експресії мРНК *E2F8* було виявлено різке зниження цього показника як в умовах повного, так і часткового пригнічення функції ERN1, відповідно у 17 та 50 разів порівняно з контрольними клітинами гліоми. Експресія гена *ATF3* зменшується у більш ніж 7 разів за умов повного пригнічення функції ERN1 і лише на 20% у разі виключення його ендорибонуклеазної активності, а це свідчить про те, що за регуляцію експресії цього гена відповідає переважно кіназна активність ERN1.

Одержані результати свідчать про те, що експресія *PERP*, *EPAS1* та *E2F8* в клітинах гліоми є ERN1-залежною, причому регуляція експресії залежить як від кіназної, так і від ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1 і що блокада лише ендорибонуклеазної активності цього ензиму ERN1 повертає експресію генів *PERP*, *EPAS1* та *E2F8* до рівня, який спостерігається в нормальних астроцитах людини. Можна припустити, що досліджені нами транскрипційні фактори відіграють важливу роль у контролі ERN1-залежної проліферації клітин гліоми, оскільки за умов виключення функції ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула, спостерігаються різкі зміни в рівнях експресії генів *PERP*, *EPAS1*, *E2F8* та *ATF3* у напрямку нормалізації. Про складність процесів ERN1-залежної регуляції проліферативних процесів свідчить те, що пригнічення ендорибонуклеазної активності ERN1 чи обох одночасно призводить до різних як за величиною, так і за напрямком дій ефектів.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ И ФОРМИРОВАНИЕ ГОРМЕЗИСНОГО ЭФФЕКТА К ИОНАМ МЕДИ

БОЖКОВ А. И., КУРГУЗОВА Н. И., СИДОРОВ В. И., КЛИМОВА Е. М.

*НИИ биологии Харьковского национального университета им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: bozhkov@univer.kharkov.ua*

Ранее была высказана гипотеза, что старение – это неспецифический интегральный процесс, который реализуется на фоне постоянно формирующейся метаболической и эпигенетической памяти. Это, с одной стороны, минимизирует предстоящие адаптивные процессы, а, с другой, – ограничивает и изменяет стратегический адаптивный выбор. Такая метаболическая ситуация приводит к формированию порочных кругов метаболизма и стойких метаболических паттернов – хронических патологий и смерти.

Для проверки этой гипотезы было разработано несколько экспериментальных моделей: гормезис к ионам меди и влияние преадаптации на формирование генотипа.

Определяли: способность молодых и старых животных адаптироваться к токсическим концентрациям ионов меди, механизм гормезисного эффекта и роль специфических медьсвязывающих протеинов в этом процессе, время сохранения адаптивного внутриклеточного паттерна распределения ионов меди, влияния преадаптации на формирование генотипа по показателям активности иммунной системы у молодых и старых организмов.

Показано, что проявление гормезисного эффекта зависит от количества предварительных введений малых доз токсиканта, и эта зависимость имеет S-образный характер. Эффект гормезиса увеличивается в случае 1–3 последовательных введений токсиканта и уменьшается, если количество предварительных введений было больше трех.

Обнаружено, что определяющую роль в механизмах гормезисного эффекта играют медьсвязывающие протеины (МСП) цитозоля печени. Эти протеины выделены, очищены и охарактеризованы. Показано, что гормезисный эффект коррелирует с увеличением «способности» МСП связывать и удерживать ионы меди. Повторное введение старым животным сернокислой меди спустя 30 дней после первого введения сопровождается увеличением связывающей способности МСП в 2 раза со значительным уменьшением содержания меди в других компартментах клетки (митохондрии, ядра, микросомы), т. е. имеет место формирование специфического адаптивного паттерна распределения, и это сопровождается усилением гормезисного эффекта.

Определение содержания ионов меди в компартментах клеток печени старых животных показало, что с МСП связывается до 30 мкг ионов меди на 1 мг протеина, что в 2 раза больше, чем у молодых и в 43 раза больше контрольного уровня. Вместе с тем, содержание ионов меди в митохондриях и микросомах старых животных по сравнению с молодыми больше в 3,7 и 2,4 раза соответственно. Такой характер внутриклеточного паттерна распределения ионов меди может объяснить проявление большей токсичности сернокислой меди по сравнению с молодыми животными. Эти результаты указывают на роль метаболической памяти в формировании эффекта гормезиса и возрастзависимых стратегий адаптации.

На модели развития индуцированного генотипа показано, что ответ иммунной системы на фоне патологии зависит от предварительно сформированной специальным циклическим режимом кормления метаболической памяти.

MITOCHONDRIA OF RAT MYOMETRIUM POSSESS ATP-SENSITIVE K^+ -CHANNELS, WHICH CAN BE ACTIVATED BY Ca IONS

VADZYUK O. B.

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: olga_vadzyuk@hotmail.com*

Using fluorescence technique to demonstrate the presence of the ATP- and diazoxide-sensitive transporter of ions K in rat uterus mitochondria and possible its activation by Ca ions.

Mitochondria were isolated by two differential centrifugations as described elsewhere. Measurements of mitochondrial side scatter were conducted at 520 nm at room temperature in medium which contains: 125 mM KCl, 5 mM succinate, 5 mM N_2HPO_4 , 1 mM $MgCl_2$, 5 μ M rotenone, 1 μ g/ml oligomycin.

For the fluorescence measurements of K^+ transport mitochondrial suspension was loaded with K^+ -sensitive probe PBFI in K^+ -free medium, supplied with 10 mM pyruvate for 10 min under room temperature. After loading mitochondrial suspension was washed with isolation buffer, centrifuged and stored on ice. PBFI fluorescence was measured using excitation ratio technique (λ_{exc} 340/380, λ_{em} 480) after addition of mitochondrial aliquots into K^+ medium. Composition of incubation medium for the fluorescence measurements was the same as for side scattering measurements.

Accumulation of K^+ in mitochondrial matrix resulted in fast increase of PBFI fluorescence, which was effectively suppressed by addition of ATP (200 μ M). Nevertheless, no suppression was observed when the activator of ATP-sensitive K^+ -channel (K^+_{ATP} -channel) diazoxide (50 μ M) was added along with ATP. These results provide reason to assume the existence of the functional K^+_{ATP} -channel in mitochondria of the rat myometrium. Measurements of the side scattering of mitochondrial suspension at 520 nm confirmed our assumption. Fast swelling of mitochondrial matrix as a result of K^+ accumulation was slowed down significantly under presence of ATP (200 μ M). In contrast to this, diazoxide addition (50 μ M) along with ATP caused restoration of the rate and the steady-state volume of mitochondrial swelling to the levels of ATP- and diazoxide-free control.

Addition of CaCl_2 (100 μM) into the incubation medium resulted in acceleration of the swelling rate of mitochondria as well as in lowering of steady-state volume in comparison to the control conditions. These effects of high Ca^{2+} concentration were suppressed either by 1 μM CsA or 10 μM RuR. Thus Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling that we observed was mediated by Ca^{2+} accumulation through the mitochondrial Ca^{2+} uniporter and the permeability transition pore (PTP) opening. Further, glybenclamide (2 μM), as well as another blocker of K^+_{ATP} -channel 5-HD (200 μM), partially blocked mitochondrial swelling rate. Yet the effect of K^+_{ATP} -channel blockers was observed only in K^+ medium and was not observed when K ions were substituted equimolarly for Na^+ .

These results allow to assume the existence of functional K^+_{ATP} -channels on the mitochondria isolated from rat uterus. High concentrations of Ca^{2+} , which evoke the PTP opening, can induce the opening of K^+_{ATP} -channel either.

КАЛІКС[4]АРЕНИ ЯК СЕЛЕКТИВНІ ІНГІБІТОРИ АТР-ГІДРОЛАЗНИХ СИСТЕМ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

ВЕКЛИЧ Т. О., ШКРАБАК О. А., МАЗУР Ю. Ю.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua*

У забезпеченні скорочення гладеньких м'язів важлива роль належить Mg^{2+} -залежним АТР-гідролазним ензиматичним системам. У плазматичній мембрані (ПМ), яка має селективну проникність для різноманітних речовин, міститься низка Mg^{2+} -залежних АТРаза, що забезпечують внутрішньоклітинний іонний гомеостаз, а саме Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, Na^+ , K^+ -АТРаза та «базальна» Mg^{2+} -АТРаза. Для подальшого дослідження іонних, молекулярних та мембранних механізмів внутрішньоклітинної сигналізації вкрай необхідним є створення нових високоефективних селективних інгібіторів та активаторів транспортних АТР-гідролаз. У цьому аспекті, зокрема, становлять інтерес каліксарени – макроциклічні сполуки, синтезовані шляхом циклоконденсації пара-заміщених фенолів і формальдегіду. Каліксарени вивчаються як молекулярні платформи для дизайну сполук, здатних впливати на перебіг біохімічних процесів.

Ми поставили перед собою за мету вивчити вплив вибраних калікс[4]аренів, які були попередньо апробовані в процесі пошукових досліджень, на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, Na^+ , K^+ -АТРаза та Mg^{2+} -АТРаза активність у фракції ПМ.

Калікс[4]арени синтезовані член-кор. НАНУ В. І. Кальченком та його колегами (ІОХ НАНУ).

Експерименти виконані на суспензії ПМ клітин міометрія, оброблених 0,1% розчином дигітоніну. Показано, що калікс[4]арен С-90, ефективно інгібуючи активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази (значення $I_{0,5}$ для С-90 становить $20,2 \pm 0,5$ мкМ), майже не впливає на ензиматичну активність «базальної» Mg^{2+} -АТРази і Na^+ , K^+ -АТРази. Структурний фрагмент С-150 (суто каліксаренова «платформа») та модельна сполука М-1 (функціоналізує верхній вінець «платформи») незначно (на 13,0%) знижують активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази. Перевіривши спорідненість зазначеного ензиму до АТР, іонів Mg та Ca залежно від концентрації калікс[4]арену С-90, а також його вплив на кооперативний ефект та на максимальну швидкість гідролізу АТР ми встановили, що в усіх трьох випадках спостерігається істотне зменшення максимальної швидкості гідролізу АТР, що в поєднанні з відсутнім впливом на константи спорідненості свідчить про неконкурентний механізм інгібування калікс[4]ареном С-90 Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза активності. За результатами конфокальної мікроскопії під впливом С-90 (20 мкМ) відбувається різке зростання флуоресцентної відповіді Ca^{2+} -чутливого зонда fuo-4 в клітині, після чого відбувається зменшення квантового виходу зонда та повернення інтенсивності флуоресценції до початкового рівня. Ці результати свідчать про те, що під впливом калікс[4]арену С-90 відбувається різке підвищення концентрації Ca^{2+} в клітині, яке пов'язане зі зниженням активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази

ПМ. Наступне зниження концентрації Ca^{2+} до початкового рівня може бути пов'язано із залученням компенсаторних Ca^{2+} -транспортуючих систем у міоцитах до релаксації кальцієвого сигналу, які мають нижчу афінність до Ca^{2+} та реагують, головним чином, на його високі концентрації в клітині (Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій, Na^+ - Ca^{2+} -обмінник ПМ).

Нами також вивчалася дія калікс[4]арену С-107 на Na^+ , K^+ -АТРазну активність. Встановлено, що калікс[4]арен С-107 (10^{-8} – 10^{-4} М) дозозалежно пригнічує активність Na^+ , K^+ -АТРази (значення $I_{0,5}$ для С-107 становить 33 ± 4 нМ), практично не впливаючи на активність Mg^{2+} -АТРази. Крім цього калікс[4]арен С-107, використаний в концентрації, яка відповідає значенню $I_{0,5}$, істотно стимулює гальмівну дію убаїну на питому активність Na^+ , K^+ -АТРази. Модельні сполуки С-150 та М-3 практично не впливають на обидві ензиматичні системи. Калікс[4]арен С-160 – регіоізомер калікс[4]арену С-107, не впливає як на Na^+ , K^+ -АТРазну, так і на Mg^{2+} -АТРазну активність у фракції ПМ міометрія.

Отже, просторова будова каліксарен-амінофосфонових кислот є суттєвою для прояву їхньої інгібувальної дії на АТРазну активність у ПМ гладеньком'язових клітин.

Вищенаведені експериментальні дані можуть бути корисними під час подальшого з'ясування мембранних механізмів іонного обміну в гладеньких м'язах, зокрема, за вивчення ролі ПМ у забезпеченні електромеханічного спряження в них та контролю іонного гомеостазу в міоцитах.

Автори висловлюють подяку член-кор. НАНУ С. О. Костеріну (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ) та член-кор. НАНУ В. І. Кальченку (ІОХ НАНУ) за обговорення експериментальних результатів.

ЕПІГЕНЕТИЧНЕ ПІДґРУНТЯ КАНЦЕРОГЕНЕЗУ: РОЛЬ НЕКОДУЮЧИХ РНК

ГАЛИЦЬКИЙ В. А.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: volha@biochem.kiev.ua*

МікроРНК, надекспресія яких є властивою для пухлинних клітин (зокрема, miR-18, miR-19, miR-21, miR-29a, miR-155, miR-181, miR-206, miR-210 та miR-221/222), спричиняють:

1) сайленсинг генів ключових компонентів усіх найважливіших систем репарації ДНК – ексцизійної репарації, прямої репарації, репарації зшивань, зумовлених ДНК-топоізомеразою, репарації шляхом гомологічної рекомбінації та репарації шляхом негомологічного кінцевого приєднання;

2) сайленсинг генів гістон-деацетилаз (HDAC1/2/4/6/7/8/9 та SIRT1/3/5/7), гістон-метилаз і *de novo* ДНК-метилаз (DNMT3A, DNMT3B та DNMT3L);

3) сайленсинг генів інгібіторів клітинного циклу (p27, p57), а також сайленсинг генів-супресорів пухлинного росту (*pTEN*, *TGFBR*) та проапоптозних генів (*FAS*, *Bak1*);

4) сайленсинг генів молекул міжклітинної адгезії – елементів тісних замикаючих контактів (клаудини, оклюдин, ZO1/2, JAM-A/C), адгезивних контактів (Е-кадгерин, нектин 1), щілинних контактів (конексин 43), а також пов'язаних з ними компонентів цитоскелета (цингулін, вінкулін, тропоміозин 1, α -актиніни);

5) вивільнення експресії генів факторів, відповідальних за стовбуровий статус клітин (Nanog, Oct4, Sox2, Klf4) з-під пригнічуючого впливу транскрипційного фактора p53 та сигналу від рецептора онкостатину М.

Притаманне пухлинним клітинам пригнічення експресії інших мікроРНК (зазвичай, miR-15/16, miR-122, miR-125a/b, miR-31, miR-143, miR-145, miR-204, miR-205 та miR-320) знімає репресивний вплив цих мікроРНК на експресію:

1) генів гістон-ацетилаз (PCAF, E1p3, ATF2, MOZ, MORF, TIP60, HBO1), гістон-деметилаз (*KDM1A/B*, *KDM2/B*, *KDM3A*, *KDM4A/B/C* та *KDM5A/C/D*), а також компонентів хроматин-ремоделюючого комплексу SWI/SNF;

2) генів компонентів сигнальних каскадів, відповідальних за проліферацію клітин (E2F, CDK6, RASA1/2, erbB2/3/4, abl2, STAT3) та антиапоптозних генів (*bcl-2*);

3) генів гетероорганних антигенів (для епітеліальної тканини такими є, зокрема, ламініни, віментин, фібронектин);

4) генів протеїнів, відповідальних за рухливість клітин (β -актин, γ 1-актин, талін), а також за закріплення клітин у неналежній тканині (β 5-інтегрин);

5) генів факторів, відповідальних за стовбуровий статус клітин.

Як наслідок, зміна патерну некодуючих РНК веде до підвищення загального рівня ацетилювання хроматину в пухлинних клітинах і, отже, рівня його експресії, дозволяючи, таким чином, реактивацію дремаючих онкогенів і транспозонів, внаслідок чого стає можливою дестабілізація геному та трансформація клітини. Створюються передумови для різкого збільшення частоти мутацій клітинної ДНК, що теж сприяє змінам онкогенів, пошкодженню генів-супресорів пухлинного росту, а в подальшому – пухлинній прогресії.

Також внаслідок зміни профілю клітинних РНК зростають проліферативна активність та ймовірність виживання пухлинних клітин, підвищується їх стійкість до протипухлинних препаратів. Одночасно ослаблення міжклітинних контактів, поява гетероорганних антигенів (зокрема, неналежних молекул адгезії) та більша рухливість клітин створюють передумови для їх метастазування.

З іншого боку, загальна дерепресія геному та зниження рівня експресії мікроРНК, здатних запобігати реактивації факторів Nanog, Oct4, Sox2 та інших, відповідальних за стовбуровість, дає трансформованим клітинам змогу ставати стовбуровими пухлинними клітинами. Сайленсинг генів маркерів власної тканини та уможливлення експресії гетероорганних антигенів, що є епігенетичною основою епітеліально-мезенхімального переходу ракових клітин, теж, очевидно, сприяє набуттю ними стовбуровості.

Нарешті, завдяки РНК-залежному метилуванню ДНК зсув профілю некодуючих РНК, зокрема мікроРНК, може вести і до переінсталяції малюнку епігенетичних маркерів. Таким чином, зміни патерну некодуючих РНК сприяють трансформації клітин, появі стовбурових пухлинних клітин та подальшій прогресії пухлин (або ж і обумовлюють ці явища).

THERMAL EFFECT MODULATES THE RESPONSES OF MUSSELS' METALLOTHIONEIN AND APOPTOSYS TO NANO-SCALE ZINC OXIDE

¹GNATYSHYNA L., ¹YURCHAK I., ¹FEDORUK O., ²IVANINA A.,
¹GRYSIUK A., ¹KOPANYTSYA L., ¹FALFUSHYNSKA H.,
²SOKOLOVA I., ¹STOLIAR O.

¹Ternopil National Pedagogical University, Ukraine;
²University of North Carolina at Charlotte, Charlotte, USA;
e-mail: Oksana.Stolyar@gmail.com

Climate warming involves not only a rise of environmental temperature means, but also more frequent heat waves, and is predicted to distort the molecular responses to certain toxic substances and exceed the resilience of the adaptive responses of organism. The present study aimed to elucidate the interactive effects of elevated temperature and novel aquatic pollutants on in model organism, bivalve mollusk. Specimens of *Anodonta anatina* or *Unio pictorum* from cooling pond of Power Plant with constantly elevated temperature of water (N-group) and forestry area (F-group) were exposed for 14 days to elevated temperatures (25 °C and 30 °C, T1 and T2, respectively). Specimens from F-group were exposed to nano-scale Zinc Oxide (n-ZnO, 3.1 μ M), Zn²⁺ (3.1 μ M), or Ca-channel blocker nifedipine (NFD, 10 μ M), combination of n-ZnO and NFD (n-ZnO+NFD) at 18 °C, and n-ZnO at 25 °C (n-ZnO+T1). Control groups (CN and CF) were held at 18 °C for 14 days. Metal binding capacity and protein level of MT were measured in the digestive gland and gills tissues.

Cellular stress response was assessed by measuring levels of antioxidants (reduced and oxidised glutathione (GSH & GSSG), superoxide dismutase (SOD)), oxyradicals and oxidative lesions of proteins (carbonyls, PC) and lipids (LPO), DNA fragmentation, lactate dehydrogenase (LDH), and activity of the main effector enzymes in the apoptotic cascades, caspase-3 and cathepsin D (total and free).

Comparison of control groups confirmed some site-related differences with higher caspase-3 and LDH activities in the CN-group. The heat effect provoked the decrease in MT level in all treated groups (with the highest difference, by 70 times, in T2N group) but it caused the inhibition of apoptosis only in the N-group. In T2-groups the exceeding of adaptive ability was shown, particularly in T2F group with the mortality of mussels (totally 52% for 14 days). Exposure to Zn, n-ZnO and n-ZnO+NFD induced significant upregulation of MT levels by ~ 30%, while NFD alone depleted the MT level. Notably, the upregulation of MT in response to ZnO-NP exposure was abolished at the elevated temperature (25 °C). All exposures except n-ZnO+T led to upregulation of SOD activity, accompanied by a 2-3-fold decrease in the levels of PC, while the concentrations of LPO products did not change. In contrast, the combined exposure to n-ZnO+T abolished upregulation of SOD activity and induced oxidative stress as indicated by elevated levels of protein carbonyls (by ~40%), LPO products (by over 100%) and a ~2-fold increase in the levels of oxidized glutathione (GSSG). Exposures to the Zn, n-ZnO+T and NFD led to a significant increase in DNA fragmentation. Cathepsin D-related apoptotic activity was induced by all exposures except n-ZnO+T and NFD, while the caspase-3 mediated cascade was induced prominently by n-ZnO+T and decreased by n-ZnO, NFD and n-ZnO+NFD. NFD exposure alone caused elevation of oxyradical formation and release of cathepsin D.

Overall, our data show that in the complex exposures, the heat stress drastically impacts MT-dependent Zn binding, DNA fragmentation and oxidative stress responses in the mussels independently of their origin. Unlike NFD, heat stress causes the inability to adequate response on the exposure to n-ZnO. The limit of tolerance of apoptotic and LDH activities is dependent on the history of population.

This work was supported by the Ukrainian-Austrian R&D Project (M/4-2013) and U.S. Civilian Research and Development Foundation (CRDF) Cooperative Grants Program award (UKBI-7109-TE-13). Also its partially supported by State Fund of Fundamental Research (GF/056/017).

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ (ДО 5 кДА) КОРДОВОЙ КРОВИ

ГУЛЕВСКИЙ А. К., АХАТОВА Ю. С.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: Julija_Veselovskaja@meta.ua*

На сегодня в научной и клинической практике накоплена обширная информация о положительном влиянии препаратов из кордовой крови на различные органы, ткани и клеточные культуры. Основное преимущество кордовой крови состоит в том, что она имеет в своём составе сбалансированный комплекс биологически активных веществ, которые принимают участие в индукции, репрессии, обратимой ингибиции энзимов в исследуемых клетках, благодаря чему возможно воздействие на метаболизм не только больного, но и относительно здорового организма без выраженной патологии.

Ранее нами показано, что низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) кордовой крови (ФКК) обладает выраженным иммуномодулирующим и репаративным действием, однако механизм действия ФКК не изучен. В связи с этим целью настоящего исследования является изучение влияния ФКК на ряд биохимических показателей свежевыделенных клеток лейкоконцентрата условно здоровых доноров, а именно: активность щелочной фосфатазы, потребление глюкозы и содержание аденилатов.

Выделение низкомолекулярной фракции из кордовой крови коров проводили методом макро- и ультрафильтрации. Фильтрат лиофилизировали и хранили при -80 °C, в среду инкубации ФКК внесли в конечной концентрации 0,15 мг/мл. Лейкоконцентрат получали из донорской крови человека

седиментационным методом. Активність щелочної фосфатази лейкоцитів определяли стандартним клінічним методом з використанням відповідного набору реагентів; вміст глюкози – глюкозооксидазним методом з використанням гель-фільтрації для звільнення від глюкози в вніклеточній середі. Концентрацію аденилатів (АТФ, АДФ і АМР) в клітках оцінювали з допомогою хемілюмінесцентного аналізу.

Дослідження показали, що в умовах спокою інкубація лейкоцитів з ФКК не впливає на активність щелочної фосфатази, однак в умовах стимуляції кліток об'єктом фагоцитоза спостерігалося достовірне підвищення активності щелочної фосфатази в 1,75 рази відносно контрольної рівня.

Встановлено, що внесення ФКК в середу інкубації кліток лейкоконцентрату сприяє достовірному збільшенню кількості внутріклеточної глюкози від $4,58 \pm 0,15$ ммоль/л в контролі до $8,52 \pm 1,11$ ммоль/л.

При дослідженні впливу ФКК на аденилатну систему встановлено, що після інкубації кліток лейкоконцентрату в середі з ФКК вміст АТФ в них достовірно збільшується і становить $23,42 \pm 2,9$ нмоль/мг протеїна і $35,42 \pm 3,91$ нмоль/мг протеїна відповідно. Також показано, що інкубація з ФКК сприяє достовірному збільшенню вмісту АДФ в клітках в 1,29 рази порівняно з контролем. В відношенні концентрації АМР в дослідюваних клітках подібний ефект ФКК не спостерігається.

Слід зауважити, що результати розрахунку загальної аденилатної пули (АТФ + АДФ + АМР) показали, що ФКК сприяє достовірному збільшенню даного показника від $37,49 \pm 4,09$ до $50,2 \pm 6,79$ абс. од. за рахунок збільшення кількості АТФ і АДФ. По всій видимості, це свідчить про більш інтенсивний процес синтезу аденилатів під впливом низкомолекулярних компонентів, що містяться в ФКК.

Таким чином, на основі отриманих експериментальних даних можна зробити наступні висновки: ФКК має здатність збільшувати активність щелочної фосфатази, стимулює накопичення глюкози і сприяє збільшенню вмісту АТФ і АДФ в клітках лейкоконцентрату.

ОКСИД АЗОТУ – ПОТЕНЦІЙНИЙ РЕГУЛЯТОР Ca^{2+} -ГОМЕОСТАЗУ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА МАТКИ ТА РІВНЯ ПОЛЯРИЗАЦІЇ ЙОГО СУБКЛІТИННИХ СТРУКТУР

ДАНИЛОВИЧ Ю. В., ДАНИЛОВИЧ Г. В., КОЛОМІЄЦЬ О. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua*

Зміни цитозольної концентрації Ca^{2+} лежать в основі контролю скоротливої активності гладеньком'язевих клітин, а Ca^{2+} -транспортні системи є головною мішенню дії речовин, які модулюють їх контрактильну функцію. Здатність NO розслабляти міометрій зумовлює інтерес до дослідження закономірностей регуляції Ca^{2+} -гомеостазу міоцитів матки оксидом азоту. Таким чином, метою нашої роботи було з'ясувати біохімічні механізми дії NO на Ca^{2+} -транспортувальні системи клітин міометрія та рівень поляризації субклітинних структур, який контролює роботу цих систем і є одним з індикаторів функціонального стану клітини.

Досліджували вплив нітрозактивних сполук – натрію нітропрусиду (SNP) та натрію нітриту (SN) в концентраціях 10^{-8} – 10^{-4} М на пасивний і енергозалежний транспорт Ca^{2+} в плазматичній мембрані (ПМ) клітин міометрія. Зокрема, встановлено залежність від концентрації та часу зростання проникності везикульованих препаратів ПМ до Ca^{2+} під впливом SN. SNP та SN також пригнічують активність транспортувальної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. Зазначені мембранні та іонні ефекти можуть зумовлювати короточасне зростання концентрації катіона в субплазмалемному регіоні, що призведе до активації

Ca²⁺-залежних K⁺-каналів із наступним зростанням поляризації ПМ та зниженням рівня збудливості міоцитів. Для перевірки цього припущення вивчали зміни рівня поляризації ПМ інтактних міоцитів за дії нітрозактивних сполук за допомогою потенціалчутливого зонда 3,3'-dihexyloxycarbocyanine (DiOC₆(3), 100 нМ) і методу протокової цитофлуориметрії. Встановлено, що 10⁻⁴ М SNP та SN зумовлюють Ca²⁺-залежну поляризацію ПМ, яка обумовлена активацією K⁺-проникності мембрани.

Функціональне значення оксиду азоту як агента, що гальмує процес збудження міоцитів, доводять такі результати: передінкубація клітин з 10⁻⁴ М SNP або SN пригнічує розвиток високої калієвої деполаризації (100 мМ KCl) у часі.

Генералізованому зростанню концентрації Ca²⁺ в міоплазмі і запуску механізмів скорочення здатне протидіяти узгоджене функціонування Ca²⁺-транспортувальних систем саркоплазматичного ретикулума (СР). Нами досліджено вплив нітрозактивних сполук (10⁻⁷–10⁻³ М) на енергозалежний і пасивний транспорт Ca²⁺ в СР із використанням пермеабілізованих дигітоніном (0,1 мг/мл) міоцитів. Встановлено, що SNP та SN стимулюють АТР-залежне включення Ca²⁺ в СР. Разом з тим, Ca²⁺-індуковане вивільнення Ca²⁺ із СР гальмується SNP та SN. Отже, надходження катіона крізь ПМ під впливом NO компенсується енергозалежною акумуляцією Ca²⁺ СР, водночас оксид азоту інгібує ключовий етап електромеханічного спряження в гладеньком'язових клітинах. Нами продемонстровано також стимуляцію під впливом нітрозактивних сполук (10⁻⁴ М) енергозалежного накопичення Ca²⁺ мітохондріями (МХ), яке здійснюється Ca²⁺-уніпортером їхньої внутрішньої мембрани. Отже, одним із проявів функціональної активності МХ, як і СР, може бути компенсація надходження Ca²⁺ крізь ПМ клітин міометрія за дії оксиду азоту.

Із використанням лазерної конфокальної мікроскопії та зонда DiOC₆(3) продемонстровано подібну присарколемну і навколядерну локалізацію цього барвника та специфічного маркера МХ MitoTracker Orange CM-H₂TMRos в інтактних міоцитах. Встановлено, що 10⁻⁴ М SNP призводить до зниження флуоресценції DiOC₆(3), ефект є відносно помірним і сягає близько 17% за 5-хвилинної дії SNP. В порівняльних дослідженнях SN не чинив ефекту на флуоресценцію. Зменшення потенціалу МХ за дії оксиду азоту може відображати процес зворотного пригнічення функціонування електрон-транспортного ланцюга, що здатне захищати органели від надмірної генерації активних форм кисню.

Центральним етапом ініціації Ca²⁺-залежної скоротливої активності в гладеньких м'язах є зв'язування Ca²⁺ з кальмодуліном. Встановлено, що нітрозактивні сполуки (10⁻⁸ М SN) пригнічують зв'язування Ca²⁺ з кальмодуліном, що *in vivo* може призвести до зниження контрактильної активності.

Отже, оксид азоту підвищує поріг збудливості міоцитів матки, сприяє посиленню акумуляції Ca²⁺ внутрішньоклітинними депо та гальмує електромеханічне спряження на ключових етапах. Ці ефекти можуть лежати в основі утерорелаксуючої дії NO.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ ЛАМИНА А/С НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ *IN VITRO*

^{1,2,3}ЗАБИРНИК А., ²ОМЕЛЬЧЕНКО Е., ³ПЕРСКИЙ Е.,
¹МАЛАШИЧЕВА А., ¹КОСТАРЕВА А.

¹Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия;

²Лаборатория клеточных биотехнологий «Viola», Харьков, Украина;

³Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: arseny-z@yandex.ru

Мутации в гене ламина А/С (*LMNA*) приводят к развитию группы тяжелых заболеваний – ламинопатий. Детальный механизм действия ламиновых мутаций до сих пор неясен. Было высказано предположение, что такие мутации могут нарушать дифференцировку стволовых клеток взрослого

організму за счёт змін у ядерному сигналінгу і транскрипційних процесах. Поскольку при ламінопатіях більше всього страждають ткани мезенхімального походження, в частині жирова, була вивчена роль ламіна А/С в процесах диференціювання мезенхімальних стоволових кліток – стромальних кліток жирової ткани (СКЖТ) – в адипогенному напрямку.

Мутагенез в клонированном в лентивирусный вектор гене *LMNA* дикого типа проведено *in vitro*. Для дослідження обрані мутації *LMNA*, кожна з яких переважно пов'язана з певним фенотипом: міодистрофія – *G232E*, прогерія, міодистрофія – *R471C*, ліподистрофія – *R482L*, *G465D*, прогерія – *R527C*. СКЖТ, отримані від здорових донорів, були трансдуційовані лентивирусними векторами, несущими *LMNA* – мутантні або дикого типу. Вплив експресії мутантних форм ламіна А на диференціювання СКЖТ оцінювали трьома методами: програмним аналізом великого масиву мікрофотографій, отриманих на окрашенні специфічним фарбником культури кліток; аналізом експресії маркерів адипоцитарної диференціювання (МАД) – PPAR γ , SREBP і адипіна на різних термінах диференціювання з допомогою qPCR; а також вивченням експресії 84 генів, прямо або косвенно пов'язаних з адипогенезом на ранньому етапі диференціювання.

Виявлено фенотипічне посилення диференціювання для мутацій *G232E* і *R527C*, інші ж мутації суттєво не змінювали кількість продиференціюваних кліток. Було також помічено зміну рівня експресії МАД при досліджуваних мутаціях, хоча вони не завжди прямо корреливали з змінами на фенотипічному рівні. Так, *G232E* і *R527C* збільшували як фенотипічний рівень диференціювання, так і рівні експресії МАД. *G465D* і *R471C* збільшували рівні експресії МАД, але не змінювали рівні фенотипічної диференціювання. Для *R527C* спостерігається зворотний ефект. *R482L* суттєво не впливає на диференціювання в обох випадках. Так же, як і в разі з попередніми методами, мутації показали унікальні профілі експресії 84 адипоасоційованих генів з збігаючими профілями лише по невеликій групі генів. З іншого боку, мутації зі схожими синдромами (*G465D* і *R482L*, *R471C* і *R527C*) демонстрували схожий профіль експресії.

Отримані результати свідчать, що для досліджуваних мутацій існують різні механізми реалізації патогенетичних синдромів. При цьому, профілі експресії адипоасоційованих генів при диференціюванні були специфічними для мутаційасоційованого синдрому.

АВТОРЕГУЛЯЦІЯ СИНТЕЗУ ПРОТЕЇНІВ ТЕПЛООВОГО ШОКУ ПРОТЕЇНАМИ HSP90 У ПРОРОСТКІВ *Arabidopsis thaliana*

КОЗЕКО Л. Є.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: liudmyla.kozeko@gmail.com

Індукція синтезу протеїнів теплового шоку (heat shock protein, HSP) є невід'ємною складовою стресової реакції у всіх видів організмів, включаючи рослини. Експресія генів всіх родин HSP ініціюється шляхом взаємодії транскрипційних факторів теплового шоку (HSF) у вигляді активних тримерів з елементами теплового шоку (HSE) в промоторній зоні. Одним із гіпотетичних механізмів підтримки HSF у неактивній мономерній формі в нормальних умовах є зв'язування цих транскрипційних факторів із цитозольними HSP90. У цьому разі інгібування функціональної активності шаперона має призводити до вивільнення HSF, їх активації та ініціації експресії HSP. Для перевірки цієї гіпотези проведено дослідження з використанням інгібіторного аналізу. В проростках *Arabidopsis thaliana* вивчали синтез HSP90 і HSP70 в умовах інгібування шаперонної активності HSP90 специфічним інгібітором гелданаміцином (ГДА).

Проростки вирощували в стерильних умовах на агаризованому середовищі при 24 ± 1 °C і 16-годинному фотоперіоді протягом 12 діб. ГДА використовували в концентраціях 1, 10 і 100 мкмоль/л. Показано, що обробка антибіотиком проростків спричинює дозозалежну активацію синтезу HSP90

і HSP70 за відсутності стресу. Обробка антибіотиком насіння перед висаджуванням також призводить до збільшення вмісту цих протеїнів у проростках за нормальних умов. Крім того, обробка антибіотиком насіння впливає й на рівень індукції синтезу HSP90 і HSP70 у відповідь на дію високої температури: показано дозозалежне посилення активації синтезу цих стресових протеїнів за різних режимів теплового стресу, що, в свою чергу, сприяє посиленню термостійкості проростків. В цілому, результати дослідження підтверджують гіпотезу щодо ролі HSP90 в авторегуляції синтезу HSP за принципом зворотного зв'язку.

ANIMAL AND PLANT PHOSPHOLIPASES C AND D IN THE PHOSPHOLIPID SIGNALING SYSTEMS

KRAVETS V. S.

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua;*

The results of studies carried out by our research team, in collaboration with researchers from other countries indicate a key role of the phospholipases in the formation of intracellular signaling network involved in the metabolic regulation of eukaryotic cells at various levels of the organization. In particular, phosphoinositides specific phospholipase C (PI-PLC) [Iakovenko et al., 2008, Pokotylo et al., 2014; Ruelland, Kravets, et al., 2014]; phospholipase D (PLD) (Kravets et al., 2010; Kolesnikov., Nokhrina et al., 2012, Kalachova, Iakovenko et al., 2012, 2013; Pokotylo, Kretynin, 2012) and a new member of the plant phospholipase family - phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C, also known as non-specific phospholipase C (NPC) [Pokotylo, Pejchar et al., 2013; Pokotylo, Kretynin et al., 2014] are important components of cell membranes and able to recognize the effect of hormones and other factors, and generate second messengers involved in the regulation of cell metabolism.

PI-PLC is an enzyme, which hydrolyses phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI (4,5) P2) in cell membranes to form two lipid second messengers - diacylglycerol (DAG) and inositol-1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5) P3). DAG mediates the activation of protein kinase C (PKC) and Ins (1,4,5)P3 causes the release of calcium from intracellular storages. However, in plant cells the equivalents of animal PKC and genes of the proteins IP3-receptors have been not identified. Plant PI-PLCs structurally is closely related to the animal small PI-PLC isoform containing X and Y catalytic domains, C2 domain and truncated EF hand regulatory domains.

NPC can utilize phosphatidylcholine (PC) or phosphatidylethanolamine (PE), as substrate to produce DAG and the corresponding phosphoryl alcohol. This enzyme has been characterized in animals, plants and bacteria. Rapid NPCs activation was reported in response of plant to stress and hormonal stimuli, but its molecular mechanisms still remains unclear.

PLD hydrolyses membrane phospholipids (PC, PE and phosphatidylglycerol (PG)) into phosphatidic acid (PA) and the corresponding soluble headgroup. Plant PLDs are characterised with a complex domain structure containing C2, PH, PX and DRY regulatory domains. PLDs may employ primary alcohols such as ethanol or 1-butanol in the cleavage of the phospholipids that lead to production of non-metabolisable phosphatidylalcohol. This characteristic can be used to determine PLD activity *in vivo*.

Up to this date 13 different PLCs and only 2 PLDs have been described in the genome of mammals. In contrast, in the plant genome of *Arabidopsis* 12PLD, 9 PI-PLC and 6 NPC were found.

Our analysis of the results of studies on the structure and function of this enzyme suggests that the mechanism of regulation of PLC activity is still poorly investigated. All living cells can sense hormone action and other chemical compound via perception mechanisms or specific receptors, which closely connected with key enzymes of phospholipids metabolism – phospholipases. However, the role of different isoforms of these enzymes involved in these processes still is not clear.

There is also an important problem to demonstrate in details the involvement of PLC and DGK in cell signaling and the role of produced PA in different aspects of cell metabolism regulation. The regulatory downstream effects of the PA signal will obviously depend on PA-binding proteins. The identification of such PA-binding proteins is an important task to understand the nature of phospholipid signaling in living systems.

This work was supported by the grants: SFFR of Ukraine (№ Ф54/34-2014) and NAS of Ukraine (№ 2.1.10.32-10; 9.1-06-13).

DEVELOPMENT OF INTERFERON RESPONSE IN PRIMARY HEPATOCYTES

¹KUKLIN A., ¹TOKOVENKO B., ²MAKOGON N.,
³JARZĄB B., ¹OBOLENSKAYA M.

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

³*Marie Skłodowska-Curie Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice, Poland;*

e-mail: av.kuklin@gmail.com

Interferon alpha (IFN α) is a pleiotropic multifunctional cytokine that has a key role in early immune events. It is produced at the minimal level in healthy liver and up-regulated by viral RNA, LPS and damage-associated molecules. Knowing how a cell responds to IFN α in dynamics is important for understanding its function. Herein for the first time we examined the gene expression profile in primary rat hepatocytes treated during two time periods - 3 and 6 hours, with quasi-physiological dose of IFN α similar to that locally produced in regenerating rat liver after partial hepatectomy.

We incubated primary rat hepatocytes with 250 u/ml of rat IFN α . We used gene expression profiling with Affymetrix rat genome array 230 2.0 (Affymetrix, USA) followed by computational analysis of promoter regions of differentially expressed genes to identify the signaling pathways that are engaged by IFN α .

We identified 28 and 124 differentially expressed up-regulated genes which reveal the cell-specific traits of response and distinctive dynamics. From the beginning the up-regulation of genes responsible for autophagy, ISGylation, inhibition of translation and transition of mitochondrial dNTP synthesis to salvage pathway and chemokine CXCL10 production comes to the fore. Altogether they manifest the transit from the initial mode of cellular activity to the resource-conserving one, the usage of preexisting proteins and the attraction of the cells of putative hepatic environment for the development of response. The later changes are associated with the expansion of spectrum of differentially expressed genes, increasing magnitude of response and emerging interplay between activating and inhibiting factors which regulate the signal transduction, transcription and the activity of putative cells of hepatic environment. The classical Jak/STAT/ISGF3, Jak/STAT, PI3K and p38 signaling pathways are engaged in IFN α induced response of hepatocytes.

The short-term treatment of hepatocytes with quasi-physiological dose of IFN α induces the self-autonomous changes in hepatocytes and those referring to the hepatocytes potential input to the whole hepatic response. The interplay between activating and inhibiting factors of immune response is a characteristic feature of hepatocytes reaction to specified IFN α treatment.

FREE RADICALS, REACTIVE OXYGEN SPECIES AND OXIDATIVE STRESS

LUSHCHAK V. I.

*Vassyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine;
e-mail: lushchak@pu.if.ua*

Free radicals were first described by Moses Gomberg (born in Ukraine) more than a century ago and much later were found in biological systems. Actually up to now they are mainly considered to play deleterious roles as damaging species, but in 1970-1990th this position was substantially challenged by several important discoveries. The first, free radicals or more common reactive oxygen species (ROS) were found to be responsible for combating of infection inducers by immune system; the second they were found to play signaling function, and finally, the level of free radicals was found to be regulated by hormones like insulin and they were suggested to be regulators of core metabolic pathways. Therefore, it is absolutely clear now that ROS are active participants in many processes and they cannot be considered anymore as only damaging agents, but real players in many functions of living organisms. The field of ROS studies is among most complicated due to many reasons: (i) low stability and high reactivity resulting in low steady-state concentrations; (ii) high diversity of reactions they can participate in; (iii) complicated spatiotemporal distribution in cell space; (iv) dependence on physiological state of the organism, and (v) absence of technical tools for reliable evaluation of absolute and even relative levels. The situation when steady-state ROS level is increased and perturbs core and regulatory processes, including ROS-based ones, was called oxidative stress. Due to many complications related to oxidative stress research I propose to classify it according to its intensity: basal oxidative stress (BOS); low intensity oxidative stress (LOS); intermediate intensity oxidative stress (IOS); and IV – high intensity oxidative stress (HOS). The proposed classification may be helpful to describe experimental data where oxidative stress is induced and systematize it based on its intensity.

ЗАКОНОМІРНОСТІ ІНТЕРНАЛІЗАЦІЇ СУБОДИНИЦІ В ТА R-ДОМЕНУ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ РЕЗИСТЕНТНИМИ ДО ТОКСИНУ КЛІТИНАМИ ЛІНІЇ L929

*МАНОЙЛОВ К. Ю., ЛАБИНЦЕВ А. Ю., КОРОТКЕВИЧ Н. В.,
КОЛИБО Д. В., КОМІСАРЕНКО С. В.*

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

Деякі види ссавців резистентні до дії дифтерійного токсину, проте однозначної думки стосовно того, яким чином реалізуються механізми такої резистентності не існує. Відомо, що клітини чутливих до дифтерійного токсину видів ссавців ефективно зв'язують та поглинають молекули токсину. Однак не існує однозначної думки стосовно того, чи відбувається інтерналізація молекул дифтерійного токсину в цитоплазму клітин, резистентних до токсину видів ссавців.

У цій роботі показано, що клітини лінії L929, які походять з організму миші хатньої (*Mus musculus* L.), і є класичною моделлю високорезистентних до дифтерійного токсину клітин, ефективно зв'язують та поглинають рекомбінантні флуоресцентні похідні фрагментів молекули токсину, а саме: субодиниці В токсину та R-домену. Також показано, що існують певні відмінності в характері поглинання та інтерналізації субодиниці В та R-домену клітинами L929 та чутливими клітинами лінії Vero, які походять із організму зеленої мавпи (*Cercopithecus aethiops* L.), і є класичною моделлю високочутливих до дії токсину клітин. А саме: чутливі клітини лінії Vero поглинають приблизно в два рази більшу кількість молекул субодиниці В токсину, ніж резистентні клітини L929; кількість ендосом, що містять субодиницю В, в клітинах Vero зменшується набагато повільніше, ніж в клітинах L929;

середній розмір ендосом із субодиницею В в клітинах Vero на пізніх етапах інкубації (від 60-ти до 75 хв) виявляється меншим, ніж в клітинах L929. Було також показано, що під час інкубації клітин одночасно в присутності як субодиниці В, так і R-домену в інкубаційному середовищі, клітини Vero поглинали інтенсивніше молекули субодиниці В, ніж R-домену, а клітини L929 – інтенсивніше поглинали молекули R-домену, ніж субодиниці В. Поєднання молекул субодиниці В і R-домену разом в одному і тому ж внутрішньоклітинному компартменті виявилось тривалішим в клітинах L929, ніж в клітинах Vero.

Такі відміни можуть вказувати на існування певної різниці в біологічній ролі рецептора дифтерійного токсину, ргоНВ-EGF для чутливих і резистентних до токсину клітин. Одержані результати настановлюють на думку про те, що механізми резистентності до дії токсину реалізуються в процесі проходження молекулами токсину власного внутрішньоклітинного шляху в цитоплазмі клітин. Аналіз взаємодії рекомбінантних фрагментів токсину з клітинами може надати також іншу важливу інформацію для розуміння процесів взаємодії інтактною молекулою дифтерійного токсину з живими клітинами.

РЕМОДУЛЯЦІЯ КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ В ЛЕЙКЕМІЧНИХ КЛІТИНАХ ЗА АПОПТОЗУ, ФОТОІНДУКОВАНОГО ФУЛЕРЕНОМ C₆₀

МАТИШЕВСЬКА О. П.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: matysh@yahoo.com*

Зміна концентрації Ca²⁺ в цитоплазмі, мітохондріях та ЕПР у поєднанні з іншими регуляторними каскадами проведення сигналів відіграє важливу роль у контролюванні клітинної проліферації, апоптозу та злоякісної трансформації. На особливу увагу заслуговує питання про те, яким чином онкотрансформовані клітини уникають Ca²⁺-залежного апоптозу, хоча одночасно здатні використовувати Ca²⁺-імпульси для посилення проліферації. Припускають, що причиною цього є ремоделювання кальцієвого гомеостазу через змінену експресію деяких Ca²⁺-насосів і каналів у плазматичній мембрані та органелах, внаслідок чого попереджається можливість надмірного входу катіона у мітохондрії та активації апоптозу за мітохондріальним шляхом. Актуальним залишається питання щодо розробки підходів до спрямованого впливу на систему Ca²⁺-сигналювання у трансформованих клітинах з метою послаблення їхньої резистентності до індукторів апоптозу. Оскільки низка Ca²⁺-транспортерів є чутливими до дії активних форм кисню (АФК), можливим модифікатором кальцієвого гомеостазу може бути фулерен C₆₀ – вуглецева наноструктура, що виявляє значний прооксидантний потенціал за умови опромінення.

Метою роботи було оцінити показники системи підтримання кальцієвого гомеостазу, а також здатність фотозбудженого фулерену C₆₀ модулювати кальцієвий сигналінг та індукувати апоптоз у лейкемічних клітинах.

Продемонстровано, що в лейкемічних клітинах лінії Jurkat (людини) та L1210 (миші) величина Ca²⁺-пулу ендоплазматичного ретикулула є меншою, а вхід катіона крізь плазматичну мембрану у ЕПР за ємнісним механізмом – значно нижчим, ніж у нормальних лімфоцитах (тимоцити щура). Методом конфокальної мікроскопії з використанням РІТС-міченого фулерена C₆₀ встановлено динаміку проникнення наноструктури в лейкемічні клітини. Показано, що на ранньому етапі після опромінення (320–600 нм) у навантажених фулереном C₆₀ клітинах інтенсифікується продукування АФК та зростає рівень вільного цитозольного Ca²⁺. Ці зміни супроводжуються значним посиленням ємнісного входу Ca²⁺ та порушенням структурно-функціонального стану мітохондрій – виявлено дисипацію мембранного потенціалу мітохондрій та втрату їхньої здатності утримувати Ca²⁺, що призводить до неконтрольованого виходу катіона в цитозоль. Показано, що спустошення мітохондріального Ca²⁺-пулу передуює

виходу цитохрому *c* із мітохондрій та активації каспази-3. Наведені дані свідчать про можливість використання фотозбудженого фулерена C₆₀ для активації Ca²⁺-залежного апоптозу в лейкемічних клітинах.

СТРЕС ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА В НОРМІ ТА ЗА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ

МІНЧЕНКО О. Г., ХАРЬКОВА А. П., МІНЧЕНКО Д. О., ЛИПОВА Н. М.

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

Велика доля протеїнів клітини, переважно мембранних та тих, що секретуються, одразу після синтезу переміщуються в цитоплазмі до ендоплазматичного ретикулума, де за допомогою молекулярних шаперонів відбувається їх дозрівання та згортання до нативної конформації. Ці котрансляційні та посттрансляційні модифікації протеїнів, включаючи формування в них дисульфідних містків та N-глікозилювання, є важливими для їхньої структури та активності і відіграють дуже важливу роль у правильному згортанні протеїнів та формуванні олігомерних комплексів. Ендоплазматичний ретикулум є надзвичайно чутливою до змін гомеостазу внутрішньоклітинною органелою, що дуже точно контролює якість посттрансляційних модифікацій синтезованих протеїнів, правильність їх згортання і дозрівання перед переходом до апарату Гольджі, причому всі незгорнуті чи неправильно згорнуті протеїни затримуються і обов'язково знищуються. А тому реакція клітин на наявність в ендоплазматичному ретикулумі незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів є необхідною для збереження його функціональної цілісності, попереджає розвиток оксидативного стресу і має назву стрес ендоплазматичного ретикулума.

Стрес ендоплазматичного ретикулума є фундаментальним явищем, що забезпечує надійний захист клітин від дії різноманітних чинників. Він забезпечує широкий спектр перебігу різних фізіологічних процесів розвитку та метаболізму, особливо в деяких спеціалізованих клітинах із високим рівнем синтезу секреторних протеїнів, зокрема таких, як бета-клітини, гепатоцити та остеобласти і є необхідним протягом усього життя. Стрес ендоплазматичного ретикулума, як і гіпоксія, є обов'язковим компонентом злоякісного росту, причому вони тісно взаємодіють між собою і контролюють процеси росту та метаболізму, активуючи процеси ангиогенезу. За ожиріння та діабету 2-го типу також спостерігається стрес ендоплазматичного ретикулума, причому саме він є одним із головних чинників розвитку резистентності до інсуліну, в умовах ожиріння, порушеної толерантності до глюкози та діабету 2-го типу. Більше того, стрес ендоплазматичного ретикулума є одним із найважливіших факторів захисту клітин від дії на них токсичних речовин, у тому числі і екотоксикантів. Крім того, стрес ендоплазматичного ретикулума є відповідальним також за загальне зниження ініціації трансляції на фоні вибіркової трансляції певної групи мРНК, що кодують синтез залежних від стресу протеїнів. У зв'язку з цим, функція стресу ендоплазматичного ретикулума полягає саме у реорганізації метаболічних процесів у клітині для забезпечення їх виживання або знищення клітин шляхом апоптозу в разі наявності незворотних змін.

Стрес ендоплазматичного ретикулума опосередковується трьома сенсорно-сигнальними шляхами (PERK, ATF6 та ERN1), причому виключення функції одного з них, а саме ERN1 (від ендоплазматичного ретикулума до ядра-1) призводить до зниження інтенсивності росту пухлин шляхом пригнічення ангиогенезу та процесів проліферації, що є надзвичайно важливим для пошуку нових сучасних шляхів боротьби зі злоякісним ростом за допомогою ідентифікації генів-мішеней і корекції їх експресії або активності протеїнів, що ними кодуються.

PARTICIPATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN NEOANGIOGENESIS

OSTROVSKA L.

StemCiTerra, LLC, Reisterstown, Maryland, USA;

e-mail: ostrovlyubov@gmail.com

Mesenchymal stem cells (MSC) may be utilized to replace or repair damaged tissues and organs and to improve how we treat cancer and other diseases. MSC have properties enabling their direct migration to hypoxic areas and sites of inflammation. Inflammatory and hypoxia mediators such as chemokines, cytokines, growth factors (VEGF) along with tissue damage by-products including lipids (leukotriene), glycosaminoglycans (hyaluran), enzymes, free radicals, fibrinopeptides have been shown to increase targeted migration.

It was hypothesized that migrating MSC can differentiate into endothelial cells and pericytes and form neovasculature in growing tissues.

With magnetic resonance (MR) imaging, we tracked MSC migration and homing to prostate cancer tumor models in mice. Bone marrow derived MSC were loaded with magnetic nanoparticles and infused intravenously in tumor bearing mice. We detected MR signal in tumors within one week after infusion. With immunostaining of dissected tumors, we demonstrated that MSC differentiate into endothelial cells and participate in tumor neovascularization.

There are several possible therapeutic applications of this phenomenon. In tumors, MSC loaded with the nanoparticles that heat in alternating magnetic field can deliver hyperthermia to the most treatment-resistant areas and thus sensitize tumors to chemo- and radio-therapy.

Influencing inflammatory and hypoxia mediators, we can modify signaling processes and enhance MSC homing to regenerating tissues or prevent MSC homing to tumors.

In regenerative medicine, hyperthermia in nanoparticle-loaded stem cells can eliminate mis-injected MSC.

Utilizing stem cells and affecting the pathways that regulate stem cell homing to growing tissues hold potential for restructuring the way we practice medicine and may have a significant impact on the field of antitumor therapy.

МЕХАНІЗМИ ВИДАЛЕННЯ НАТРІЮ З ЦИТОПЛАЗМИ РОСЛИННИХ КЛІТИН ТА ПОСИЛЕННЯ ЙОГО ЗА ДОПОМОГОЮ БІОАКТИВНИХ ПРЕПАРАТІВ

ПАЛЛАДИНА Т. О., БІЛИК Ж. І., КОВАЛЕНКО Н. О.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;

e-mail: tatiana_palladina@ukr.net

Протилежне ставлення тваринних і рослинних організмів до натрію являє засадничу відмінність між ними, оскільки для перших він є необхідним учасником клітинного метаболізму, а для других – токсичним іоном. Ця фундаментальна проблема має також велике практичне значення, оскільки Na^+ є головним катіоном солей, спричинюючих засолення ґрунтів, яке зараз швидко поширюється через глобальне потепління клімату.

Видалення Na^+ із цитоплазми рослинних клітин здійснюється вторинно-активними Na^+/H^+ -антипортерами, які функціонують у плазматичній і вакуолярній мембранах, використовуючи енергію їхніх потенціалів, створених первинноактивними H^+ -насосами. Зараз з'явилася можливість посилення солестійкості рослин шляхом вбудови генів, які кодують протеїни більш потужних Na^+/H^+ -антипортерів або їхньої регуляторної системи. Проте застосування трансгенних технологій підвищує ціну харчової продукції і є причиною супротиву споживачів через сумнів щодо її безпечності.

Метою наших досліджень, здійснених на проростках кукурудзи як виключно солечутливого злака, які експонували на 0,1 М NaCl, стало з'ясування механізмів функціонування Na⁺/H⁺-антипортерів у клітинах коренів та можливість їх посилення за допомогою біологічно активних сполук.

Було знайдено, що в контрольних умовах у клітинах коренів практично функціонував лише вакуолярний Na⁺/H⁺-антипортер, тоді як сольова експозиція проростків зумовлювала короточасну активацію обох антипортерів, особливо слабшого Na⁺/H⁺-антипортера плазматичної мембрани, та посилення експресії їхніх генів.

Присутність у середовищі Na⁺ вимагає енергопостачання Na⁺/H⁺-антипортерів, яке забезпечується первинноактивними H⁺-насосами. При цьому в плазматичній мембрані спостерігається активація H⁺-насоса, репрезентованого H⁺-АТРазою Е-Р-типу, шляхом посилення її транспортної функції та експресії гену. Нами вперше показано, що у вакуолярній мембрані, де потенціал створюється двома H⁺-насосами, Na⁺ посилював лише активність слабшого H⁺-насоса, репрезентованого H⁺-АТРазою V-типу, посилюючи її транспортну функцію і експресію гену, не впливаючи на активність другого H⁺-насоса, репрезентованого H⁺-пірофосфатазою. Таким чином, функціонування потужнішого Na⁺/H⁺-антипортера вакуолярної мембрани підтримується її слабшим H⁺-насосом. .

Порівняння солепротекторної дії синтезованих в Україні біоактивних препаратів «Метіур» та «Івін», які застосовували шляхом передпосівної обробки насіння, показало перевагу «Метіуру». Цей препарат виявив здатність посилювати і подовжувати в часі функціонування Na⁺/H⁺-антипортерів, а також H⁺-насосів, репрезентованих транспортними H⁺-АТРазами, причому його дія здійснюється виключно на молекулярному рівні. Одержані результати засвідчують можливість значного посилення солестійкості рослин без застосування трансгенних технологій.

ПОСИЛЕННЯ ОЗНАК РАКОВИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КОРЕЛЮЄ З РІВНЕМ ЕКСПРЕСІЇ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk₁/CIN85 У КЛІТИНАХ АДЕНОКАРЦИНОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ЛІНІЇ MCF-7

¹ПАСІЧНИК Г. В., ^{1,2}ПОВОРОЗНЮК О. О., ^{1,3}ГОРАК І. Р., ¹ГЕРАЩЕНКО Д. С.,
¹ПЕТУХОВ Д. М., ¹БИЦЬ Н. В., ¹САМОЙЛЕНКО А. А., ¹ДРОБОТ Л. Б.

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

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

³Національний університет «Києво-Могилянська академія», Україна;

e-mail: anya_p@meta.ua

Згідно із сучасною фундаментальною концепцією біології злорякисного росту пухлини представлені функціонально відмінними клітинними популяціями. Дослідження останніх років свідчать про те, що субпопуляції пухлинних клітин, які характеризуються здатністю до ініціювання розвитку пухлин (відомі як ракові стовбурові клітини, CSCs), відіграють важливу роль у формуванні стійкості до хіміо- й радіотерапії та мають підвищений потенціал до метастазування. Нині на доклінічних моделях проводяться дослідження низки фармацевтичних агентів, мішенню яких є CSCs. Поза всяким сумнівом, подальше виявлення компонентів сигнальних мереж, які регулюють біологію цих клітин, сприятиме розробці нових протипухлинних препаратів для комплексного лікування онкологічних захворювань. Метою роботи було визначити вклад адаптерного протеїну Ruk₁/CIN85 у розвиток та підтримання популяції CSCs у культурі клітин MCF-7. Внаслідок проведених досліджень показано, що стабільна надекспресія Ruk₁/CIN85 у клітинах MCF-7 супроводжується посиленням прояву таких ознак CSCs, як здатність до утворення мамосфер, зростання кількості CD44⁺/CD24⁻ клітин та стійкості до хіміотерапевтичних препаратів. Встановлено, що посилення хіміорезистентності клітин зі стабільною надекспресією Ruk₁/CIN85 корелює з активацією ензиму альдегіддегідрогенази, АВС мембранних транспортерів, кіназ Akt та mTOR, транскрипційного фактора NF-κB і підвищенням

стійкості до апоптозу. Слід зазначити, що зниження вмісту Ruk₁/CIN85 за допомогою специфічного Ruk-shRNA лентивірусу послаблює ефекти, виявлені за надекспресії досліджуваного протеїну. Одержані дані вказують на залучення адаптерного протеїну Ruk₁/CIN85 до розвитку та підтримання потенціалу CSCs на моделі клітин аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF - 7.

Робота була виконана за часткової фінансової підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» та гранту УНТЦ, № 5974.

РЕГУЛЯЦІЯ ТІОХРОМОМ АКТИВНОСТІ NAD-ЗАЛЕЖНИХ ЕНЗИМІВ

ПЕТРОВ С. А.

*Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Україна;
e-mail: sergey_1951@ukr.net*

Дослідження останніх років свідчать про наявність у тіаміну і особливо його метаболітів некоензимних функцій в організмі, зокрема, можна вважати встановленим факт впливу цього вітаміну на окислювально-відновні процеси, значна кількість яких здійснюється за допомогою NAD-залежних ензимів.

Тому метою нашого дослідження було вивчення можливої регуляції таких ензимів тіаміном та його метаболітами.

За внутрішньом'язового введення білим щурам тіаміну, тіамінпірофосфату, тіаміндисульфїду, 4-метил-5-оксиетилтіазолу та тіохрому встановлено, що в печінці, тонкому кишечнику та м'язах щурів, яким вводили тіамін, тіаміндисульфїд або тіамінпірофосфат, спостерігається підвищення активності малатдегідрогенази та алкогольдегідрогенази на 20–35% через 30–240 хв після ін'єкції. В аналогічних тканинах щурів, яким вводили тіохром, зареєстровано зменшення активності малатдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази, лактатдегідрогенази та алкогольдегідрогенази на 15–25% протягом 30–480 хв після ін'єкції. Такий ефект може бути результатом як прямої дії тіаміну та його метаболітів, так і опосередкованої дії.

Тому в подальшому ми вивчали дію тіаміну та його метаболітів на активність виділених та очищених вищезазначених ензимів.

Для подальших досліджень було використано виділені та очищені лактатдегідрогеназа, ізоцитратдегідрогеназа, малатдегідрогеназа і алкогольдегідрогеназа. Вивчено вплив на активність цих ензимів тіаміну, тіамінпірофосфату, тіаміндисульфїду, 4-метил-5-оксиетилтіазолу та тіохрому.

Внаслідок досліджень було встановлено, що з усіх досліджених метаболітів тіаміну тільки тіохром знижує активність вказаних вище ензимів. Цей ефект спостерігається за наявності в інкубаційному середовищі еквімолярних концентрацій NAD і тіохрому. У разі додавання NAD в концентрації, яка в чотири рази перевищує концентрацію тіохрому, інгібіторний ефект останнього зникає.

Під час вивчення зв'язування тіаміну та його метаболітів із NAD-залежними ензимами встановлено, що тільки тіохром здатний зв'язуватися з цими ензимами в істотній кількості. Додавання в інкубаційне середовище високих концентрацій NAD значно зменшує кількість зв'язаного тіохрому.

За з'ясування механізмів інгібіторної дії тіохрому на NAD-залежні ензими встановлено, що цей метаболіт тіаміну є конкурентним інгібітором по відношенню до NAD.

Таким чином, наші дослідження свідчать, що метаболіт тіаміну – тіохром – виконує функції конкурентного інгібітора деяких NAD-залежних ензимів.

PLASMA MEMBRANE LIPID ORDER ON APOPTOSIS AND ERYPTOSIS

¹PYRSHEV K. A., ²CSUCS G., ¹DEMCHENKO A. P.

¹*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*Scientific Center for Optical and Electron Microscopy, ETH Zurich;*

e-mail: pyrshevka@gmail.com

Apoptosis, or programmed cell death, involves various signaling reactions dealing with energy metabolism, degradation of molecules and exposure of receptors, many aspects of which are unclear (Elmore, 2007). In eryptosis (the suicidal programmed cell death of erythrocytes) this process is simplified by the absence of mitochondrial depolarization and condensation of nuclei. It shares several other features of apoptosis similar to death receptor pathway of nucleated cells. As a result, the loss of intracellular potassium, cell shrinkage, breakdown of asymmetry in phosphatidylserine (PS) location in plasma membrane and blebbing (vesiculation of the plasma membrane) are observed (Lang and Qadri, 2012). Therefore the most important role in this process is attributed to plasma membrane. It is known that uncontrolled eryptosis is connected with such pathological states as cancer, diabetes and even blood clotting disorders. Moreover, erythrocytes share higher sensitivity to most of apoptosis factors (Chung, Bae et al., 2007; Lang, Lang et al., 2012).

The aim of this research was to compare some properties of plasma membrane of nucleated cells and erythrocytes in the course of apoptosis.

Cellular studies were performed to characterize the lipid order changes induced by apoptosis in outer plasma membrane leaflet of erythrocytes in comparison with that of nucleated cells. The novel fluorescent probe NR12S (Kucherak, Oncul et al., 2010) was applied for lipid order detection. Applying Z-DEVD-FMK we showed the strong connection of NR12S response with caspase 3 activity and phospholipid exposure in HeLa cells. In contrast, erythrocytes stained with NR12S did not display the difference in response between eryptotic and intact cells. This is at odds with other parameters characterizing eryptotic erythrocytes, such as PS exposure and increase of the Ca²⁺ concentration. It is known, that the lipid redistribution during apoptosis is controlled by two types of lipid scramblases SCRM and Xkr-8 (Frasch, Henson et al., 2000; Suzuki, Denning et al., 2013). However, Xkr-8 requires direct activation by caspase-3 which could not be typical for erythrocytes. So, the lipid redistribution during eryptosis is much less pronounced than in nucleated cells. Moreover, the microscopy data showed the increase of NR12S fluorescence intensity in the regions of blebs formation, suggesting the presence of lipid disorder domains in strongly curved parts of outer plasma membrane leaflet. In this line, the coarse-grained molecular dynamics simulations demonstrated the efficient membrane bending in the regions enriched by PS and cholesterol (Yesylevskyy, Demchenko et al., 2013). Therefore we believe that the lipid redistribution during eryptosis demonstrates higher level of local dynamics resulting in plasma membrane vesiculation. We speculate that this could be the result of lower expression of scramblase on the erythrocytes' plasma membrane or of decreased Xkr-8-dependent flip-flop leading to retaining the lipid order and hydration dynamics in outer leaflet of the plasma membrane on initial level.

EVALUATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR HUMAN PLACENTAL EXPLANTS

RODRIGUEZ R. R., KORNIEIEVA K. L., OBOLENSKAYA M. Yu.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: northernwizard@yandex.ru*

The cultivation of placental explants is a method of choice for *ex vivo/in vitro* investigation of placental functions as the explants contain all type of placental cells and preserve their native 3D organization and intercellular communication. Still, some parameters of cultivation are under debate e.g. the preferences of frequently used 8 and 20% oxygen (O₂) in ambient air.

The goal of the study - to verify whether the 8 or 20% O₂ in ambient air better support the survival of placental explants.

Placental individual clumps of villi (~2-3 mm) were dissected in sterile cold PBS, transferred to serum-free media DMEM/Ham's-F12, supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 1% canamycin and cultivated at 8% or 21% O₂, with 5% CO₂ at 37 °C. The content of O₂ in culture medium was assessed with oxy-sensitive electrode. The lactate dehydrogenase (LDH) activity in the medium and the abundance of RNA encoding hypoxia induced factors (HIF) 1 α and 2 α were tested at 6, 12 and 24 h of cultivation as the markers of explants viability.

The concentration of O₂ in culture medium was 4.9 mg/L at 8% and 7.3 mg/L at 21% O₂ in ambient air. The LDH activity was two times higher at 8% O₂ than at 21%. The abundance of HIF 1 α and HIF 2 α mRNA, detected by qRT-PCR in real time was 174.6 and 48.2 copies/ng total RNA in the fresh tissue, respectively. They change in the opposite direction during the cultivation. HIF 1 α abundance is 4.3 times more while HIF 2 α is 15-25 times less after 6h and 24 h cultivation at 8% O₂, correspondingly. The changes at 21% O₂ are as follows - the abundance of HIF 1 α RNA is 3 and 2.5 times more and HIF 2 α RNA is 2.5 times and 40 times less after 6 and 24 h of cultivation in comparison with fresh tissue.

There is a positive correlation between O₂ concentration in the culture medium and the ambient air - the 2.5 fold increase in ambient air is associated with 1.5 increase in the culture medium. The higher is the O₂ supplementation in the mentioned range the less is the LDH activity in the cultivation medium and the less abundant is HIF 1 α RNA - both parameters are the classical markers for oxystress. On the basis of these data we suggest that the cultivation at 21% O₂ in ambient air is physiologically more relevant than that at 8% O₂ though the interpretation of the results have to be taken with definite caution as the behavior of any biological system in artificial conditions is not completely similar to the situation *in vivo*.

УЧАСТЬ РЕДУКУЮЩИХ МОНОСАХАРИДІВ У НЕЕНЗИМАТИЧНИХ ПРОЦЕСАХ *IN VITRO* ТА *IN VIVO*

СЕМЧИШИН Г. М.

*Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника,
Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: semchyshyn@pi.if.ua*

Участь вуглеводів у неензиматичних процесах, зокрема вільнорадикальному окисленні, глікації, автоокисленні тощо, активно досліджується протягом останніх десятиліть. Це пов'язано як із пошкоджуючими, так і захисними ефектами редукуючих вуглеводів. Більшість робіт у цій галузі присвячено глюкозі, у той час як неензиматичні взаємодії фруктози не привертають достатньої уваги, незважаючи на те, що тривале її споживання призводить до розвитку різноманітних захворювань та пришвидшує старіння. Для порівняння ролі глюкози і фруктози в утворенні продуктів неензиматичних перетво-

рень за експериментальних умов, близьких до фізіологічних, було використано інтактні клітини *Saccharomyces cerevisiae* як модель *in vivo* та екстракти дріжджових клітин як модель *in vitro*. Клітини дріжджів та їх екстракти інкубували із глюкозою і фруктозою у високих концентраціях. Показано, що: 1) *in vitro* фруктоза має вищу реакційну здатність, ніж глюкоза, і призводить до утворення більшої кількості продуктів автоокислення і глікації; 2) немає вираженої різниці між внутрішньоклітинним рівнем продуктів глікооксидації в клітинах, які стресували високими концентраціями глюкози і фруктози; 3) активність захисних ензимів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонредуктази, гліоксалаз 1 і 2) зростає в клітинах, які інкубували з обома моносахаридами, що свідчить про розвиток за цих умов оксидативного/карбонільного стресу; 4) активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази істотно знижується за умови стресу дріжджів обома гексозами, демонструючи високу чутливість ензиму до активних карбонільних сполук та активних форм кисню; 5) фруктоза ефективніше, ніж глюкоза, активує гліоксалази.

Отже, незважаючи на вищу реакційну здатність фруктози *in vitro*, істотної різниці між впливом глюкози і фруктози на внутрішньоклітинний рівень продуктів глікооксидації за індукції стресу в інтактних клітинах високими концентраціями моносахаридів не виявлено. Захисні ензими відіграють важливу роль у захисті дріжджів від вуглеводного стресу. Фруктоза, порівняно з глюкозою, сильніше активує гліоксалази, основна роль яких полягає у знешкодженні α -дикарбонільних сполук.

МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ В ОРГАНІЗМІ ТА ПУХЛИНИ В ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ РЕЗИСТЕНТНОСТІ КАРЦИНОСАРКОМИ WALKER-256 ДО ДОКСОРУБІЦИНУ

*ТОДОР І. М., ЛУК'ЯНОВА Н. Ю., ШВЕЦЬ Ю. В.,
ЛОЗОВСЬКА Ю. В., ЧЕХУН В. Ф.*

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: todor_igor@yahoo.com*

Властивості клітин, у тому числі злоякісних, та їх життєдіяльність залежать від відповідних концентрацій іонів. Відомо, що іонний гомеостаз впливає на проходження біоенергетичних реакцій. Біохімічні реакції завжди вимагають підтримання відповідного водно-сольового балансу як у пухлині, так і в організмі пухлиноносія. Особливо це питання стає дуже вагомим, коли йде мова про виникнення та розвиток медикаментозної резистентності злоякісних пухлин.

Метою було дослідити важливі показники енергообміну, вміст K^+ та Mg^{++} як в організмі (периферична кров), так і в карциносаркомі Walker-256 у динаміці розвитку резистентності до доксорубіцину.

Резистентність карциносаркоми Walker-256 до доксорубіцину виробляли шляхом 12 послідовних перещеплень пухлини після проведеного курсу хіміотерапії. Вихідний штам гальмувався препаратом на 65%, тоді як проміжні резистентні підштами – на 30% та 2% відповідно. Визначення біохімічних показників у сироватці крові та гомогенатах пухлинної тканини, а саме: рівня калію, магнію, лактату, глюкози, активності лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, проводили за допомогою біохімічного та імуноензимного аналізатора GBG ChemWell 2990 (США) із застосуванням стандартних наборів для приладу. Полярографічним методом визначали показники мітохондріального окисного фосфорилування. Дослідження мітохондріального мембранного потенціалу проводили на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter Epics XL з використанням барвника JC-1.

Встановлено, що розвиток медикаментозної резистентності призводить до зниження вмісту K^+ , Mg^{++} , глюкози в сироватці крові пухлиноносіїв та підвищення цих показників у пухлинній тканині. При цьому поступова втрата пухлиною чутливості характеризується зниженням в ній інтенсивності гліколізу та підвищенням мітохондріального окисного фосфорилування і пентозофосфатного шляху розщеплення глюкози, який призводить до інтенсивнішого утворення NADPH. Відновлений NADP

необхідний для багатьох реакцій відновлення, що дуже важливо для захисту пухлинних клітин від пошкоджуючих агентів.

Встановлено, що розвиток медикаментозної резистентності пухлин призводить до певних метаболічних змін в організмі та пухлині. Подальше дослідження таких змін дозволить визначити адекватні пухлинні та позапухлинні маркери резистентності.

MECHANISMS OF REALIZATION OF ESTRADIOL EFFECTS IN ADRENOCORTICAL CELLS

TRONKO M., KOVZUN O., MIKOSHA A.

*State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv;
e-mail: asmikosha@gmail.com*

Estrogens have a wide array of biological effects, targeting both genomic and nongenomic mechanisms. Classically, the estrogen receptors activating the transcription machinery in the nucleus were thought to be distinct from the extranuclear estrogen receptors. The regulatory effects of estradiol on the function of adrenal gland cortex were studied in this work. Mechanisms of realization of estradiol effects were investigated out *in vivo* and *in vitro*.

The aim of the work is a measurement of corticosteroids secretion, levels of protein kinase A and C, ERK1/2, JNK, p38 mitogen-activated protein kinases, transcription factors c-Jun and c-Fos following estradiol treatment in adrenal cortex.

It was shown, that 11-hydroxycorticosteroids level increased in the blood and incubation medium under the influence of estradiol.

Activity of protein kinase A increased in the cytosol and membrane fraction of adrenocorticocytes (1.5-fold) under the influence of estradiol. Activity of protein kinase C significantly raised 1.5-fold in the membrane fraction of adrenocortical cells. Our results suggest that cAMP-dependent protein kinase A and protein kinase C mediate estradiol effects in adrenal cortex.

Estradiol influence on ERK1/2 level is very significant. The level of ERK1/2 was increased 1.7-fold in adrenocortical tissue after 3 days injection of 100 mkg (per rat) of estradiol. However, the level of p38 kinase and protein kinase JNK was not changed in these conditions. The transcription factor AP-1, which includes c-Fos and c-Jun factors, is involved in realization of estradiol signal transduction. The level of c-Fos protein raised 1.8-fold after estradiol treatment, c-Jun protein was not increased. We conclude that ERK1/2 kinase and transcriptional factor c-Fos mediate fast estrogen signal transduction in adrenocorticocytes.

The effect of 17 β -estradiol on the change of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cytochrome P450_{sc} levels in adrenal cortex tissue was studied. The adding of 17 β -estradiol to incubation medium caused increasing of the StAR and cytochrome P450_{sc} mRNA level in adrenocorticocytes on 38% and 79% respectively in comparison with control. The obtained data suggest that 17 β -estradiol caused rise corticosteroid production after the movement of cholesterol across the mitochondrial membrane by the StAR protein and subsequent conversion to pregnenolone by P450_{sc}.

The main interactions and transregulation influences between different second messenger systems, which mediate intracellular signal transduction of estradiol and provide functional activity of adrenocortical cells are discussed.

IRON ACQUISITION AND REGULATION OF THIS PROCESS IN YEAST *Pichia guilliermondii*

¹FEDOROVYCH D., ¹BORETSKY Y., ¹BOBAK Ya.,
¹PROKOPIV T., ^{1,2}SIBIRNY A.

¹Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;

²University of Rzeszow, Poland;

e-mail: fedorovych@cellbiol.lviv.ua

Iron is required for the survival of most organisms, primarily through its role as a cofactor in essential metabolic reactions. At the same time the reactivity of iron results in the formation of highly toxic hydroxyl radicals via the Fenton reaction. Biologic targets of this oxidant are membrane lipids, proteins, and nucleic acids. These opposing properties of iron require mechanisms that regulate both uptake and storage of this critical nutrient. It should be noted that iron deficiency is also stressful. Iron deficiency causes oversynthesis of riboflavin in several species of yeast (*Candida famata*, *Pichia (Candida) guilliermondii*, *Candida albicans*, *Schwanniomyces occidentalis*), bacteria (*Clostridium acetobutylicum*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Shewanella oneidensis*) and plants (tobacco, soybeans, sugar beets, sunflower). However, the mechanisms of such regulation remain unclear.

P. (C). guilliermondii mutants exhibiting constitutive high level of riboflavin production (*hit1*, *rib80*, *rib81*, *fra1*, *yfh1*) display also defects in regulation of iron transport. The physiological significance of such regulation remains to be clarified. So, it can be very informative to study iron acquisition in this yeast species in order to understand peculiarities of regulation of riboflavin biosynthesis. Earlier, we demonstrated that *P. (C). guilliermondii* possesses at least two iron transport systems: siderophore and citrate-dependent. In contrast to *Saccharomyces cerevisiae*, heme is involved in regulation of iron uptake by *P. (C). guilliermondii* cells. Using similarity search, *P. (C). guilliermondii* genes potentially involved in iron acquisition were identified. This yeast possesses at least four genes potentially coding for ferrireductases (PGUG_05342.1, GUG_02567.1, PGUG_05338.1, PGUG_04887.1), four genes encoding iron permeases (PGUG_04984.1, PGUG_03365.1, PGUG_05343.1, PGUG_05307.1) and two genes coding for ferroxidases (PGUG_02941.1, PGUG_03360.1) that are homologous to *S. cerevisiae* genes *FRE1*, *FTR1* and *FET3*, correspondingly. Transcription of *FRE* genes of *P. (C). guilliermondii* is activated under iron deprivation condition leading to dramatic increase of ferrireductase activity. Some of proteins mentioned above were already annotated in the *P. (C). guilliermondii* genome, but there are no direct proofs of their function and no data suggesting their iron-dependent regulation. Further, we studied regulation of transcription of two genes potentially encoding ferroxidases, PGUG_02941.1 PGUG_03360.1, designated as *FET31* and *FET32*, respectively. Both *FET31* and *FET32* genes encode polypeptides that possess approximately 80% of homology between each other and share at least 70% of homology with *S. cerevisiae* Fet3 protein. Identified *P. (C). guilliermondii* genes encoding ferroxidases possess different patterns of expression under iron repletion conditions whereas their expression is activated under iron deficiency conditions or in a mutant strains defective in regulation of iron acquisition. *P. (C). guilliermondii* has no homologues of *S. cerevisiae* low-affinity iron transporter, Fet4p and cell wall mannoproteins Fit1-3p. It can be speculated that occurrence of three genes in *P. (C). guilliermondii* putatively encoding cation transporters (homologous to Smf1p) compensate somehow absence of Fet4p homologous.

No homologues of *C. albicans* proteins Als3p, Rbt51p, Pga7p, Csa1p required for iron uptake from a host sources were found in *P. (C). guilliermondii* genome whereas both species regulate iron metabolism via Sef1p transcriptional network and do not possess a homologue of *S. cerevisiae* transcriptional regulator Aft1p. Presented data suggest that *P. (C). guilliermondii* can be used as a suitable and safe reference for studying iron metabolism in other pathogenic yeasts including *C. albicans*.

**PARTICULAR SENSITIVITY OF METALLOTHIONEIN TO SEPARATE
AND COMBINE EFFECT OF NANO ZINC OXIDE AND NIFEDIPINE
ON FROG *Rana ridibunda***

¹FEDORUK O., ^{1,2}GNATYSHYNA L., ¹STRAVSKA M., ¹MARCHYK V.,
¹PYNYLO N., ^{1,2}FALFUSHYNSKA H., ¹STOLIAR O.

¹Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine;
²I. Ya. Horbachevski Ternopil State Medical University, Ukraine;
e-mail: lesyafoxy@i.ua

Zinc (Zn^{2+}) is involved in many biochemical and physiological processes in vertebrate animals' tissues, being a structural component of many proteins, signalling molecules and can also modulate function of ionic channels. Zinc-buffering and stress-related proteins metallothioneins (MTs) of frog are distinguished from other homologous proteins by particular instability and the property to lost easily zinc under unfavourable conditions. Their ability to utilise zinc from its widely explored form nanooxide ZnO (n-ZnO) is unknown. The aim of this study was to examine the responses of MTs from the liver of frog *Rana ridibunda* on the effect of waterborne Zn^{2+} (3.1 μ M), correspondent concentration of nZnO, calcium channel blocker nifedipine (Nfd, 10 μ M), and combine effect of Nfd and nZnO (Nfd+nZnO) during 14 days. MTs concentrations were determined from related metals (MT-Me (Zn, Cu, Cd)), thiols (MT-SH) and by *ELISA Kit* (MTi). Oxidative stress response was assessed from redox index of glutathione (GSH/GSSG), activity of superoxide dismutase (SOD), and oxyradical (OR) formation. To evaluate the degree of injury, DNA strand breaks and activity of the main effector enzymes in the apoptotic cascades, caspase-3 and cathepsin D (total and free) in the liver were also analysed.

In all exposed groups, the elevation of MT-SH concentration was indicated. Nfd provoked particularly prominent (2-fold) elevation of MT-SH. MT-Me and MTi concentrations were increased by about 40% in Zn- and Nfd+nZnO-groups. However, in Nfd-group their values were decreased by 40%. Consequently, in all exposed groups (particularly in the case of Nfd-group), the increase in MTs unsaturated form, apothionein was detected. The evaluation of antioxidant potential in frog liver shown the elevation of GSH concentration in all exposed groups (except nZnO-group), particularly in Nfd-group (~ five times) accompanied with the increase of GSH/GSSG ratio and activation of SOD (a ~2-fold increase) in Nfd-group. Exposures to Zn and nZnO caused the decrease in OR formation confirming the effectiveness of antioxidant defense, while Nfd provoked its elevation by 56%, and Nfd-nZnO did not change it. All exposures caused the elevation in DNA fragmentation and caspase-3 activity (particularly Nfd+nZnO) and total cathepsin D levels. Lesser or opposite (in nZnO-group) changes were detected for free cathepsin D.

To summarize, in all studied exposures MTs of frog were more effective as oxidative stress-related proteins than Zn-chelating molecules. The rise of apothionein concentration could cause the preferences in antioxidant defense but also the toxicity of non-buffering Zn. The effect of Nfd provoked most prominent antioxidant response with the involving of MTs, reflecting the depending of MT function in frog on extracellular calcium influx.

This work has been granted by the Ministry of Education and Science of Ukraine (Project # 125B) and State Fund of Fundamental Research (GF/056/017). The authors are grateful to Dr O. V. Fedorova (I. Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of RAS, Yekaterinburg, Russia) for the assignment of substances.

**ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН АКТИВНОСТІ СИСТЕМИ
NO-СИНТАЗА/АРГІНАЗА В ОРГАНАХ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ
ЗА СТРЕСУ ТА БЛОКУВАННЯ ЦОГ-1/ЦОГ-2, ЦОГ-2/5-ЛОГ**

*ФОМЕНКО І. С., ПАНАСЮК Н. Б., БОНДАРЧУК Т. І., ДЕНИСЕНКО Н. В.,
ІЛЬКІВ І. І., СКЛЯРОВ П. О., БІЛЕЦЬКА Л. П., СКЛЯРОВ О. Я.*

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна

Застосування нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) на тлі стресу часто спостерігається під час перебігу різних патологій, що може спричинювати порушення функціонування органів травної системи (ОТС). Дія стресу призводить до зміни рівня активності NO-синтази, аргінази, циклооксигенази та процесів ліпопероксидації в тканинах, тоді як блокування синтезу ендогенних простагландинів зумовлює дисрегуляцію численних функцій клітин. Враховуючи те, що NO-синтаза та ЦОГ/ПГЕ2 системи регуляторно пов'язані між собою, метою дослідження було визначення змін активності NO-синтази, аргінази та процесів ліпопероксидації в умовах блокування циклооксигенази та ліпооксигенази на тлі стресу.

Дослідження виконано на 42 щурах вагою 180–220 г згідно з міжнародними умовами проведення експериментів із лабораторними тваринами. Щурів було розподілено на 5 груп: 1) контрольна група; 2) тварини, яким моделювали водно-імобілізаційний стрес (ВІС) протягом п'яти годин; 3) тварини, яким вводили неселективний блокатор ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксен на тлі стресу; 4) тварини, яким вводили селективний блокатор ЦОГ-2 целекоксиб на тлі ВІС; 5) тварини, яким вводили блокатор ЦОГ-2/ 5-ЛОГ 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксibenзиліден)-тіазол-4-один (2A5DHT) на тлі ВІС. Досліджувані НПЗП вводили в дозі 10 мг/кг *per os* за 30 хв до моделювання стресу. У гомогенатах визначали активність NO-синтази, аргінази, вміст ТБК-активних продуктів, нітрит-аніона, активність супероксиддисмутази (СОД), у плазмі крові – концентрацію L-аргінину.

ВІС спричинює різного ступеня зростання активності iNOS в ОТС: у слизовій оболонці шлунка – в 5 разів ($P < 0,01$), у тканині підшлункові залози – в 4,7 раза ($P < 0,01$), у слизовій оболонці тонкої кишки у 2,6 раза ($P < 0,05$), у слизовій оболонці товстої кишки – 4,7 раза ($P < 0,01$). При цьому активність cNOS знижується від 10 до 65%, аргінази – від 31 до 52%. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 на тлі ВІС зумовлює зменшення активності iNOS в ОТС від 38 до 51%, активність cNOS має тенденцію до зростання, активність аргінази виражено не змінюється. Блокування ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ не змінює активність iNOS та вміст ТБК-активних продуктів, при цьому зростає активність cNOS та активність аргінази порівняно з показниками за дії ВІС.

Дійшли висновку, що ВІС спричинює зростання активності iNOS в ОТС, що супроводжується підвищенням процесів ліпопероксидації та зниженням активності cNOS і аргінази. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 на тлі ВІС призводить до зниження iNOS, тоді як блокування ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ має органоспецифічний характер. Виражене зниження активності iNOS на тлі стресу в умовах блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 свідчить про домінуючу роль простагландинів, що синтезуються ЦОГ-1, в активації iNOS на тлі ВІС у щурів.

COMPLEX APPROACHES FOR GENE REGULATORY NETWORKS RECONSTRUCTION AND VALIDATION*¹FROLOVA A., ²WILCZYNSKI B.**¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: a.o.frolova@imbg.org.ua;**²Institute of Informatics, University of Warsaw, Poland*

The gene regulatory network (GRN) reflects the interaction between its various elements, genes or proteins, and provides the most complete information on the regulation of cell functioning. The significant problems the scientists encounter are an accuracy of reconstruction together with validation and computational complexity of the GRN inference, which means that the time required to reconstruct GRN increases very quickly as a size of the data grows. Though various formalisms are already proposed to reconstruct GRN the main challenges still remain.

The goal of the study was to improve the accuracy of inference algorithms by applying ensemble-method and to validate obtained results using synthetic data based on biological networks topology.

Network inference methods have complementary advantages and limitations under different contexts, which suggest that combining the results of multiple inference methods could be a good strategy for improving predictions.

We studied different ways how to combine graphs (union, intersection) as well as edge scores and how particular combinations affect the validation of the resulting networks. In order to get reconstructed networks we used different inference software. One of such software is BNFinder – tool for inferring optimal Bayesian networks, which was already successfully applied not only to reconstruction gene regulatory networks, but also to linking expression data with sequence motif information, identifying histone modifications connected to enhancer activity and to predicting gene expression profiles of tissue-specific genes. In result we got a new parallel version of BNFinder, which we successfully tested in Ukrainian GRID infrastructure.

In addition to BNFinder we used MiNET R package, which implements information-theoretic approaches to infer gene regulatory networks: ARACNE, MRNET, MRNETB, CLR. Test dataset, it provides, contains 100 samples and 50 genes generated by the publicly available SynTReN generator using a yeast source network. Complementary to this validation of algorithms we used expression profiles with corresponding golden networks provided by DREAM initiative - a Dialogue for Reverse Engineering Assessments and Methods. The topologies of networks we used are generated by extracting modules from known *in vivo* gene regulatory network structures such as those of *E. coli* and *S. cerevisiae*.

The best result was obtained by the combination of two different algorithms – BNFinder and MRNET. The characteristics of this combination (AUROC - area under receiver operating characteristic and AUPR - area under precision recall) appeared substantially better than those of each specified methods and their combinations.

Here we present results of this study with the best-scored ensemble-method – undirected graph union with linear combination of scores.

**РОЛЬ ПРОТЕЇНІВ РОДИНИ IGFBR У МЕХАНІЗМАХ
ПРИГНІЧЕННЯ ПРОЛІФЕРАЦІЇ КЛІТИН В УМОВАХ ВИКЛЮЧЕННЯ
ОПОСЕРЕДКОВАНОГО ERN1-СИГНАЛЬНОГО ШЛЯХУ СТРЕСУ
ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА**

ХАРЬКОВА А. П., КАРБОВСЬКИЙ Л. Л., МІНЧЕНКО О. Г.

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

Фактори росту відіграють важливу роль у регуляції процесів проліферації та міграції клітин у різних тканинах, особливо в злоякісних пухлинах. IGFBR (insulin-like growth factor binding protein) – це родина секреторних протеїнів, що здатні з високою афінністю зв'язувати IGF (insulin-like growth factor), регулюючи, таким чином, його біологічну активність. Відомо, що дія IGF реалізується через специфічні рецептори (IGF-1R) і залежить від IGFBR та специфічних протеїназ, що розщеплюють IGFBR, причому розщеплення IGFBR цими протеїназами призводить до вивільнення IGF і зміни активності IGF-1R. Саме таким чином активуються сигнальні шляхи, що залучені до контролю процесів проліферації та диференціації клітин, онтогенезу і метастазування. Важливу роль у рості злоякісних пухлин відіграє стрес ендоплазматичного ретикулума та умови нестачі поживних речовин і гіпоксії, причому пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 (endoplasmic reticulum to nucleus-1), який є одним з основних сенсорно-сигнальних ензимів стресу ендоплазматичного ретикулума, приводить до зниження проліферації пухлинних клітин.

Метою роботи було вивчення експресії генів протеїнів родини IGFBR у клітинах гліоми лінії U87 та її сублінії із пригніченою активністю ERN1 в умовах гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну.

Встановлено, що блокада ензиматичної (як протеїнкіназної, так і ендорибонуклеазної) активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 знижує рівень експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* і *IGF2BP3* в клітинах гліоми лінії U87 і корелює із пригніченням проліферації цих клітин. В той самий час, в умовах пригнічення активності ERN1 рівень експресії таких генів, як *IGFBP3*, *IGFBP6*, *IGFBP7*, *IGFBP8* та *IGFBP10* істотно підвищується, причому збільшення рівня експресії *IGFBP3* може також бути причетним до пригнічення проліферації клітин гліоми, оскільки цей протеїн має антипроліферативні властивості. Ефект *IGFBP3* реалізується шляхом зв'язування з IGF та інгібування його ефектів, а також індукування апоптозу та пригнічення ангиогенезу в клітинах різних пухлин. Показано, що в умовах гіпоксії рівень експресії більшості досліджених нами генів посилюється, причому величина цього ефекту переважно залежить від функції сигнального ензиму ERN1. В умовах дефіциту глутаміну в середовищі також спостерігається посилення експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP4* та *IGFBP10*, але рівень експресії генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* при цьому істотно не змінюється в обох типах клітин. Цей ефект дефіциту глутаміну не залежить від функції сигнального ензиму ERN1. Водночас, в умовах дефіциту глюкози в середовищі рівень експресії генів *IGFBP2*, *IGFBP7* та *IGF2BP3* знижується в обох типах клітин гліоми, а блокада функції ERN1 посилює цей ефект.

Таким чином, результати роботи продемонстрували, що експресія генів протеїнів родини IGFBR у клітинах гліоми лінії U87 здебільшого залежить від функціонування сенсорно-сигнального ензиму ERN1 і змінюється в умовах гіпоксії, дефіциту глутаміну або глюкози, і що зниження рівня експресії генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3*, як і підвищення рівня експресії інших генів *IGFBP* у клітинах гліоми в умовах блокади функції ERN1, може бути причетним до пригнічення проліферації цих клітин.

ВПЛИВ АНТАГОНІСТІВ КАЛЬМОДУЛІНУ НА ПОЛЯРИЗАЦІЮ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ МЕМБРАН ТА КОНЦЕНТРАЦІЮ ІОНІЗОВАНОГО Ca В КЛІТИНАХ МІОМЕТРІЯ

ЦЛИКОВ С. Г., ЄВТУШЕНКО М. Є., КАРАХІМ С. О.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: sshlykov@biochem.kiev.ua*

Вплив антагоністів кальмодуліну, кальмідазоліуму та трифлуоперазину на мембранний потенціал мітохондрій міометрія та концентрацію іонізованого Ca в цитоплазмі клітин та матриксі мітохондрій досліджували з використанням методів проточної цитометрії, конфокальної мікроскопії, спектроскопії та залученням потенціалчутливих (MTG, TMRM) та кальційчутливого (Fluo 4AM) флуоресцентних зондів. На фракції ізольованих мітохондрій міометрія невагітних щурів із використанням проточного цитометра було встановлено, що антагоністи кальмодуліну (кальмідазоліум та трифлуоперазин) модулюють рівень поляризації мембран мітохондрій. Показано, що кальмідазоліум у концентрації 1–10 мкМ дозозалежно знижує мембранний потенціал мітохондрій. Водночас, трифлуоперазин у концентраціях 10–100 мкМ діє по-різному: 10 мкМ – збільшує поляризацію, тоді як 100 мкМ – спричинює майже повну деполяризацію мітохондріальних мембран. В експериментах, виконаних із використанням методу конфокальної мікроскопії із залученням потенціалчутливих флуоресцентних зондів MTG та TMRM і використанням первинної культури клітин міометрія, продемонстровано, що попередня інкубація клітин міометрія протягом 10–15 хвилин з 10 мкМ кальмідазоліумом чи 100 мкМ трифлуоперазином супроводжується практично повним гасінням флуоресцентного сигналу зонда TMRM. Подібні результати одержано за інкубації клітин міометрія з 10 мкМ протонофором CCCP або 10 мМ NaN₃, інгібітором дихального ланцюга. За навантаження клітин міометрія Ca²⁺-чутливим флуоресцентним зондом Fluo 4AM продемонстровано, що інкубація клітин з антагоністом кальмодуліну – 10 мкМ кальмідазоліумом, призводить до збільшення рівня іонізованого Ca в цитоплазмі клітин. Попередня інкубація фракції мітохондрій міометрія зі 100 мкМ трифлуоперазином супроводжується різким зростанням рівня іонізованого Ca в них (тестували в умовах використання Fluo 4AM та спектрофлуориметра). Таким чином, попередня інкубація клітин міометрія або фракції мітохондрій міометрія з антагоністами кальмодуліну супроводжується як деполяризацією мембран мітохондрій, так і збільшенням рівня іонізованого Ca в цих клітинах, що доводить залучення кальмодуліна до регуляції обміну іонів Ca в мітохондріях міометрія.

БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ ФУНКЦІОНУВАННЯ РЕТИНОЇДЗАЛЕЖНИХ МЕТАБОЛІЧНИХ І СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

¹ШМАРАКОВ І. О., ¹МАРЧЕНКО М. М., ²БЛЕНЕР В. С.

*¹Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: igor.shmarakov@gmail.com;
²Columbia University, New York, USA*

Ретиноїди (вітамін А та його метаболіти) – потенційні регулятори клітинної проліферації, диференціації та апоптозу. Ретиноева кислота, будучи основною транскрипційно активною формою ретиноїдів, залучена в регуляцію більш ніж 500 генів. Повний *транс*- і *9-цис*-ізомери ретиноевої кислоти регулюють транскрипцію шляхом зв'язування з рецепторами ретиноевої кислоти (RAR α , - β , та - γ) і ретиноїд X-рецепторами (RXR α , - β , та - γ). Усі шість цих лігандзалежних транскрипційних факторів експресуються в печінці, на яку припадає близько 70% усіх ретиноїдів, присутніх у здоровому організмі, з яких до 80% зберігається у формі ретиніл-ефірів в ліпідних краплях стелатних клітин печінки. Цілком очевидно, що така висока локальна концентрація ретиноїдів зумовлена необхідністю

реалізації біоактивними метаболітами вітаміну А важливих функцій, особливо у разі ураження органу, що потребує миттєвої регенеративної відповіді та підтримки метаболічного гомеостазу організму. Враховуючи взаємозв'язок між активністю ретиноїдів та сигнальними шляхами клітинної проліферації та апоптозу, а також їхню роль у регуляції метаболічних шляхів, важливим є розуміння біохімічних аспектів функціонування метаболітів вітаміну А як у нормі, так і за розвитку патологічних станів, що безумовно виявиться ключем до вирішення специфічних прикладних завдань корекції патологій.

За вивчення залучення метаболітів вітаміну А в регенераційні процеси показано, що ретиноїди, вивільнені внаслідок гідролізу ретиніл-ефірів у відповідь на резекцію паренхіми печінки, необхідні для забезпечення повноцінного сигналіngu повний *транс*-ізомер ретиноєвої кислоти через її канонічні рецептори як складова проліферативної регенеративної відповіді. Відсутність доступних ретиніл ефірів печінки унеможлиблює індукцію ретиноїд-респонсивних генів (*Crbp1*, *Pdk4*, *p21*, *Cyp26A1*) та регуляторів прогресії клітинного циклу (*Hgf*, *Tgfa*, циклінів *E1*, *A2*, *B1* та фактора *FoXM1*) і сповільнює регенерацію. Відновлення паренхіми печінки в умовах відсутності запасів ретиноїдів характеризується персистентним посиленням оксидативного пошкодження біополімерів клітинних компартментів та зниженою активністю ензимів I та II фаз детоксикаційної системи, що виражається у вірогідно високих рівнях ТБК-активних продуктів, протеїнових карбонілів і модифікованих тіолів та низьких показниках ензиматичного гідроксилування і глутатіонілювання ксенобіотиків. За тіоацетамідіндукованої гепатотоксичності показано, що ендogenно депоновані та аліментарні ретиніл-ефіри, як джерела метаболічно активних форм ретиноїдів у гепатоцитах, модулюють гідроксилазну активність цитохрому P450, оксигеназну активність флавінвмісних монооксигеназ та ксантиноксидазну активність печінки, опосередковуючи біоактивацію ксенобіотика, посилення генерування супероксиданіон-радикала та пов'язані з цим оксидативний стрес і гепатотоксичність. Тривале насичення організму пухлиноносія фармакологічними дозами вітаміну А (300 і 3000 МО) стимулює ріст карциноми Герена та карциноми Льюїс, а відсутність вітаміну А в організмі з пухлиною порівняно з онкогенезом у разі його нормальної забезпеченості, супроводжується посиленням пухлинної кахексії.

Метаболічна потреба в ретиноїдах, необхідних для праймування та прогресії повноцінної регенеративної відповіді, обґрунтовує впровадження режимів саплементації цими нутрієнтними факторами та їх каротиноїдними попередниками. При хімічно-індукованої гепатотоксичності та рості злоякісного новоутворення доцільним виявляється обмежене застосування аліментарних ретиноїдів аж до їх повної депривації.

БІОХІМІЯ ПОЧВЕРНОГО ЗВ'ЯЗКУ ТА НАНОТЕХНОЛОГІЇ У ЛІКУВАННІ РАКУ

¹ШТЕМЕНКО Н. І., ²ШТЕМЕНКО О. В.

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: n.shtemenko@i.ua;

²Український державний хіміко-технологічний університет, Дніпропетровськ

Представлено нову ефективну протипухлинну систему, яка включає кластерні сполуки ренію з почверним зв'язком та призводить не тільки до гальмування новоутворення, але й знижує токсичний ефект цисплатину. Показана антиоксидантна, антигемолітична, гепато- та нефростабілізуєча активність ренієвих сполук у моделях канцерогенезу, гемолітичних анемії та токсичного гепатиту. Розроблено методи виготовлення наноліпосом та твердих наночастинок, навантажених протипухлинною системою та її компонентами, що відкриває нові перспективи у боротьбі з раком і хворобами, що супроводжуються зміною редокс-статуту організму. Вивчено механізми взаємодії сполук ренію з ДНК, що дозволило віднести їх до проліків, які виявляють свої антипроліферативні властивості залежно від редокс-стану клітин-мішеней (prodrug strategy, [Graf, Lippard, 2013]).

Біядерні кластерні сполуки ренію – це речовини, що містять унікальній почверний зв'язок між двома атомами металу, який відсутній у біологічних молекулах. Він утворений однією σ -, двома π - та однією δ -молекулярними орбіталями і забезпечує стабільність ренію у ступені окислення +3. Біядерні кластерні сполуки ренію утворюють п'ять структурних типів, більшість з яких синтезовано вперше в світі [Shtemenko A. V., 1980–2013]. Ефективність протипухлинної дії сполук оцінювали шляхом вимірювання динаміки росту пухлини – карциноми Герена (Т8) та шляхом вимірювання маси вилученої пухлини. Сполуки ренію за окремого введення гальмували ріст пухлини на 30–60%. Знайдено синергізм (або адитивність) у дії цисплатину і сполук ренію, що дало змогу запропонувати нову протипухлинну систему реній–платина [Shtemenko N. I., 2007–2013]. Застосування цієї системи призводить практично до повного зникнення клітин імплантованої карциноми в піддослідних тварин. Сполуки ренію виявляють антигемолітичну активність. У моделі канцерогенезу та моделях гемолітичних анемії введення сполук ренію сприяють підвищенню кількості нормоцитів, гематокристу та зниженню кількості деструктурованих еритроцитів. Зроблено припущення, що сполуки ренію виявляють не тільки мембранотропну цитостабілізуючу активність щодо еритроцитів, а й позитивно впливають на еритронормобластичну функцію кісткового мозку, вірогідно, через підтримку синтезу еритропоєтину в нирках. Рівень діагностичних ензимів, концентрація продуктів перекисного окислення ліпідів, морфологія тканин печінки і нирок свідчать про те, що сполуки ренію здатні гальмувати процес пошкодження клітин та підтримувати функцію печінки і нирок в умовах оксидативного стресу та токсикозів різного походження. Розроблено методи приготування наноліпосом та наночастинок (≤ 100 нм) сполук ренію, що підвищує реакційну здатність почверного зв'язку. Нановезикули можуть мати змішаний склад – сполуки ренію та цисплатин у різних співвідношеннях, що є шляхом до виготовлення комбінованих нанопрепаратів згідно з персональними потребами, тобто індивідуальної медицини. Досліджено взаємодію цисплатину зі сполуками ренію всередині наноліпосом і показано активацію почверного зв'язку в нанокapsулах змішаного складу. Досліджено взаємодію сполук ренію з нуклеїновими кислотами різної будови та показаний механізм утворення аддуктів ренієва сполука – ДНК. Показана можливість утворення ковалентних зв'язків з аденіном та гуаніном, порушення вторинної структури полінуклеотидів, переважна взаємодія з аденінбагатими олігонуклеотидами та каталітична редоксзалежна нуклеазна активність.

СТЕНДОВІ ПОВІДОМЛЕННЯ

КОРИГУЮЧИЙ ЕФЕКТ МЕТФОРМІНУ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ ПЛОДОВОЇ МУШКИ ЗА СПОЖИВАННЯ КРОХМАЛЮ

АБРАТ О. Б.

ДВНЗ «Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника», Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: aolexandra@yandex.ru

В останні роки велику увагу дослідників і клініцистів привертає концепція «метаболічного синдрому», що об'єднує комплекс патологічних клінічних і лабораторних феноменів, які пов'язані з порушенням обміну вуглеводів в організмі (Haffner, 2006). Споживання вуглеводів у низьких дозах було запропоновано як можливе втручання, щоб зменшити ризик і ускладнення, пов'язані з метаболічними захворюваннями. Однак довготривале дієтичне обмеження сьогодні є недоцільним, оскільки більшість людей не бажають істотно обмежувати себе в споживанні їжі протягом тривалого часу. Тому актуальним стало питання використання фармакологічних препаратів, які могли б здійснити аналогічний діетам коригуючий вплив і поліпшити здоров'я та добробут людей. Одним із таких препаратів є метформін, який зараз широко використовують в медицині для лікування цукрового діабету II типу.

У дослідженнях використовували особин плодової мушки *Drosophila melanogaster* лінії w1118. Експериментальні середовища містили: постійні реагенти – 4% (маса/об'єм) дріжджів, 1% (маса/об'єм) агар-агару, 0,2% (об'єм/об'єм) метилпарабену; змінні компоненти – 0,25; 4 і 20% крохмалю, а також 0 і 0,1% метформіну. Культуру дрозофіл утримували у скляних банках, де кількість особин становила 100 ± 10 .

Споживання середовища, що містило 20% крохмалю (висококалорійна дієта), призводить до істотної затримки лялькування у плодової мушки порівняно з іншими концентраціями. На низькокалорійній дієті (0,25% крохмалю) швидкість розвитку мух достовірно не змінюється відносно інших доз. Вміст триацилгліцеролів (ТАГ) на низькокалорійній і висококалорійній дієті є відповідно нижче і вище від контрольного значення (4% крохмалю) як у самців, так і самок дорослих особин *D. melanogaster*. На вміст ТАГ також істотно впливає характер харчування мух на личинковій стадії. Вирощування личинок на низькокалорійній дієті, порівняно з контрольною характеризується нижчим вмістом ТАГ у дорослих мух, навіть за умов переведення імаго на висококалорійну їжу. Тоді як вміст нейтральних жирів у личинок, що розвивалися на 20%-му крохмалі, залишається високим навіть за умов наступного переведення дорослої мухи в умови нестачі поживних речовин.

Метформін практично не впливає на розвиток мух на 4%-му крохмалі, призводить до незначної затримки розвитку мух в умовах обмеження калорій та прискорює розвиток комах в умовах надмірної калорійності. При цьому за наявності метформіну вміст ТАГ в умовах висококалорійної дієти знижується як у самців, так і в самок плодової мушки. Однак незважаючи на позитивний вплив метформіну стосовно розвитку мух та вмісту в них запасних жирів, цей препарат зменшує тривалість життя особин *D. melanogaster*, які розвивалися на висококалорійній дієті. Це свідчить про неоднозначність у використанні речовин із ряду бігуанідів і перспективу наступних досліджень у цій галузі.

ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА НАТРИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МИТОХОНДРИЯХ

*АКОПОВА О. В., КОЛЧИНСКАЯ Л. И., НОСАРЬ В. И.,
МАНЬКОВСКАЯ И. Н., САГАЧ В. Ф.*

*Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев;
e-mail:luko@biph.kiev.ua*

Изучение механизмов, лежащих в основе биоэнергетических эффектов фармакологических активаторов K^+ -каналов требует сравнительной оценки влияния потенциалзависимого транспорта K^+ и других одновалентных катионов на митохондриальные функции. Целью данной работы было изучить влияние потенциалзависимого входа Na^+ на образование активных форм кислорода (АФК) в митохондриях мозга крыс. Образование АФК изучали с помощью флуоресцентного зонда дихлорофлуоресцеина. Параллельно регистрировали мембранный потенциал и скорость дыхания.

Показано, что в митохондриях мозга присутствует функционально активная система потенциалзависимого входа натрия. Повышение начальной скорости входа натрия с повышением концентрации Na^+ в среде приводит к повышению скорости дыхания в состоянии 4 и мембранной деполяризации пропорционально повышению скорости дыхания. В стационарных условиях окисления субстрата (сукцинат) скорость образования АФК (J_R) зависит от мембранного потенциала и снижается вследствие Na^+ -индуцированной деполяризации в диапазоне концентраций Na^+ 0–120 мМ. Показан вклад прямого и обратного транспорта электронов (RET) в образование АФК в митохондриях мозга. Повышение входа Na^+ с повышением концентрации катиона в среде приводит к элиминации RET и снижению продукции АФК, обусловленной прямым транспортом электронов. В отсутствие RET зависимость J_R от мембранного потенциала близка к зависимости, полученной при деполяризации, индуцированной валиномицином в K^+ -содержащей среде, что указывает на единый потенциалзависимый механизм регуляции АФК.

Сделан вывод, что потенциалзависимая модуляция транспорта электронов в редокс-цепи является основным фактором регуляции образования АФК в условиях потенциалзависимого входа Na^+ в митохондриях мозга.

БІОХІМІЧНІ ШЛЯХИ РЕАЛІЗАЦІЇ РАДІАЦІЙНОІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ

АНДРІЙЧУК Т. Р., РАКША Н. Г., ОСТАПЧЕНКО Л. І.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: tatosha62@mail.ru*

Деталізація молекулярних механізмів генетичнодетермінованої клітинної загибелі (апоптозу) залишається на сьогодні одним із пріоритетних напрямів досліджень не лише в галузі біології, а й сучасної медицини, оскільки порушення шляхів контролю ключових етапів апоптозу призводить до патологічних змін на рівні окремих органів і систем та, відповідно, є основою для розвитку низки захворювань (онкологічних, аутоімунних, нейродегенеративних та ін.). Дослідження біохімічних шляхів апоптозу у відповідь на дію променевого чинника проводили на моделі лімфоцитів тимуса та селезінки щурів за опромінення в дозі 1,0 Гр.

Реалізація клітинної загибелі перебігає із залученням низки протеїназ, які не лише виконують функцію месенджерних молекул, забезпечуючи проведення апоптотичного сигналу до відповідних клітинних компартментів, а й виступають безпосередніми ефекторами цього процесу, визначаючи основні морфологічні та біохімічні прояви апоптозу. Нашими експериментальними дослідженнями

показано зміну ензиматичної активності основних класів цистеїнових протеїназ – каспаз (-8, -9), калпаїнів та лізосомальних катепсінів на початкових етапах (30 хв та 3 год) розвитку радіаційно-обумовленої клітинної загибелі. Це вказує на комплексний характер індукції апоптозу в лімфоцитах тимуса і селезінки щурів, зокрема на участь рецепторзалежного, мітохондріального та лізосомально-опосередкованого сигнальних каскадів.

Дія іонізуючої радіації як безпосередньо через пошкодження структури нуклеопротеїнових комплексів (що підтверджується накопиченням одно- і дволанцюгових розривів у молекулі ДНК), так і за рахунок індукції дисбалансу між експресією низки анти- та проапоптотичних генів в бік активації останніх, призводить до активізації ядерного шляху клітинної загибелі. Встановлена в умовах нашого експерименту радіаційноіндукована активація транскрипційних факторів p53, NF-κB та AP-1 свідчить про залучення продуктів експресії відповідних респонсивних генів до координації апоптотичних сигнальних каскадів.

Додатковими факторами, що сприяють подальшій дестабілізації геному та зрештою призводять до фрагментації ДНК, є протеолітичне розщеплення каспазами низки критичних для підтримання структурно-функціональної здатності ДНК протеїнів та зниження репараційного потенціалу клітини, частково пов'язане з порушенням у функціонуванні ензиму полі (ADP-рибозо) полімерази (ПАРП). Певна різноспрямованість встановлених нами змін активності ПАРП може слугувати підтвердженням факту участі різних механізмів трансдукції апоптотичного сигналу в умовах нашої експериментальної моделі.

Не менш актуальним на сьогодні є пошук протипроменевих препаратів природного походження для корекції радіаційноіндукованих порушень метаболізму. Нами досліджено вплив природного метаболіту інозину (фармакологічний препарат рибоксин), введеного до опромінення тварин, на вищезазначені показники, і встановлено комплексний характер його дії за рахунок активного включення в клітинні обмінні процеси. Отже, одержані результати свідчать про можливість залучення компонентів складних багаторівневих біохімічних метаболічних мереж у процеси радіаційноіндукованого апоптозу.

ЗМІНИ КОНЦЕНТРАЦІЙ ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ ЖОВЧНИХ КИСЛОТ У ЖОВЧІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ СЕРОТОНІНУ

*АТАМНАХ САЛАХ, ЛЕВАДЯНСЬКА Ю. А., ВЕСЕЛЬСЬКИЙ С. П.,
РЕШЕТНИК Є. М., ЯНЧУК П. І.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології», Україна;
e-mail: salah.AThamnah@mail.ru*

Серотонін загальновідомий як нейротрансмітер, вазоактивна речовина та модулятор секреторних процесів вісцеральних органів, але його вплив на процеси формування і секреції компонентів жовчі печінкою залишається недостатньо вивченим. Дослідження регуляції секреторної функції печінки, передусім секреції гепатоцитами жовчних кислот, є вкрай актуальними, оскільки зміни їх вмісту в жовчі відображають функціональний стан гепато-біліарної системи і є основою для розробки адекватних стратегій її корекції за патології.

Метою роботи було виявити можливі ефекти серотоніну на жовчнокислотний склад жовчі щурів, визначивши в ній концентрації окремих фракцій холатів.

Для досягнення поставленої мети в жовчі щурів самців (200–270 г, $n = 14$) із канюльованою в гострих дослідах жовчною протокою методом тонкошарової хроматографії визначали концентрації 6 фракцій жовчних кислот: таурохолевої (ТХК), таурохенодезоксихолевої, тауродезоксихолевої (ТХДХК+ТДХК), глікохолевої (ГХК), глікохенодезоксихолевої і глікодезоксихолевої (ГХДХК+ГДХК), холевої (ХК), хенодезоксихолевої і дезоксихолевої (ХДХК+ДХК). Жовч збирали впродовж 3 годин

30-хвилинними пробами, вводючи після проби №1 (вихідний рівень секреції жовчі) серотонін (10 мкг/кг) внутрішньопортально. Далі збирали 5 проб жовчі, біохімічні показники яких порівнювали з вихідним рівнем. Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням пакета Statistica 7.0 (Stat Soft, США). Оскільки розподіл даних не був нормальним, результати подано у вигляді медіани та нижнього і верхнього кватилів (Me [Q25;Q75]).

Впродовж перших 30 хвилин після введення серотоніну спостерігалось максимальне вірогідне підвищення концентрацій 3 фракцій кон'югованих жовчних кислот: ТХДХК+ГДХК зросла на 11,9% (98,5 [89,4; 109,1], $P < 0,05$), ГХК – на 14,2% (159,1 [141,5; 168,6], $P < 0,05$), а ГХДХК+ГДХК – на 13,4% (26,3[22,7;34,4], $P < 0,05$) відносно вихідного рівня (88,0 [83,0; 93,9]; 139,3 [131,6; 152,3]; 23,2 [19,1; 32,6] відповідно). І лише концентрація ТХК була найвищою в пробі № 4 (191,0 [178,9; 221,6], $P < 0,05$). Водночас, виявлено поступове статистично значуще зниження концентрацій вільних жовчних кислот із мінімумами у пробах № 5 (16,8 [16,2; 19,8], $P < 0,05$) для ХК і № 4 (10,9 [9,2; 11,9], $P < 0,05$) для ДХК+ХДХК порівняно з вихідним рівнем (23,2 [20,9; 25,4] та 14,5 [12,6; 16,4] відповідно).

Згідно з одержаними результатами можна припустити, що підвищення концентрацій кон'югованих жовчних кислот у жовчі шурів за дії серотоніну обумовлене двома причинами. По-перше, зростанням активності ензимів кон'югації вільних холатів із таурином і гліцином. По-друге, підвищенням активності транспортних систем базолатеральної мембрани гепатоцитів і, відповідно, оптимізацією захоплення клітинами печінки вторинних жовчних кислот із крові. Пов'язане з цим зростання внутрішньоклітинної концентрації холатів за принципом зворотного зв'язку веде до пригнічення синтезу жовчних кислот *de novo*, що виражається в поступовому зменшенні концентрацій вільних жовчних кислот у пробах жовчі шурів. Слід відзначити також, що збільшення кількості кон'югованих жовчних кислот у жовчі під впливом серотоніну має сприяти як підтриманню її колоїдного стану, так і зменшенню літогенності, та може вказувати про опосередкований вплив цього автокоїда на дезінтоксикаційну функцію печінки.

POSSIBLE MECHANISMS OF CONCENTRATION-DEPENDENT EFFECTS OF *Rhodiola rosea* ON LONG-TERM SURVIVAL AND STRESS RESISTANCE OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

BAYLIAK M., HRYSHUK H., LUSHCHAK V.

*Vassyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine;
e-mail: bayliak@ukr.net*

Rhodiola rosea is a well-known plant with adaptogenic properties widely used in folk medicine in Asia and Europe, particularly in Western Ukraine. The extract from *R. rosea* rhizome was reported to have numerous health benefits in humans and animals, including adaptogenic, antioxidant, cardioprotective, anticancer and anti-aging activities. Despite documentation of a variety of beneficial effects, molecular mechanisms of *R. rosea* action are not clear yet.

In the present study, we estimated concentration-dependent effects of aqueous extracts from *R. rosea* rhizome on nonspecific stress resistance of “young” exponentially growing *S. cerevisiae* cells, which are somewhat relevant to proliferating cells of metazoas, and lifespan of “old” stationary yeast cultures, which are considered as a model of ageing of postmitotic somatic cells of higher eukaryotes.

Dried roots of *R. rosea*, collected at high altitudes in Ukrainian Carpathians, were used in this work. The aqueous extraction was performed on the boiled water-bath in the ratio of 1:20 (comminuted dried rhizome material: distilled water) for 30 min.

Concentration-dependent effects of aqueous extract from *R. rosea* root on long-term survival and stress resistance of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* were found. At low concentrations, *R. rosea* aqueous extract extended yeast chronological lifespan, enhanced oxidative stress resistance of stationary-phase cells and resistance to number stressors in exponentially growing cultures. At high concentrations, *R. rosea* extract

sensitized yeast cells to stresses and shortened yeast lifespan. These biphasic concentration-responses describe a common hormetic phenomenon characterized by a low-dose stimulation and a high-dose inhibition. Yeast pretreatment with low doses of *R. rosea* extract enhanced yeast survival and prevented protein oxidation under H₂O₂-induced oxidative stress. Positive effect of *R. rosea* extract on yeast survival under heat shock exposure was not accompanied with changes in antioxidant enzyme activities and levels of oxidized proteins. The deficiency in transcriptional regulators, Msn2/Msn4 and Yap1, abolished the positive effect of low doses of *R. rosea* extract on yeast viability under stress challenges. Potential involvement of Msn2/Msn4 and Yap1 regulatory proteins in realization of *R. rosea* beneficial effects is proposed.

НО-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОДЕСТРУКЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

БЕЛЕНИЧЕВ И. Ф., КУЧЕР Т. В.

*Запорожский государственный медицинский университет, Украина;
e-mail: kuchertv78@gmail.com*

Понимание механизмов гибели нейрона при хроническом алкогольном поражении ЦНС и их фармакологическая регуляция является одной из центральных проблем современной нейрофармакологии и в настоящее время интенсивно изучается во всем мире. Особое внимание в качестве факторов, запускающих программу нейроапоптоза, привлекает NO – одна из ключевых сигнальных молекул, регулирующих функции сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем организма.

Целью исследования явилось изучение роли нитроксидергической системы в механизмах алкогольной нейродеструкции.

Хроническую алкогольную интоксикацию вызывали у беспородных белых крыс-самцов массой 140–160 г ежедневным внутрижелудочным введением на протяжении 30 дней: первые 10 дней – 15%-й раствор этанола в дозе 4 г/кг, последующие 10 дней – 15%-й раствор этанола в дозе 6 г/кг и последние 10 дней крысам вводили 25%-й раствор этанола в дозе 4 г/кг.

С 30-ых суток прекращали алкоголизацию и на 45-е сутки эксперимента в тканях головного мозга определяли показатели тиолдисульфидной системы (окисленный и восстановленный глутатион, активность глутатионпероксидазы (ГПП), глутатионредуктазы (ГР), протеинассоциированные тиольные группы) и содержание нитротирозина.

Установлено, что у экспериментальных крыс нарушено равновесие тиол-дисульфидной системы на фоне увеличения окисленных эквивалентов, значительным угнетением активности ГР и ГПП в цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената головного мозга. Также в эти сроки в митохондриях и цитозольной фракции гомогената головного мозга регистрировали значительное повышение содержания нитротирозина – маркера нитрозирующего стресса. Регистрировали уменьшение плотности нейронов CA1 зоны гиппокампа. Отмечали снижение плотности eNOS-позитивных клеток и увеличение iNOS-позитивных клеток.

**ВЛИЯНИЕ СЕЛЕКТИВНОГО МОДУЛЯТОРА
Se-ЗАВИСИМОЙ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ
НИТРОЗИРУЮЩЕГО СТРЕССА И НЕЙРОАПОПТОЗА
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ НАРУШЕНИИ
КРОВООБРАЩЕНИЯ**

БЕЛЕНИЧЕВ И. Ф., ЛИТВИНЕНКО Е. С., ГОРБАЧЁВА С. В.

*Запорожский государственный медицинский университет, Украина;
e-mail: vitalena90@gmail.com*

В последнее время с появлением неоспоримых данных о роли глутатиона в механизмах возникновения эндогенной нейропротекции и нейропластичности, система глутатиона стала рассматриваться в качестве перспективного объекта фармакологического воздействия.

Целью исследования было изучение влияния модулятора Se-зависимой глутатионпероксидазы на показатели нитрозирующего стресса и нейроапоптоза в условиях острой церебральной ишемии.

Наши исследования, проведенные на монгольских песчанках – гербелах – с необратимой односторонней окклюзией общей сонной артерии, показали, что селективный модулятор Se-зависимой глутатионпероксидазы препарат «Селеназа» в дозе 50 мкг/кг снижает экспрессию iNOS и содержание маркера нитрозирующего стресса – нитротирозина – в нейронах CA₁ зоны гиппокампа и IV–V слоя сенсо-моторной коры. При введении селеназы уменьшается количество апоптотически и некротически измененных нейронов на 4-е сутки эксперимента; наблюдается повышение активности глутатионпероксидазы, увеличению уровня восстановленного глутатиона и снижению его окисленной формы в цитозольной и митохондриальной фракциях гомогената головного мозга. Под влиянием селеназы тормозится формирование митохондриальной дисфункции, о чем свидетельствует сохранение потенциала мембраны митохондрий и скорости открытия циклоспорин A-зависимой поры на фоне снижения концентрации нитротирозина в суспензии митохондрий.

Таким образом, позитивная модуляция Se-зависимой глутатионпероксидазы под действием селеназы в условиях острой церебральной ишемии приводит к торможению нитрозирующего стресса и NO-зависимых механизмов нейроапоптоза.

**β-ER-МОДУЛЯЦИЯ УРОВНЯ HSP₇₀ И НЕЙРОАПОПТОЗА
ПРИ ДЕПРИВАЦИИ СИСТЕМНОГО УРОВНЯ ВОССТАНОВЛЕННОГО
ГЛУТАТИОНА *IN VITRO***

БИЛА Ю. В., БЕЛЕНИЧЕВ И. Ф., МОРГУНЦОВА С. А.

*Запорожский государственный медицинский университет, Украина;
e-mail: bila.yulia@gmail.com*

В настоящее время ведущую роль в реализации молекулярных механизмов эндогенной нейропротекции отводят белкам теплового шока, в частности HSP₇₀. Однако механизмы регуляции экспрессии HSP₇₀ изучены слабо.

Имеются данные о влиянии эстрогенов на уровень HSP₇₀. Исходя из этого целью исследования явилось изучение влияния селективного модулятора β-эстрогеновых рецепторов (β-ER) тамоксифена на экспрессию HSP₇₀ и апоптоз нейронов коры крыс в условиях дефицита восстановленного глутатиона *in vitro*.

Нейроны коры выделяли экстенпорально из мозга двухнедельных белых беспородных крыс. Дефицит глутатиона вызывали введением в суспензию нейронов динитрохлорбензена (DNCB, 1 mM) и

D,L-бутионин-S,R-сульфоксима (BSO, 500 мкМ). Апоптотически измененные нейроны выявляли по окраске с этидиумом бромидом, экспрессию HSP₇₀ и p53 определяли методом иммуноблоттинга.

Тамоксифен вносили в суспензию нейронов в концентрации – 10⁻⁷ М. Вызванный дефицит восстановленного глутатиона снижает экспрессию HSP₇₀, повышает экспрессию p53 и увеличивает долю апоптотически измененных клеток. Предварительное внесение в инкубационные пробы тамоксифена приводит к повышению экспрессии HSP₇₀, снижению p53 и торможению нейроапоптоза.

Таким образом, тиолдисульфидная система регулирует уровень HSP₇₀, играющего важную роль в защите нейронов от оксидативного стресса. Активация β-ER под действием тамоксифена вызывает повышение уровня HSP₇₀ и торможение нейроапоптоза в условиях депривации восстановленного глутатиона *in vitro*.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИШЕМИИ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ

БОЖКОВА Ю. О., КИРОШКА В. В., ГАВАС А. А., ТРУТАЕВА И. А.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: tischenko.kh@gmail.com*

Ишемическое повреждение клеток и тканей характеризуется запуском анаэробного пути метаболизма, снижением уровня макроэргических соединений, нарушением энзиматической кинетики, вследствие чего происходит накопление продуктов пероксидного окисления. При этом интенсификация процессов пероксидного окисления липидов является результатом не только активации оксидантной системы, но и развивающейся в процессе ишемии недостаточности работы энзимов антиоксидантной защиты. Степень указанных выше повреждений в основном зависит от таких физико-химических факторов, как время ишемии и электролитный состав среды инкубации.

В связи с этим целью данной работы явилось исследование динамики образования продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), объемной и структурной трансформации овариальной ткани в зависимости от времени ишемии и электролитного состава среды инкубации. Для достижения поставленной цели ишемия моделировалась инкубацией фрагментов овариальной ткани в течение 2, 4 и 6 часов при +37 °С в средах различного электролитного состава: среда 1 (250 мМ манита, 10 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH = 7,4) и среда 2 (130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 20 мМ фосфатного буфера при pH = 7,4). Уровень ПОЛ определяли спектрофотометрически по интенсивности накопления малонового диальдегида. Динамику морфологической трансформации фолликулов анализировали микроскопически на полутонких срезах толщиной до 1 мкм. Для анализа обратимости ишемических повреждений овариальной ткани исследовали ее эндокринную функцию *in vivo* методом гетеротопической трансплантации под капсулу левой почки.

Показано, что образование продуктов ПОЛ во фрагментах овариальной ткани через 2 часа инкубации как в среде 1, так и 2 не имеет достоверных отличий относительно контроля. После 6-часовой инкубации в исследуемых группах отмечено увеличение концентрации ПОЛ в 2 раза. Изменения морфологии фолликулов наблюдаются на начальных этапах ишемического воздействия и зависят от электролитного состава среды инкубации. Так, после 2-часовой инкубации более выражено сжатие клеток и аккумуляция жидкости между структурными компонентами овариальной ткани в среде 1 по сравнению с таковыми трансформациями в среде 2. Однако в обоих случаях клетки гранулы сохраняют плотный контакт с ооцитом, что характеризует обратимость трансформации фолликулов. После 6 часов инкубации наблюдается дезинтеграция всех клеточных структур овариальной ткани. Обратимость указанных выше ишемических повреждений овариальной ткани установлена только после 2-часовой инкубации. В этом случае на 30-е сутки после трансплантации отмечается достоверное

повышение уровня половых гормонов у кастрированных животных-реципиентов относительно овариоэктомированных.

Таким образом, можно сделать вывод, что интенсивность образования продуктов ПОЛ во фрагментах овариальной ткани не зависит от состава среды инкубации при 37 °С, а характеризует динамику необратимых ишемических повреждений овариальной ткани во времени. При этом отсутствие достоверных изменений уровня ПОЛ в ишемизированной ткани является основным фактором, определяющим последующее восстановление эндокринной функции в условиях *in vivo*.

ГОРМЕТИЧНИЙ ЕФЕКТ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ ТА ПЕРЕХРЕСНІ АДАПТАЦІЇ У ДРІЖДЖІВ *Saccharomyces cerevisiae*

ВАСИЛЬКОВСЬКА Р. А., БУРДИЛЮК Н. І., СЕМЧИШИН Г. М.

*ДВНЗ «Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника», Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: vasytkovska_r@ukr.net*

Гормезис – явище підвищення життєвого потенціалу потенційно небезпечними зовнішніми чинниками, а саме хімічними речовинами, радіаційним випромінюванням тощо. Феномен гормезису є предметом активних досліджень і дискусій в галузі біохімії, медицини, токсикології та радіаційної біології. Характер впливу зовнішніх факторів на живий організм залежить не тільки від їх природи, а й від дози. Показано, що невисокі сублетальні дози можуть виявляти горметичний ефект, у той час як високі є шкідливими і навіть летальними. Наприклад, пероксид водню може мати подвійну дію. З одного боку, H_2O_2 пошкоджує біологічні структури, а з іншого – виступає сигнальною молекулою та регулятором багатьох фізіологічних процесів. Підвищення життєвого потенціалу внаслідок горметичної дії певних факторів може лежати в основі передадаптацій та перехресних адаптацій. Відомо, що помірний стрес призводить до появи толерантності клітин до наступного летального стресу. Це явище отримало назву «передадаптації» і виявлене в різних організмів: від бактерій до людини. Цікаво, що часто помірний стрес зумовлює стійкість не тільки до того самого стресового фактора, а й до інших чинників. Цей феномен, у свою чергу, отримав назву «перехресної адаптації». Зазначене вище свідчить про існування комплексного і тонкорегульованого механізму, який дозволяє організму адаптуватись до різних видів стресу. Проте молекулярно-біохімічні особливості цих явищ вивчені недостатньо.

У зв'язку з цим, метою роботи було дослідити вплив пероксиду водню в різних концентраціях на *S. cerevisiae* та його участь у передадаптаціях та перехресних адаптаціях дріжджів. Зокрема, в роботі визначали: 1) репродуктивну здатність, яку оцінювали за кількістю колонієутворюючих одиниць; 2) рівень карбонільних груп протеїнів – маркера оксидативного стресу; 3) активність каталази – ензиму, який знешкоджує H_2O_2 ; 4) виживання дріжджів в умовах передадаптації до високих концентрацій H_2O_2 та перехресної адаптації до гліюксалу і метилгліюксалу. У роботі використовували штам *S. cerevisiae* YPH250 (*MATa tpri1-Δ1, his3-Δ200, lys2-Δ1, ade2-101, ura3-52 leu2-Δ*), люб'язно наданий професором Yoshihagu Inoue (Київський університет, Японія).

Показано, що за дії пероксиду водню в невисоких концентраціях репродуктивна здатність клітин є вищою порівняно з контролем (без H_2O_2). Горметичний ефект H_2O_2 залежить від кількості клітин у суспензії, яку піддавали дії оксиданта. Так, здатність утворювати колонії зростає на 50% у присутності 0,15 мМ H_2O_2 (100×10^6 клітин/мл) та 0,05 мМ H_2O_2 (5×10^6 клітин/мл). Активність каталази зростає за дії 0,05 і 0,1 мМ H_2O_2 (у 2 рази вище від контролю). Подальше збільшення концентрації пероксиду водню призводить до зниження активності ензиму нижче контрольних значень. Водночас, рівень карбонільних груп протеїнів не змінюється за дії горметичних концентрацій H_2O_2 , але істотно зростає в умовах збільшення концентрації оксиданта. Виживання клітин дріжджів за перехресної адаптації та передадаптації підвищується у разі попередньої обробки їх 0,1 мМ H_2O_2 . Отже, пероксид водню

за дії низьких концентрацій стимулює життєвий потенціал дріжджів, активуючи їхні адаптаційні механізми та виявляє горметичний ефект.

THE BIOCHEMICAL RESPONSE ON DIFFERENT KIND OF STRESS LOAD

VATLITSOV D., RUSSETSKAYA N.

*P. L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine;
e-mail: denys.vatlitsov@gmail.com*

The response of organism on stress factors in nowadays more and more often are used as a model of dysfunction of regulation mechanisms.

The aim of the study was to investigate the lesions of different kind of stress on rat's blood parameters as indicators of homeostasis.

The study was performed on Wistar male rats ($n = 60$), weighing 200 ± 30 g. A sensory contact model was used. Every day animals pairwise were put in the dark with the immobilized partners. Additionally, immobilized rats had submerged in cold water tank ($t = +5$ °C), after that they were also immersed in hot water tank ($t = +42$ °C) (the 1st group). The 2nd group's animals were subjected to psycho-emotional stress only. The 3rd group's animals were subjected to immobilization and thermal stress only. The 4th group was control. The stress load is gradually increased throughout the study during 112 days.

Measuring the level of molecules of average mass (MAM) and thiobarbituric acid (TBA)-reactive substances were performed on the SF-46 (Russia).

Concentrations of glucose, high-density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), total cholesterol (TCh), triglyceroles (TG) were determined using automatic biochemical analyzer Labline-100 (West-Medika, Austria) applying reagents kits (Human, Germany).

Statistical processing was performed using the program Statistica 6.0, Student's *t*-test and descriptive statistics were used.

According to the results obtained after calculation of DI of MAM, as an indicator of endogenous intoxication, were shown a statistically significant ($P < 0.05$) decrease in DI in the first (1.059 ± 0.192 c.u.) and the second (1.093 ± 0.154 c.u.) groups after 112 days of experimental stress in relation to the zero control group (1.432 ± 0.312 c.u.) and the control the 4th group (1.332 ± 0.039 c.u.).

The investigation of the quantity of TBA-reactive substances demonstrated activation of antioxidant defense systems in the third group, TBA-active substances nearly doubled 0.764 ± 0.618 mmol/l in relation to the control group values ($P < 0.05$) 1.388 ± 0.187 mmol/l. While, in the other groups, a statistically significant ($P < 0.05$) increase in the quantity of TBA-reactive substances to 1.886 ± 0.517 mmol/l in the first group and 2.003 ± 0.455 mmol/L in the second group.

Studying the lipid profile and glucose after 112 days revealed that the statistically significant changes ($P < 0.05$) of the studied parameters were observed in the first group (the combined effect of psycho-emotional, immobilization and thermal load) HDL - 1.75 ± 0.12 mmol/l TG - 0.54 ± 0.25 mmol/l TCh - 1.13 ± 0.23 mmol/l in relation to the control (the 4th group) HDL - 1.89 ± 0.03 mmol/l; TG - 0.87 ± 0.32 mmol/l; TCh - 1.38 ± 0.12 mmol/l.

Results obtained in the other groups indicate that the psycho-emotional stress leads to activation cardioprotective systems that was shown in statistically significant ($P < 0.05$) decreased level of LDL to 0.31 ± 0.08 mmol/l and increased level of HDL cholesterol to 1.99 ± 0.49 mmol/l in relation to the control values (the 4th group) (LDL - 0.41 ± 0.07 mmol/l; HDL - 1.89 ± 0.03 mmol/l).

Also, it was shown a statistically significant ($P < 0.05$) increased level of the TG in the 4th group (0.87 ± 0.32 mmol/l), HDL - 1.89 ± 0.03 mmol/l and glucose - 4.93 ± 0.28 mmol/l in relation to zero control group level TG - 0.44 ± 0.20 mmol/l, HDL - 1.42 ± 0.40 mmol/l, glucose - 3.68 ± 0.95 mmol/l.

The results had shown activation of the various recovery systems that depend to the type of the stress, namely, the psycho-emotional stress had induced the activation of the cardioprotective systems, while the im-

mobilization stress in combination with thermal had induced an antioxidant systems, combined stress had led to the development of cardiovascular pathologies and had activated the different types of recovery systems that had led to more effective protection but with an early exhaustion that was displayed as the changed levels of biochemical parameters.

ІНТЕГРАТИВНІ ПОКАЗНИКИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ У БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ШТАМІВ ЕПІДЕРМАЛЬНОГО СТАФІЛОКОКА

ВОРОНКОВА О. С., СІДАШЕНКО О. І., СІРОКВАША О. А., ВІННИКОВ А. І.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: voronkova_olga@inbox.ru*

Останнім часом значно збільшилася кількість інфекційних захворювань та дисбактеріозів, що обумовлені бактеріями, здатними до утворення біоплівки. У складі такої структури мікроорганізми набувають ознак підвищеної резистентності до факторів впливу, наприклад, антибіотиків, що ускладнює лікування. У сенсі пошуку перспективних напрямів для терапії таких інфекцій актуальним стає пошук препаратів, здатних пригнічувати метаболічні процеси. На жаль, питання про зміни метаболізму під час формування біоплівки практично не вивчено. Якщо брати до уваги біотоп, який колонізують бактерії, то вирішальним фактором регулювання метаболізму стає доступний субстрат та метаболічні шляхи його використання.

Метою наших досліджень було визначення інтегративних показників катаболічного обміну, спряженого з акумуляцією енергії, активність яких надасть змогу оцінити спрямованість змін метаболізму у штамів епідермального стафілокока, що здатні до утворення біоплівки. Інтенсивність основних катаболічних процесів (пентозофосфатного шляху, гліколізу та циклу трикарбонових кислот) оцінювали за активністю ключових ензимів, утилізації субстратів та накопиченню кінцевих продуктів обміну та за чутливістю до дії специфічних інгібіторів.

Відомо, що у гетеротрофних бактерій існує різний ступінь спряженості катаболічних процесів, у ході яких відбувається утилізація органічних сполук із трансформацією енергії у конвертовані форми – енергію протонного електрохімічного потенціалу з наступним використанням її для синтезу АТФ. Внаслідок цього нами як критерії енергетичного обміну використовувалася також інтенсивність ендогенного дихання та інтенсивність дихання у разі використання низки субстратів. При цьому вимірювання швидкості окислювальних процесів здійснювали за допомогою електрода Кларка в модифікованій полярографічній комірці, поєднаній з комп'ютером.

Було встановлено, що комплексна оцінка інтенсивності катаболічних процесів найефективніша за вимірювання активності ключових ензимів і, насамперед, лактатдегідрогенази, показник активності для якої у межах від 200 до 240 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну, за значень для контрольної групи – від 80 до 100 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну, що склало 42,2% порівняно з активністю плівкоутворюючих штамів. Підтвердженням зростання інтенсивності катаболічних процесів є зростання швидкості ендогенного дихання та швидкості окислення глюкози. Швидкість поглинання кисню під час окислення глюкози плівкоутворюючими штамми знаходиться в межах від 500 до 540 нмоль O₂·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну, а для неутворюючих біоплівку – від 310 до 340 нмоль O₂·хв⁻¹·мг⁻¹ протеїну. Інтегративним показником трансформації енергії була генерація мембранного потенціалу, що зростає, як було показано за вимірювання поглинання проникаючих катіонів тетрафенілфосфонію (TPP⁺).

Отже, для дослідженої групи штамів основною тенденцією було зростання інтенсивності катаболічного обміну, пов'язаного із трансформацією енергії. У той же самий час є й штами, для яких незначне зростання катаболічної активності не пов'язано зі збільшенням активності трансформації енергії.

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ЦИСПЛАТИНУ ТА КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ НА СИСТЕМУ ЧЕРВОНОЇ КРОВІ ТА КІСТКОВИЙ МОЗОК ЩУРІВ-ПУХЛИНОНОСІЇВ

ВОРОНКОВА Ю. С., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: yuliya_v@inbox.ru*

У наших попередніх роботах було розроблено протипухлинну систему «Реній-Платина», застосування якої у тварин з пухлинним ростом призводило до ефективного гальмування розвитку карциноми Герена [Воронкова, 2012]. Було зафіксовано анемічний стан у тварин з пухлинним ростом та здатність сполук ренію до його нормалізації, механізм якої здебільше залишається невивченим.

Метою роботи було дослідження змін біохімічних характеристик еритроцитів та червоного ростка кісткового мозку щурів – моделі пухлинного росту за введення цисплатину та кластерних сполук ренію.

Роботу виконано на моделі пулинного росту – карциномі Герена. Введення цисплатину та кластерних сполук ренію в наноліпосомній формі різними способами проводили за [Shtemenko, 2007–2009]. Досліджували біохімічні, морфологічні параметри системи червоної крові та кісткового мозку за допомогою спектрофотометричних, морфоцитологічних методів виготовлення мазків крові, відбитків кісткового мозку та методів світлової мікроскопії.

Виявлено, що розвиток пухлини та введення цисплатину щурам-пухлиноносійм призводить до зниження рівня гематокриту (на 33–40%), збільшення рівня патологічних форм еритроцитів (в 2,44–5,04 раза) та зниженню загальної кількості еритроцитів (в 1,49–1,66 раза) відносно контрольної групи, що дозволило констатувати анемічний стан експериментальних тварин. Показано, що введення кластерних сполук ренію тетракарбоксилатного та *цис*-дикарбоксилатного типу сприяє підвищенню кількості еритроцитів (у середньому на 32%), зниженню патологічних форм еритроцитів (у середньому на 75%), нормалізації рівня гематокриту, підвищенню рівня гемоглобіну на 40–48% відносно групи щурів-пухлиноносійм, що свідчить про антианемічні властивості сполук ренію. Показано, що еритропоез у щурів із карциномою Герена носить нормобластичний характер, зафіксовано велику кількість мегакаріоцитів у вигляді великих клітин з поліморфним гіперсегментованим ядром та широкою зоною цитоплазми. За введення кластерних сполук ренію різними способами показано зниження кількості еритробластів (на 31–59%), підвищення кількості базофільних нормобластів (на 27–72%) відносно групи щурів-пухлиноносійм, на протипухлинній терапії, що може бути пов'язане з регуляцією біосинтезу еритропоетину сполуками ренію.

Отже, показано вплив цисплатину та кластерних сполук ренію на систему червоної крові та кістковий мозок щурів-пухлиноносійм. На підставі одержаних даних в експериментах *in vivo* на моделі пухлинного росту запропоновано можливий механізм впливу кластерних сполук ренію на процеси еритропоезу в кістковому мозку через регуляцію синтезу еритропоетину в нирках, що дає змогу пояснити антианемічні властивості цих сполук, виявлені в наших дослідженнях.

**MODULATION OF CHOLESTEROL LEVEL
AND GLUTAMATE TRANSPORT IN BRAIN NERVE
TERMINALS BY POLYMERS OF CYCLODEXTRINES**

*¹VORONOVA O., ¹BORYSOV A., ²RYABOV S.,
¹KRISANOVA N., ¹SIVKO R., ¹BORISOVA T.*

*¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

*²Institute of Macromolecular Chemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: olgavoronova-93@yandex.ru*

Recently, we demonstrated that a decrease in the level of membrane cholesterol may be used for neuroprotection under pathological conditions including stroke, cerebral hypoxia/ischemia, traumatic brain injury that were associated with an increase in glutamate uptake reversal. *Visa versa* in norm, a decrease in the concentration of membrane cholesterol may cause neurotoxic consequences resulted from the enhancement of the extracellular glutamate level because of a decrease in glutamate uptake. Also, novel acute effects of cholesterol acceptor methyl-beta-cyclodextrin (MCD) on glutamate transport in rat brain nerve terminals was demonstrated. However, these effects may be associated with ability of MCD to penetrate the plasma membrane of nerve terminals.

Methods: planar lipid bilayer technique, spectrofluorimetry, radiolabeled assay.

Several polymers of MCD was synthesized in Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine. Comparative analysis of the effects of MCD and MCD polymers on cholesterol level, as well as uptake and ambient level L-[¹⁴C]glutamate in nerve terminals and synaptic vesicle acidification was performed. It was shown that MCD polymers in comparison with single molecule of MCD are able to decrease uptake and increase the ambient level of L-[¹⁴C]glutamate in a narrow concentration range. Also, MCD polymers similarly with MCD molecule are able to dissipate the proton gradient of synaptic vesicles.

This data create background for usage of MCD polymers in nanoneurotechnology. Synthesized MCD polymers demonstrated similar effects with MCD monomer in modulation of transport of neurotransmitter and cholesterol level in nerve terminals underlying their high potential for usage in nanoneurotechnology.

**KINETICS OF THE DIRHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS
AND RHAMNOSYLTRANSFERASE 2 ACTIVITY IN THE PRESENCE
OF *Pseudomonas aeruginosa* SIGNAL QUINOLONE**

GALKIN M. B., MUKHLIS ABEDALABAS, FILIPOVA T. O.

*Odessa National Mechnikov University, Ukraine;
e-mail: volandaron@ukr.net*

Discovery of the *P. aeruginosa* ATCC 15692 dirhamnolipids biosynthesis and rhamnolipid transferase 2 activity in presence of *Pseudomonas aeruginosa* exogenous quorum sensing signal molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS).

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15692 were cultured on the Giss medium with 2% glucose at 37 °C 24 h. All discoveries were performed in «plancton-biofilm» system with using of the «Nunclon» 48-well plates. Dirhamnolipids separation conducted by TLC methods on Alugram Sil G/UV 254 TLC plates. Dirhamnolipids were eluted separately and its content was determined by orcinol test. Rhamnolipid transferase 2 (RhlC) activity was analysed in *P. aeruginosa* cell extracts using a rhamnolipid transferase assay specific for the addition of L-rhamnose to monorhamnolipid. 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon that was synthesizing in ONU Biotechnological scientific-educational center.

The study of kinetics of planktonic cells growth and dirhamnolipids biosynthesis of control cultures of *P. aeruginosa* show that dirhamnolipids appears in the culture medium in the late logarithmic growth phase – between 6 and 8 hour of cultivation. The synthesis of dirhamnolipids is activated from the early stationary phase and the content of the biosurfactants is increased fivefold up 10 to 24 hour – up 0.83 to 4.3 $\mu\text{g/ml}$. McKnight S. et al. have demonstrated that PQS production is also initiated in early stationary phase and production of rhamnolipids are reduced in PQS-deficient mutants. All these data suggest an important role of *P. aeruginosa* quinolone signal in the synthesis of biosurfactants.

Therefore, we studied the effect of exogenous PQS on the planktonic cells growth and dirhamnolipid biosynthesis. The data shows that addition of increasing concentrations of PQS did not affect the growth of *P. aeruginosa* PAO1. These results are consistent with data which showed that of exogenously added PQS at concentrations from 10 to 100 μM did not affect the growth of *P. aeruginosa* PAO1 *lecA::lux*. Addition of increasing concentrations of PQS were enhanced dirhamnolipids content in a concentration-dependent manner. The results show that the addition of PQS at concentration 80 μM had the greatest effect on the dirhamnolipids biosynthesis. After 10 h of growth, there is approximately 4.6 times more biosurfactant in cultures supplemented with PQS compared with the control. After 24 hours its level in culture medium was 20.68 $\mu\text{g/ml}$ in the presence of 80 μM PQS and 4.3 $\mu\text{g/ml}$ in its absence. In the presence of 60 μM PQS dirhamnolipids content was 11.6 $\mu\text{g/ml}$ – 2.7 times greater than the control but less than two from result obtained at adding of 80 μM PQS.

Further analysis was performed activity of rhamnosyltransferase 2 (RhlC), which catalyses the addition of dTDP-L-rhamnose to the monorhamnolipid-accepting molecule. The study was conducted via 8, 16 and 24 hours. The results indicate that the activity of RhlC increases in control cells 2.5 times during cultivation from 8 to 24 hours. This increase in activity was not associated with increased cell contents and due to enhanced expression of *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2. The additions of PQS at the time of inoculation are sufficient to induce RhlC activity during the transition to stationary phase. So, after eight hours in the presence of 40, 60 or 80 μM PQS rhamnosyltransferase 2 activity was higher at 40, 75 and 93%, respectively. After 24 hours this enzymatic activity was 1.6, 1.8 and 2.1 times higher as compared with the control.

АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМІВ У НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗАХ САМИЦЬ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ХЛОРИДУ КОБАЛЬТУ

ГАНУСОВА Г. В.

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: galinakharkov51@mail.ru*

Метали зі змінною валентністю значно поширені в навколишньому середовищі. Такий метал, як кобальт, є мікроелементом, він необхідний для нормальної життєдіяльності організму. Однак, потрапляючи в надмірній кількості в організм, цей метал спричинює утворення активних форм кисню (АФК), впливає на обмін тілових сполук, активність ензимів антиоксидантного захисту. Більшість робіт з вивчення молекулярних механізмів впливу іонів кобальту на організм було проведено на печінці та нирках самців тварин, однак статеві особливості впливу іонів кобальту на ендокринні тканини вивчено недостатньо.

Метою роботи було дослідити вплив хлориду кобальту на активність антиоксидантних ензимів у надниркових залозах щурів-самиць.

Об'єкт дослідження – самиці щурів лінії Wistar масою 180–220 г. Хлорид кобальту вводили підшкірно з розрахунку 3 мг/100 г маси; контрольним тваринам вводили 0,9% NaCl. Щурів декапітували через 2 і 24 години після введення солі металу під легким ефірним наркозом. Надниркові залози гомогенізували у 2,5 мл 0,1 М Na, К-фосфатного буфера рН = 7,4. Гомогенати тканини центрифугували при 10 000 г на центрифугі ЦЛР-1 протягом 30 хв для одержання постмітохондріальної фракції.

Активність антиоксидантних ензимів: супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (ГП), глутатіон-S-трансферази (ГТ) і глутатіонредуктази (ГР) визначали спектрофотометрично на СФ-46 у постмітохондріальній фракції надниркових залоз щурів. Вміст продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (532 нм); сульфгідрильних груп і відновленого глутатіону (412 нм) визначали спектрофотометрично, а концентрацію протеїну – методом Лоурі в модифікації Міллера. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи *t*-критерій Стьюдента.

Було показано, що через 2 год після введення хлориду кобальту відбувається значне підвищення концентрації продуктів, які реагують із тіобарбітуровою кислотою (143% від контролю), що свідчить про розвиток оксидативного стресу в надниркових залозах щурів.

Згідно з одержаними результатами виявлено тенденцію до підвищення активності СОД (24 години); активність каталази підвищується через 2 і 24 год (137 та 124% від контролю відповідно). Вивчення ензимів, що беруть участь в обміні глутатіону, показало підвищення активності ГП через 2 год (147% від контролю), тенденцію до підвищення активності ГТ та ГР через 2 і 24 год після введення хлориду кобальту в надниркових залозах щурів. Ці дані свідчать про мобілізацію ензимів антиоксидантного захисту у відповідь на утворення АФК у першу добу дії хлориду кобальту.

Після введення щурам хлориду кобальту змін у концентрації загального протеїну в надниркових залозах не виявлено, однак вміст сульфгідрильних груп і відновленого глутатіону підвищується через 2 год (143 та 217% від контролю відповідно) та повертається до рівня контролю через 24 год після введення їм хлориду кобальту. Підвищення вмісту відновленого глутатіону в надниркових залозах може бути пов'язано як з активацією синтезу цієї тіолової сполуки, так і з функціонуванням глутатіонзалежних ензимів.

Таким чином, активація деяких ензимів антиоксидантного захисту, підвищення вмісту відновленого глутатіону в надниркових залозах щурів, ймовірно, є адаптивною реакцією організму в умовах одноразового введення хлориду кобальту.

ВПЛИВ ІНГІБИТОРУ ПРОТЕЇНкіНАЗ ПОХІДНОГО МАЛЕЇМІДУ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ ТА КЛІТИННИЙ ЦИКЛ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН ЛІНІЇ U-937

¹ГАРМАНЧУК Л. В., ¹БЄЛІНСЬКА І. В., ¹АНДРУЩЕНКО О. О.,
^{1,2}НІКУЛІНА В. В., ²ХРАНОВСЬКА Н. М., ¹РИБАЛЬЧЕНКО В. К.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Національний інститут раку, Київ, Україна;

e-mail: byelinska@univ.kiev.ua

Похідне малеїмиду (МІ-1, 1 (4 СІ бензил)-3-СІ-4-(СF3-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон) синтезовано *in silico* хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка як конкурентний інгібітор АТР-зв'язуючого сайту низки протеїнкіназ: FGF-R1, YES, EGF-R(h), VEGF-R1,2,3, Src (h), ZAP70, Syk(h), PDK1 та ін. Оскільки зазначені протеїнкінази задіяні в передачі сигналу в клітину від ростових факторів, метою дослідження було вивчення впливу МІ-1 на проліферативну активність гемопоетичних клітин лінії U-937.

Клітини лінії U-937 інкубували в 96-лункових планшетах в середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% телячої ембріональної сироватки, 2 мМ глутаміна (всі компоненти Sigma, США), 40 мкг/мл гентаміцину (Біофарма, Україна) протягом 24 год у присутності різних концентрацій МІ-1. Проліферативну активність оцінювали за допомогою МТТ-тесту. Вплив МІ-1 на розподіл клітин за фазами клітинного циклу досліджували на проточному цитофлюориметрі «Becton Dickinson» (США) з аргонним лазером (λ збудження 488 нм, λ емісії 585/40 нм) після фарбування флюорохромним барвником пропідієм йодидом. Проби аналізували за допомогою програмного забезпечення Mod Fit

LT 3.0 (BDIS, США). Обчислювали середні значення і стандартне відхилення в програмі SPSS 16.0 для Windows. Різницю між досліджуваними показниками вважали вірогідною при $P < 0,025$ за результатами t -критерія Стьюдента.

MI-1 дозозалежно зменшує проліферативну активність клітин у культурі. Так, після 24 годин впливу MI-1 в концентрації 0,008 мМ проліферативна активність клітин зменшується на 21% порівняно з контролем. Збільшення концентрації MI-1 вдвічі до 0,016 мМ призводить до зменшення проліферативної активності майже на 50% ($P < 0,025$). Це обумовлено зростанням в 1,6 раза клітин у фазі проліферативного спокою G_0/G_1 , відповідно проліферативний пул (у фазах $G_2/M+S$) зменшується.

Таким чином, встановлено, що похідне малеїмиду MI-1 пригнічує проліферацію гемопоетичної лінії клітин U-937 за рахунок переключення клітин із проліферативного пулу $G_2/M+S$ до пулу проліферативного спокою G_0/G_1 .

ВПЛИВ ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ *G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* ТА *RPIA* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ІЗ ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ ERN1, ОСНОВНОГО СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ СТРЕСУ ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА

ГАРМАШ Я. А., ХАРЬКОВА А. П., МІНЧЕНКО О. Г.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
email: iana.garmash@gmail.com*

Ендоплазматичний ретикулум є важливою органелою клітини, в якій відбувається згортання та збірка протеїнів, депонується вільний кальцій. Цей компартмент забезпечує високоякісний контроль за фолдингом протеїнів, тому лише правильно згорнуті протеїни можуть бути транспортовані за межі ретикулума, тоді як незгорнуті та невірно згорнуті залишаються в ендоплазматичному ретикулумі і деградують. За гіпоксії, нестачі поживних речовин, амінокислот та інших чинників в люмені ендоплазматичного ретикулума відбувається накопичення незгорнутих та неправильно згорнутих протеїнів. Це призводить до стресу ендоплазматичного ретикулума – адаптивної реакції виживання клітини, що являє собою комплекс внутрішньоклітинних сигнальних перетворень і реалізується через високоспецифічну систему сенсорно-сигнальних мереж. Ця клітинна відповідь опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, серед яких ключовою є система ензиму ERN1 (endoplasmic reticulum – nuclei-1; від ендоплазматичного ретикулума до ядра-1). Пентозофосфатний шунт відіграє важливу роль у катаболізмі глюкози, потрібний для одержання відновних еквівалентів NADPH, що використовуються в процесах біосинтезу багатьох речовин, зокрема жирних кислот та холестеролу, а також рибозо-5-фосфату, який є важливим для синтезу пуринів і нуклеїнових кислот. Активація цього шляху призводить до патологічної проліферації клітин та росту пухлин.

Метою роботи було вивчення експресії генів, що кодують ензими пентозофосфатного шляху (*G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* та *RPIA*) в клітинах гліоми лінії U87 та її сублінії із пригніченою функцією сенсорно-сигнального ензиму ERN1, а також в умовах нестачі глюкози.

Встановлено, що рівень експресії генів *TALDO1* (transaldolase 1) та *PGLS* (6-phosphogluconolactonase) в клітинах гліоми істотно знижується за пригнічення функції сигнального ензиму ERN1, в той час як рівень експресії інших генів пентозо-фосфатного циклу при цьому істотно не змінюється. Також показано, що рівень експресії генів *G6PD* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *TKT* (transketolase) та *PGLS* підвищується у клітинах гліоми за дефіциту глюкози, причому виявлені зміни в експресії цих генів переважно залежать від функції сигнального ензиму ERN1. Встановлено, що рівень експресії гена *TALDO1*, ключового гена пентозо-фосфатного циклу, істотно не змінюється в умовах дефіциту глюкози в середовищі в обох типах клітин гліоми, а гена *RPIA* (ribose 6-phosphate isomerase A) – знижується, але лише в контрольних клітинах гліоми.

Таким чином, результати цієї роботи вказують на те, що в клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 знижується рівень експресії лише двох із п'яти досліджених генів пентозо-фосфатного циклу і що за дефіциту глюкози в середовищі вирощування клітин гліоми по-різному змінюється рівень експресії більшості досліджених генів. Ці зміни залежать від опосередкованого сигнальною системою ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулула.

ЕКСПРЕСІЯ ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ГЕНІВ У ПУХЛИНАХ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

*¹ГІЛЬФАНОВ А. Р., ¹КАРБОВСЬКИЙ Л. Л., ЛИТВИНЕНКО О. О.,
²БУГАЙЦОВ С. Г., ПОЛІЩУК В. В., ¹МІНЧЕНКО Д. О.*

*¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
²ДУ «Національний науковий центр радіаційної
медицини НАМН України», Київ;
e-mail: gilfanov1984@mail.ru*

Молекулярні основи росту злоякісних пухлин грудної залози досліджуються досить інтенсивно в різних країнах світу, оскільки частота їх виникнення посідає одне з перших місць у структурі онкологічних патологій в жінок. Дотепер виявлено велику кількість молекулярних маркерів, які відіграють важливу роль у рості злоякісних пухлин грудної залози і які враховуються у разі визначення тактики лікування хворих. Метою цієї роботи було вивчення експресії генів, що відіграють важливу роль у регуляції процесів проліферації клітин, у злоякісних пухлинах грудної залози залежно від стадії росту та ступеня диференціювання пухлин, а також їхніх клініко-морфологічних особливостей, оскільки вивчення молекулярно-генетичних механізмів росту злоякісних пухлин грудної залози в організмі жінки можуть сприяти розробці нових ефективніших методів лікування та профілактики цього небезпечного захворювання.

Для проведення досліджень брали частину тканини злоякісних пухлин та біля пухлинної тканини в жінок після операції на інвазивну протокову карциному з дотриманням усіх вимог конфіденційності. Пухлини грудної залози було розділено на дві групи за ступенем диференціювання клітин (G2 та G3). У пухлинах визначали імуно-гістохімічним методом рівень рецепторів естрогенів та прогестерону, а також епітеліального фактора росту Her2/neu і фактора проліферації Ki-67, а методом кількісної полімеразної реакції – експресію генів тканинного інгібітору металопротеїназ-1 та -2 (*TIMP1* та *TIMP2*) і гена кластеріну (*CLU*).

Встановлено, що в тканині злоякісних пухлин грудної залози групи G2 виражено збільшується (у 2,6 раза) рівень експресії гена тканинного інгібітору металопротеїназ-1 порівняно з контролем (умовно нормальною тканиною навколо пухлини). В той самий час, експресія гена тканинного інгібітору металопротеїназ-2 посилюється значно меншою мірою (лише на 23%) в цих пухлинах грудної залози порівняно з контролем. При цьому рівень експресії іншого гена, кластеріну, істотно не змінюється в тканині пухлин грудної залози групи G2. У менш диференційованих злоякісних пухлинах грудної залози (група G3) рівень експресії цих генів змінюється по-іншому: *TIMP2* – істотно не змінюється, *TIMP1* – знижується майже вдвічі, а гена *CLU* – збільшується більше ніж у 50 разів. Слід відмітити, що протеїнові продукти генів *TIMP1*, *TIMP2* та *CLU* є поліфункціональними і відіграють важливу роль у регуляції низки важливих метаболічних процесів як в нормі, так і за патологічних процесів, у тому числі і за злоякісного росту. Тканинні інгібітори металопротеїназ контролюють переважно процеси проліферації та ангиогенезу, а кластерін – виживання пухлинних клітин.

Таким чином, у тканині злоякісних пухлин грудної залози істотно змінюється рівень експресії генів *TIMP1*, *TIMP2* та *CLU* порівняно з умовно нормальною тканиною біля пухлини, причому величина і спрямованість цих змін залежать від ступеня диференціювання клітин пухлини.

СТІЙКИЙ ВПЛИВ ПЕРІОДИЧНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА РІВЕНЬ ТРАНСТИРЕТИНУ В СИРОВАТЦІ ЩУРІВ

ГРИЧ М. С., КУРГУЗОВА Н. І., МАЛИШЕВ А. Б.

*НДІ біології, Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: girichms@gmail.com*

Останнім часом у низці робіт було показано, що так зване періодичне голодування (ПГ), дієтичне обмеження при якому 24 год голодування чергується з 24-годинним періодом вільного доступу до їжі, призводить до ефектів, подібних класичному калорійному обмеженню (КО). Тобто як і в разі КО, ПГ може сприяти збільшенню середньої та максимальної тривалості життя та бути потужним засобом профілактики і терапії раку, низки залежних від віку і хронічних захворювань. Одним із кращих джерел біомаркерів таких змін є протеом сироватки крові, де транстиретин (ТТР) займає особливе місце через його здатність реагувати на малі зміни притоку харчових речовин та зв'язок із великою кількістю залежних від віку патологій. Таким чином, метою нашого дослідження було вивчення впливу ПГ на вміст ТТР у сироватці крові, а також стійкості такого впливу після припинення дієтичного обмеження. Для цього, як молоді (3 міс.) так і старі (19 міс.) щури лінії Вістар підлягали 14-добовому режиму ПГ. Другу частину нашої роботи було присвячено дослідженню тривалості дії ефектів такого ПГ. З цією метою, за періодом ПГ йшов рівний йому період годування *ad libitum* (AL). Вміст протеїну визначався за допомогою методу градієнтного SDS-PAGE. Кількість щурів кожної експериментальної групи дорівнювала 10. Після періоду ПГ рівень ТТР у сироватці молодих тварин знижується приблизно вдвічі ($50 \pm 15\%$), а після тривалого відкорму *ad libitum* залишається приблизно на тому самому зниженому рівні ($50 \pm 13\%$). Режим ПГ у старих щурів, навпаки, призводить до $28 \pm 11\%$ підвищення рівня ТТР у сироватці, тоді як після AL відкорму цей показник залишається вище ніж у контролі (на $15 \pm 13\%$). Ці дані можуть мати важливе значення для розуміння механізмів, які відповідають за сприятливі ефекти цієї моделі дієт, а також можуть бути використані в розробці методів профілактики та терапії низки хронічних та залежних від віку захворювань. Таким чином, стрибок вмісту ТТР крові внаслідок ПГ та підвищений рівень цього протеїну після тривалого періоду відкорму, хоча і пов'язаний з підвищеним ризиком розвитку резистентності до інсуліну, серцево-судинних захворювань та амілоїдозів, проте, не зважаючи на це, може представляти інтерес в області терапії нейродегенеративних захворювань. З іншого боку, якщо ефект різкого зниження рівня ТТР після режиму ПГ в молодих щурів буде аналогічним такому в організмі людини, буде можливим створення ефективної терапії спадкових ТТР-амілоїдозів та хвороб, пов'язаних з резистентністю до інсуліну.

СИГНАЛЬНИЙ ШЛЯХ TOR ЯК РЕГУЛЯТОР БІОХІМІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ СТІЙКОСТІ ДРІЖДЖІВ *Saccharomyces cerevisiae* ДО КАРБОНІЛЬНОГО/ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

ГОМЗА Б. В., СЕМЧИШИН Г. М.

*Прикарпатський національний університет,
імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: b.homza@ukr.net*

В останні десятиліття дослідники наголошують про потенційну небезпеку тривалого споживання фруктози, яке може призводити до розвитку метаболічних порушень, механізми розвитку яких вивчено недостатньо. Проте більшість дієтологів переконані, що фруктоза є безпечнішою і кориснішою, ніж глюкоза, тому часто пропонують її як замітник глюкози, а отже споживання харчової фруктози значно зростає. В зв'язку з цим, ми обрали за мету на першому етапі роботи порівняти вплив глюкози та фруктози високих концентрацій на дріжджі *S. cerevisiae*.

Було показано, що виживання дріжджів є нижчим за дії фруктози порівняно із клітинами, які інкубували із глюкозою. Крім того, дріжджі в присутності фруктози демонстрували вищий вміст глікозилізованих протеїнів та вищу активність гліоксалаз 1 та 2, основних ензимів захисту від карбонільного стресу. Одержані результати та наші попередні дані вказують на вищу інтенсивність карбонільного/оксидативного стресу в клітинах, інкубованих у присутності фруктози.

Карбонільний/оксидативний стрес – це стан, що виникає внаслідок збільшення концентрації активних карбонільних сполук та активних форм кисню. Небезпека цих сполук полягає в їхній здатності брати участь у неензиматичних перетвореннях, які майже не контролюються клітинами. До таких процесів належать вільнорадикальне окислення і неензиматичне глікозилювання (глікація). Сигнальний шлях TOR (target of rapamycin) є висококонсервативним регулятором багатьох функцій, зокрема інтенсивності метаболізму та стійкості до стресу, у різноманітних організмів: від дріжджів до людини. Взаємозв'язок TOR із вуглеводами досліджений мало, тому на наступному етапі роботи визначали вміст карбонільних і α -дикарбонільних сполук, маркерів оксидативного та карбонільного стресів, у дефектних за різними ділянками TOR-сигнального шляху штамів *S. cerevisiae*.

Показано, що у присутності фруктози клітини демонструють вищий вміст карбонільних груп та α -дикарбонільних сполук. Крім того, зазначені вище параметри є вірогідно нижчі у штамів, дефектних за різними ділянками TOR-сигнального шляху порівняно з диким штамом. Отже, ріст на фруктозі призводить до розвитку карбонільного/оксидативного стресу, і, як наслідок, пришвидшує старіння дріжджів. Проте дефекти у TOR-сигнальному шляху сповільнюють старіння *S. cerevisiae*.

Порівнюючи особливості впливу пероксиду водню та агентів глікації – гліоксалу і метилгліоксалу на дріжджі *S. cerevisiae*, клітини яких вирощували в присутності глюкози та фруктози, було показано, що токсиканти виявляють горметичний ефект. Причому наявність цього ефекту є специфічною для кожного штаму та залежить від типу вуглеводу в середовищі культивування. Зокрема, за росту дефектних за різними ділянками сигнального шляху TOR-штамів у присутності фруктози в більшості випадків горметичного ефекту не виявлено. Таким чином, шлях TOR залучений в горметичний ефект, спричинений досліджуваними токсикантами.

МОДУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО АТР-ЗАЛЕЖНОГО КАЛІЄВОГО КАНАЛУ УРИДИНОМ ВПЛИВАЄ НА ВИТРИВАЛІСТЬ ЩУРІВ ДО ДІЇ НАДЗВИЧАЙНОГО ПОДРАЗНИКА

*ГОНЧАР О. О., НОСАР В. І., БРАТУСЬ Л. Б., ФРАНЦУЗОВА С. Б.,
ГАВЕНАУСКАС Б. Л., МАНЬКОВСЬКА І. М.*

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: ogonchar@yandex.ru*

Відомо, що мітохондріальні АТР-залежні калієві канали беруть безпосередню участь у формуванні процесів адаптації до дії надзвичайних подразників, у тому числі й до гіпоксії. Вважається, що активація K^+ -циклу мітохондрій (Mx) є основою відомих цитопротекторних ефектів фармакологічних активаторів K^+ _{АТР}-каналу, подібних до ефектів ішемічної адаптації (preconditioning). Однак, незважаючи на факт участі калієвого каналу в захисті серця від гіпоксичних пошкоджень, механізм позитивного впливу активаторів каналу за формування компенсаторно-приспосувальних реакцій залишається остаточно невідомим. Метою роботи було виявити здатність уридину впливати на роботу калієвого каналу, а також на витривалість організму до фізичних навантажень (щури плавали з вантажем, який становив 20% від маси тіла, у воді при 32 °С до знемоги). Уридин – метаболічний попередник природного активатора міто K^+ _{АТР}-каналу – уридиндифосфату; низькотоксичний та здатен, на відміну від уридиндифосфату, легко проникати крізь біологічні мембрани. Відомо, що існує істотна відмінність функціонування мітохондріальної системи транспорту калія в щурів із різною стійкістю до гіпоксії,

тому в наших експериментах тварин заздалегідь розділили на 2 групи: високо- та низьковитривалі до фізичного навантаження. Транспорт K^+ визначали методом спектрофотометрії за величинами набухання Мх печінки. АТР-залежний вихід K^+ із Мх (індукований роз'єднувачем 50 мкМ 2,4-ДНФ), а також кількість K^+ в Мх (після додавання 0,05% Тритона X-100) реєстрували за допомогою K^+ -селективного електрода. Встановлено, що уридин впливає на швидкість транспорту K^+ в Мх щурів. Так, введення уридину (в/ч, 30 мг/кг) низьковитривалим тваринам у стані спокою призводить до зростання входу K^+ в Мх, а також 2,4-ДНФ індукованого АТР-залежного виходу K^+ із Мх, на відміну від високовитривалих тварин ($P < 0,05$). Кількість K^+ , виявлена у низьковитривалих тварин, утримується на рівні контролю. Вищезазначені ефекти зберігаються в Мх щурів більше доби. Введення уридину низьковитривалим тваринам за 60 хв до плавання призводить до зростання витривалості до дії надзвичайного подразника майже вдвічі ($P < 0,05$), в той час як у високовитривалих тварин тривалість плавання знижується на 45% ($P < 0,05$). Аналогічні дослідження на фоні введення селективного блокатора калієвих каналів 5-hydroxydecanoate (5 мг/кг) показали, що інгібітор анулює ефекти уридину. Ці дані свідчать, що витривалість до фізичних навантажень у щурів опосередкована активністю міто $K^+_{\text{АТР}}$ -каналів і до цих процесів найчутливіші низьковитривалі тварини. Таким чином: 1) уридин модулює активність мітохондріальних АТР-залежних калієвих каналів за спокою та формування адаптаційних реакцій, і ця активність відрізняється у низько- та високовитривалих тварин; 2) активність міто $K^+_{\text{АТР}}$ -каналів позитивно корелює зі здатністю тварин витримувати фізичні навантаження.

ДИНАМИКА МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СДВИГОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НАРАСТАЮЩЕЙ НАГРУЗКИ ХЛОРИДОМ МАРГАНЦА

ГОНЧАРЕНКО М. С., ГОНЧАРЕНКО А. В., КОНОВАЛОВА Е. О.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: olena.oleg.kon@Gmail.com*

В ряде регионов с превышающим нормы содержанием марганца в воде, почвах и продуктах питания наблюдается повышенное содержание данного микроэлемента в организме людей, что сопровождается рядом заболеваний, характеризующихся как марганцевый гипермикроэлементоз (данные Агаджаняна Н. А., Скального А. В., Гончаренко М. С. и других авторов). В связи с недостаточной изученностью биохимических механизмов развития марганцевого гиперэлементоза, в первую очередь динамики изменения минерального обмена, было проведено модельное изучение влияния ступенчатых токсических нагрузок хлоридом марганца (дозы введения – 25, 30 и 50 мкг/кг массы тела внутримышечно в течение 7 дней) на концентрации Са, Mg, Zn, Cu и Mn в печени, почках, мышцах, бедренной кости, сердце и селезенке белых крыс линии Вистар. Минеральный состав проб органов и тканей крыс после проведенной пробоподготовки определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрофотометре С-115 М1. Сравнение контрольных и опытных групп выявило, что гиперэлементоз марганца вызывает достоверное перераспределение макро- и микроэлементов в органах и тканях животных и изменение их суммарного элементного содержания. При этом доза 25 мкг/кг вызывает увеличение суммарного содержания элементов и их перераспределение, что можно интерпретировать как защитную приспособительную реакцию на сохранение ионного гомеостаза. По-видимому, адаптивные метаболические реакции в ответ на нагрузку $MnCl_2$ в дозе 25 мкг/кг сопровождаются различным уровнем изменения транспорта разных элементов в изучаемые ткани, что приводит к изменению их функциональной активности и увеличению общего суммарного элементного содержания.

Следующая стадия (нагрузка $MnCl_2$ в дозе 30 мкг/кг) является началом срыва ионного гомеостаза организма, так как уже наблюдается уменьшение суммарного элементного состава в печени и мышцах и увеличение в почках, что отражает попытки вывести из организма излишки токсиканта. Если при нагрузке в 25 мкг/кг наблюдается увеличение концентрации Zn, как реакция организма на активацию

системы синтеза протеинов металлотеонеинов, связывающих излишки введенного марганца, то при нагрузке в 30 мкг/кг $MnCl_2$ этот процесс блокируется (содержание Zn уменьшается, что, возможно, обусловлено дефицитом энергии за счет снижения энергетической функции митохондрий, обусловленного заменой Mg на Mn в энзимах дыхательной цепи).

Третья стадия развивается при нагрузке $MnCl_2$ в дозе 50 мкг/кг. В этом случае во всех исследуемых органах наблюдается достоверное снижение суммарного содержания элементов при значительном уменьшении количества магния, цинка, меди на фоне достоверного увеличения концентрации марганца. Процесс сопровождается снижением веса, нарушением функциональной активности различных органов (так, изменяется энзиматическая активность аминотрансфераз).

Возможно, выявленная динамика изменений минерального обмена объясняется ранее установленными авторами биохимическими механизмами влияния повышенного содержания марганца на функциональные свойства исследуемых тканей, которые обусловлены антагонистическими свойствами данного микроэлемента по отношению к Mg, Zn и Cu и выражаются в нарушении барьерно-транспортных свойств клеточных мембран и снижении энергетической эффективности работы дыхательной цепи митохондрий, направленность динамики выявленных изменений определяется величиной вводимой дозы марганца.

OXIDATIVE MODIFICATIONS, PROMOTED BY HIGH CARBOHYDRATE DIET, DO NOT ACCELERATE AGING IN FRUIT FLY

*GOSPODARYOV D. V., YURKEVYCH I. S., ROVENKO B. M.,
LUSHCHAK O. V., LUSHCHAK V. I.*

*Vassyl Stefanyk Precarpathian National University, Ivano-Frankivsk, Ukraine;
e-mail: gospodaryov@rambler.ru*

Several studies show that number of oxidatively modified molecules increases with age of organism while over-expression of antioxidant or related enzymes during lifetime extends lifespan in fruit fly and other model organisms. However, some data suggest no association between antioxidant defence, oxidative damage and ageing. Thus, the question on the role of oxidative modification in ageing is still debated. This study aimed to define a role of oxidative modifications as a cause or consequence of ageing. The main concern was to determine how carbohydrate diet might influence the level of oxidative modification, how it was changed during aging, and whether an organism, having higher content of oxidatively modified molecules, aged faster.

In the present study, *Drosophila melanogaster* larvae were grown on yeast-molasses-agar medium. Lifespan of adult flies was measured on food which contained 0.25% yeast extract and either glucose or fructose in concentrations of 0.5, 2, and 10%. Content of protein carbonyl and thiol groups, level of lipid peroxides (LOOH) as well as activities of glutathione S-transferase, thioredoxin reductase and superoxide dismutase (SOD) in 'young' (10 day-old) and 'aged' (50 day-old) female flies were estimated.

The flies living on 2% carbohydrates had approximately 21-22% shorter maximum lifespan and increased age-dependent mortality than those fed 10% carbohydrates. Carbohydrate type did not affect lifespan significantly on diets with 2 and 10% carbohydrates. The shortest lifespans, around 40-50 days, were observed on 0.5% carbohydrates. Males lived shorter on 0.5% glucose as compared with the same concentration fructose, while female cohorts did not show any difference. The LOOH content was not affected by the age on diets with 2% carbohydrates. Significant increase in LOOH content at 10% carbohydrates was observed only on glucose. Flies fed the diet with 10% carbohydrates, had lower SOD activity compared with those kept on 2% carbohydrates. However, aged flies had significantly higher SOD activity than the 'young' ones on 10% glucose. The activity was not affected by age in flies consuming 2% carbohydrates. Glutathione S-transferase activity of 10-day-old females, fed the diet with 2% fructose, was 45% and 37% higher than that in flies fed with 10% fructose, and 10% glucose, respectively. The activity was also 22% higher in aged individuals fed with 10%

fructose as compared with 10-day-old flies. Thioredoxin reductase activity (measured with glutathione as substrate) was 48% higher in 50-day-old flies fed with 2% glucose as compared with 2% fructose. The situation was opposite on 10% carbohydrates: 50-day-old fructose-fed flies had 36% higher activity than glucose-fed ones.

We conclude that ageing may not be tightly associated with accumulation of oxidatively modified molecules and/or this accumulation is not the cause of aging itself. Particularly, we have demonstrated no difference in lifespan between glucose and fructose diets, but observed more lipid peroxides on media containing 10% fructose or glucose and a longer lifespan than on 2% carbohydrates. Moreover, flies living on 10% glucose showed the highest lipid peroxide content, but this did not cause a lifespan shortening. Hence, the activity of antioxidant enzymes and amount of oxidatively modified lipids and proteins do not necessarily correspond to organisms' age; and organisms consuming different diets may have the same lifespan, thus long life can be reached by different metabolic solutions.

ІНТЕНСИВНІСТЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ КРОВІ ЩУРІВ ЗА РОЗВИТКУ КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА ТА ВВЕДЕННЯ ЦИСПЛАТИНУ

ГРАБОВСЬКА О. І., КИРИЧЕНКО С. В., МАЙМИСТОВА А. Г., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: elnikolenko@gmail.com*

Розвиток оксидативного стресу та, як наслідок, інтенсивний процес пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) в організмі пухлиноносіїв є відомим фактом. Оксидативний стрес може відігравати регуляторну роль та спричинити виникнення та розвиток резистентності до певних цитостатиків. Звичайна і резистентна до цисплатину карцинома Герена є зручною моделлю для вивчення біохімічних особливостей явища резистентності. Відомо, що ліпосомна форма цисплатину є менш токсичною для організму щурів-пухлиноносіїв у цій моделі та призводить до ефективнішого гальмування резистентної карциноми Герена (Носко М.М., 2008). Отже, метою роботи було визначення інтенсивності ПОЛ у плазмі крові та еритроцитах, еритроцитарну стійкість щурів-пухлиноносіїв із звичайною та резистентною формою карциноми Герена за введення розчинної та ліпосомної форми цисплатину.

Експеримент проводили на моделі пухлинного росту – звичайній карциномі Герена (КГ) та резистентній до цисплатину (РКГ). Щурів було поділено на групи по 8 тварин у кожній: інтактні тварини; щури-пухлиноносії зі звичайною КГ; щури-пухлиноносії з КГ, яким вводили цисплатин (сPt) (група – КГ + сPt); щури-пухлиноносії з КГ, яким вводили цисплатин у формі наноліпосом (група – КГ + [сPt]nl); щури-пухлиноносії з резистентною до цисплатину карциномою Герена (група – РКГ); щури-пухлиноносії з РКГ, яким вводили цисплатин (сPt) (група – РКГ + сPt); щури-пухлиноносії з РКГ, яким вводили цисплатин у формі наноліпосом (група – РКГ + [сPt]nl). Цисплатин застосовували у двох формах – розчинній та у формі наноліпосом, вводили внутрішньочеревинно одноразово у дозі 8 мг/кг на 9-у добу після трансплантації пухлини. Визначали рівень ТБК – активних продуктів у плазмі та еритроцитах (Андреева Л. И, 1988), ступінь гемолізу еритроцитів у крові щурів (Комышников В. С., 2003).

Показано, що використання ліпосомальних препаратів є ефективнішим, ніж введення розчинів завдяки більш цільовому транспорту, тривалішому циркулюванню, меншій токсичності для організму в цілому. Визначено, що злоякісний ріст як звичайної, так і РКГ до цисплатину призводить до зростання процесів ПОЛ у крові та перебігають повільніше за розвитку резистентного штаму КГ ніж звичайного. Ліпосомальний цисплатин ефективно гальмує інтенсивність ПОЛ в обох експериментальних групах із різними за резистентністю перевитими штамами.

Встановлено чітку позитивну кореляцію між розміром пухлини та інтенсивністю ПОЛ (концентрацію ТБК – активних продуктів у плазмі крові) за розвитку КГ та РКГ. Коефіцієнти кореляції становлять $r = +0,92$ і $r = +0,95$ відповідно.

Визначено різні біохімічні характеристики еритроцитів КГ та РКГ, які полягають у різному рівні інтенсивності ПОЛ всередині клітини та його різній регуляції введеннями цисплатину.

Серед усіх біологічних мембран найчутливішими до дії вільних радикалів та ПОЛ є еритроцитарні мембрани, стан яких визначає функціональну активність еритроцитів. Введення водного розчину цисплатину у ліпосомальній формі призводить до зниження показника в обох пухлинних моделях (у 2,8 раза в групі щурів із КГ та 1,7 раза в групі щурів із РКГ). Таким чином, показано, що за розвитку РКГ відбувається формування стійкішої популяції еритроцитів, ніж за розвитку КГ; введення цисплатину різними способами здійснює менший вплив на еритроцитарну стійкість щурів із РКГ, що може робити певний внесок у феномен резистентності та має стати об'єктом подальших досліджень.

ЗАВИСИМОСТЬ ДИНАМИКИ СОДЕРЖАНИЯ КОЛЛАГЕНА И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ ОТ ЧИСЛА ИХ ДЕЛЕНИЙ

ГРИЦЕНКО М. А., БУЛАНКИНА Н. И., КОТ Е. В., МОРОЗОВА Е. С.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: marija_gricenکو@rambler.ru*

Фибробласты играют определяющую роль в возрастных изменениях функциональных свойств соединительной ткани. Отмеченные в ряде работ возрастное уменьшение удельного количества фибробластов в соединительной ткани и снижение её метаболической активности в постнатальном онтогенезе связаны с т.н. «пределом Хэйфлика» – способностью фибробластов делиться лишь ограниченное число раз, причём максимальное число делений видоспецифично и коррелирует с продолжительностью жизни вида.

Однако возрастное снижение метаболической активности соединительной ткани может быть связано не только с уменьшением в ней количества фибробластов, но и с изменениями их метаболизма в процессе развития и старения организма.

Целью данной работы и было изучение этого вопроса.

В работе использованы фибробласты из периферической области роговицы глаза кроликов-самцов 1,5-месячного возраста. Культивирование фибробластов проводили при температуре 37 °С и 95% влажности с содержанием 5% CO₂ в полноценной среде Дюльбекко с 10% FBS.

В качестве показателя, отражающего динамику интегрального метаболизма фибробластов, выбрано изменение содержания коллагена и гликозаминогликанов (ГАГ) в зависимости от числа их делений в культуре.

О содержании коллагена судили по сумме концентраций гидроксипролина в культуральной среде и клеточном лизате; общего содержания гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов и гепарансульфата – по D-глюкуроновой кислоте.

Для определения динамики изменений содержания биополимеров в культуре фибробластов сравнивали данные 3 и 5 пассажей. В обоих пассажах максимумы содержания для каждого биополимера отмечались в промежутке времени между 120- и 144-ым часом культивирования в экспоненциальной фазе роста культуры. Однако абсолютные величины максимумов содержания коллагена и ГАГ в третьем пассаже (6 делений клеток) превышали эти же значения в пятом пассаже (12 делений клеток) на 35,7 и 37% соответственно.

Характерны и отличия в динамике накопления коллагена и ГАГ в культуральной среде: в обоих пассажах накопление ГАГ начиналось уже на 48-ом, а коллагена – только на 72-ом часе культивирования.

Таким образом, снижение метаболизма соединительной ткани в постнатальном онтогенезе определяется не только «пределом Хэйfliка», но и наблюдаемым уменьшением активности метаболизма в «стареющих» фибробластах.

**ПРОТЕКТОРНИЙ ВПЛИВ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ
У РАЗІ ПОРУШЕНЬ У ТКАНИНАХ СЕРЦЯ, ПЕЧІНКИ
ТА НИРОК, СПРИЧИНЕНИХ РОЗВИТКОМ КАРЦИНОМИ
ЛЬЮЇС ТА ВВЕДЕННЯМ ДОКСОРУБІЦИНУ**

ГУДЗЬ Є. А.

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

На сьогодні актуальним є питання пошуку сполук, які б могли зменшувати побічні ефекти хіміотерапевтичних препаратів, не знімаючи при цьому їх цитостатичних ефектів у тканинах пухлин. Такі властивості притаманні деяким NAE, зокрема їх представнику насиченому N-стеароїлетаноламіну (NSE), що було показано у нашому відділі. Це і визначило нашу зацікавленість до вивчення можливості застосування NSE як антитоксичної сполуки за використання доксорубіцину для лікування.

Мета роботи – з'ясувати можливість зниження токсичних ефектів доксорубіцину за умов введення NSE та механізми його захисної дії в організмі тварин-пухлиноносіїв.

Для досягнення мети дослідження було поставлено завдання:

1. Дослідити вплив N-стеароїлетаноламіну на стан антиоксидантної системи серця, печінки та нирок у тварин із карциномою Льюїс за дії доксорубіцину.
2. З'ясувати вплив NSE на активність аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази в плазмі крові мишей з карциномою Льюїс за дії доксорубіцину.
3. Вивчити дію NSE на продукцію цитокінів (TNF α , IL-10) в мишей з карциномою Льюїс за дії доксорубіцину.

Вперше досліджено вплив насиченого NAE 18:0 – N-стеароїлетаноламіну – на токсичні ефекти в організмі ссавців, що спричинені розвитком карциноми Льюїс та введенням доксорубіцину.

Експериментально встановлено, що N-стеароїлетаноламін модулює низку процесів, що супроводжують розвиток неоплазми на введення доксорубіцину, демонструючи при цьому захисну функцію.

Застосування NSE приводить до зменшення токсичної дії доксорубіцину на тканини серця та печінки, про що свідчить зростання активності аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази в плазмі крові.

Встановлено, що введення NSE модулює активність антиоксидантних ензимів в тканинах серця, печінки та нирок, розбалансування яких відбувається за дії доксорубіцину, введеного в умовах пухлинного росту.

Показана здатність NSE модулювати продукцію інтерлейкінів (TNF α , IL-10) у мишей з карциномою Льюїс за дії доксорубіцину. Ці цитокіни є прогностичними маркерами в умовах розвитку неоплазми.

ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ЗА КОМБІНОВАНОЇ МОДЕЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА РАБДОМІОЛІЗУ

*ГУДКОВА О. О., ЛАТИШКО Н. В., ТОКАРЧУК К. О.,
ЧУМАЧЕНКО І. М., ШАНДРЕНКО С. Г.*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ogudkova.biochem.kiev.ua;*

Головним чинником метаболічних порушень за цукрового діабету є окислення вуглеводів, внаслідок чого формується потужний карбонільний і оксидативний стрес, що є однією із причин розвитку патогенезу захворювання. Таким чином, ензимам, що регулюють рівень АФК та реактивних альдегідів, прооксидантним (семікарбазидчутливий амінооксидази (SSAO) та ксантинооксидази (ХО)) і антиоксидантним (каталази (САТ), глутатіон пероксидази (GPx) та супероксиддисмутазі (SOD)), може належати важлива роль в розвитку ускладнень, які виникають за цієї патології. Дійсно, в нирках, які є органом-мішенню за цукрового діабету, ми спостерігали чотирикратну активацію SSAO після 3 місяців розвитку захворювання. Проте в печінці і крові відбувається зменшення активності ензиму в 3 та 2 рази відповідно. Це, передусім, пов'язане з активацією процесів ПОЛ в цих тканинах за цієї патології (збільшення відносно норми концентрації ТБК-активних продуктів в 4 рази). Константовано також вірогідну активацію ХО в печінці на 33%, і ще в більшому ступені в крові (в 3 рази), що, ймовірно, пов'язано з характерним для хронічного діабету порушенням обміну пуринів, які катаболізує цей ензим. Крім того, високий рівень активності ХО в крові є показником розкладу клітин печінки. Відомо, що цей ензим є джерелом супероксиду, і це може бути однією із причин формування оксидативного стресу за цих умов. У відповідь на збільшену генерацію АФК спостерігається активація антиоксидантної системи, а саме ензиму GPx печінки на 66%. Це корелює зі зменшенням вмісту вільних SH-груп в 3 рази. Одночасне зменшення активності САТ на 30% свідчить про переключення функції ензиму на шлях процесів пероксидації, перебіг яких відбувається за низьких концентрацій пероксиду водню. Багаторазове підвищення активності ХО і відсутність компенсаторного зростання активності SOD свідчить про розвиток оксидативного стресу за рахунок супероксиданіонів, а не пероксиду водню.

У свою чергу, головним чинником метаболічних порушень за рабдоміолізу є потужний оксидативний стрес, пов'язаний з утворенням пулу вільного заліза, що було показано попередніми дослідженнями. Ця патологія супроводжується гострою нирковою недостатністю і в нирках спостерігається чотирикратна активація SSAO і зниження вдвічі активності САТ. Із метою поєднання карбонільного та оксидативного стресів було застосовано комбіновану модель – індукцію рабдоміолізу в/м введенням гліцеролу на фоні хронічного цукрового діабету. При цьому замість очікуваного адитивного ефекту спостерігається нормалізація майже всіх показників, що вивчалися, в печінці активність SSAO, ХО – знижувалась, САТ зростає і відповідно зменшується GPx та крові активність SSAO та SOD збільшувалась, ХО – знижувалась. Тобто порушення функціонування ензимів в цих тканинах в умовах хронічної гіперглікемії не носили фатального характеру. Але в нирках, які є органом-мішенню за обох патологій, нормалізація відбувається тільки частково стосовно SSAO. Всі інші показники різноспрямовано вірогідно змінювались, що пояснюється серйозними пошкодженнями цього органу за цих умов.

В експерименті *in vitro* за дослідження комбінованої дії чинників оксидативного і карбонільного стресу на ензими САТ та SSAO (моделювання умов реакції Фентона в присутності метилгліоксалу) спостерігали аналогічну картину. Показано активуючу дію цих сполук по відношенню до зазначених ензимів. У більшому ступені активуючу дію виявляв альдегід (у 2,5 рази відносно контролю), а сумісна дія обох чинників є різноспрямованою по відношенню до прооксидантного (додатково збільшувала, до 3 разів) і антиоксидантного ензиму (зменшує ступінь активації вдвічі відносно дії альдегіду). Тобто чинники оксидативного і карбонільного стресу виявляють регуляторну дію по відношенню до важливих ензимів оксидантно/антиоксидантного гомеостазу.

**БЛОКАДА ERN1 МОДИФІКУЄ РЕГУЛЯЦІЮ ЕКСПРЕСІЇ
ГЕНІВ *TP53*, *MDM2*, *USP7* ТА *PERP* У КЛІТИНАХ
ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87**

*ДАНИЛОВСЬКИЙ С. В., КРИВДЮК І. В., КОВАЛЕВСЬКА О. В.,
МІНЧЕНКО Д. О.*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: sergius03@gmail.com*

Стрес ендоплазматичного ретикулула і гіпоксія є невід'ємними компонентами росту злоякісних пухлин. Крім того, залежний від стресу ендоплазматичного ретикулула сенсорно-сигнальний шлях ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1) тісно пов'язаний із процесами апоптозу і смерті клітин, оскільки пригнічення його функції істотно знижує швидкість росту пухлин.

Супресор пухлин TP53 (tumor protein 53) координує різноманітні клітинні функції через регуляцію експресії генів-мішеней, тим самим спричинюючи зупинку клітинного циклу та апоптоз. Його функціонування тісно пов'язане з низкою інших протеїнів, зокрема, значну роль у регуляції TP53 відіграє ензим MDM2 (TP53 E3 ubiquitin protein ligase homolog), який є негативним регулятором TP53, а також USP7 (ubiquitin specific peptidase 7), що є прямим антагоністом MDM2. Важливим ефектором TP53, який задіяний в розвитку апоптозу, виступає протеїн PERP (TP53 apoptosis effector).

Метою нашої роботи було дослідження експресії генів *TP53*, *MDM2*, *PERP* та *USP7* в клітинах гліоми лінії U87 із пригніченою функцією ензиму ERN1 за нормальних умов та за умов гіпоксії. Дослідження рівня експресії генів було здійснено методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Результати дослідження показали, що блокування функції ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 індукує експресію генів *TP53* і *USP7*, але знижує рівень експресії генів *MDM2* і *PERP*. Таким чином, посилена експресія гена *TP53* в клітинах гліоми з виключеною функцією ERN1 корелює зі зниженим рівнем убіквітинлігази MDM2 і підвищеним рівнем експресії USP7, який деубіквітинує TP53 і MDM2 та індукує TP53-залежне пригнічення росту клітин і апоптоз. У той самий час, експресія генів *TP53*, *MDM2* і *USP7* не змінюється за блокування лише ендорибонуклеазної активності ERN1 у клітинах гліоми, але підвищується рівень експресії мРНК PERP у цих клітинах порівняно з контрольними клітинами гліоми. Більше того, блокування ендорибонуклеазної активності ERN1 збільшує експресію гена *PERP* до рівня, який спостерігається в нормальних астроцитах людини. Рівень експресії генів *TP53* і *USP7* зменшується за умов гіпоксії, але тільки в контрольних клітинах гліоми. В той же час, експресія генів *MDM2* і *PERP* підвищується в обох типах клітин гліоми, але є значнішою в клітинах із пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1.

Таким чином, одержані результати свідчать про залежність експресії гена *TP53* та асоційованих з ним протеїнів від функції основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, а також від гіпоксії, і корелюють із пригніченням росту пухлин гліоми за умов виключення функції ERN1.

BRASSINOSTEROIDS ACTIVATES CHAPERONES SYNTHESIS IN *Zea mays* L. PLANTS UNDER SALINITY

¹DEREVYANCHUK M. V., ²LITVINOVSKAYA R. P., ²SAUCHUK A.,
²KHRIPACH V. A., ¹KRAVETS V. S.

¹Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus, Minsk;
e-mail: derevyanchuk@bpci.kiev.ua

Brassinosteroids are novel class of phytohormones implicated in regulation of cell adaptation and induce plant tolerance to a range of abiotic stresses. Using radioactive labeling technique with S35 amino acids mixture we analyzed proteins profiles of maize plants after short treatment with salt and brassinosteroids. Identified bands of proteins separated on SDS-PAGE were compared with heat shock proteins (HSPs) gene expression data in Genevestigator database (<https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp>). Protein comparison was held based on MW of identified bands and MW of gene products. Data about 200 *Arabidopsis thaliana* chaperones and 42 *Zea mays* L. HSPs have been used during proteins identification. Similarity between *A. thaliana* and *Z. mays* orthologous HSPs were obtained from comparison of cluster transcripts with RefSeq proteins (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>). Among separated proteins we observed more than 30 protein bands specifically upregulated after BR or salt treatment. Using bioinformatics approaches we found 8 correlation matches between chaperone's gene expression and protein level in BR-treated maize plants. More importantly, chaperones profile synthesis also correlated is salt-treated plants. Brassinazole – inhibitor of BRs biosynthesis – impaired BR-induced accumulation of HSPs.

We found that salt stress and 24-Epibrassinolide induced *de novo* synthesis of range of proteins in *Z. mays* L. plants after 12 hours of treatment. Salt stress and 24-epibrassinolide induced *de novo* synthesis of chaperones proteins belonged to HSP70 group (Heat shock cognate 70 kDa protein 2), chaperonin (HSP60 – CPN60-2), J-class heat shock proteins (HSP40 – DnaJ5, DnaJ 81, DnaJ 91) and small heat shock proteins (sHSP – mitochondrial small heat shock protein 22, 17.0 kDa class II heat shock protein, heat shock protein 26) in *Z. mays* L. plants after 12 hours of treatment.

This work was supported by the State Fund for Fundamental Researches of Ukraine (grant № Ф54/34-2014), NAS of Ukraine grant (№ 2.1.10.32-10) and Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant № X13K-094).

ВПЛИВ L-АРГІНІНУ ТА L-NAME НА СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЗА АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

¹ДУДОК К. П., ¹ЄФІМЕНКО Н. В., ²ГУЛЬ А. Л., ¹СТАРИКОВИЧ Л. С.

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

²Львівський національний медичний університет

імені Данила Галицького, Україна;

e-mail: nataliya_yefimenko@mail.ru

Проблема патогенезу захворювання на алкоголізм вимагає ґрунтовного вивчення біохімічних процесів, пов'язаних із метаболітами етанолу, які виступають індукторами розвитку алкогольної залежності, впливають на структурно-функціональні характеристики біологічно важливих молекул та їхніх надмолекулярних структур, а також пошуку ефективних способів корекції метаболічних порушень за цієї патології.

Наші попередні дослідження компонентів периферичної крові вказують на те, що у людей, хворих на алкоголізм, та у щурів з моделлю хронічної алкогольної інтоксикації та їх потомства порушується стабільність еритроцитарних мембран. Зафіксовано зміну спектральних характеристик CNMetHb, підвищення вмісту лужнотійкого гемоглобіну.

Метою подальших наших досліджень було вивчення окремих ензимів антиоксидантної системи периферичної крові, вмісту ТБК-активних продуктів, спорідненості гемоглобіну до кисню здорових донорів та хворих за хронічної алкогольної інтоксикації, а також у крові щурів – на моделі гострої алкогольної інтоксикації. Оскільки алкогольна інтоксикація супроводжується генерацією активних форм кисню, оксидативно-нітративним стресом, то важливим є вивчення участі L-аргінін/NO системи в процесах стабілізації метаболічних порушень за цієї патології.

Модель алкогольної інтоксикації створювали в щурів щоденним введенням етилового спирту *per os* протягом 14 днів, з розрахунку 6 г/кг маси тіла. Контрольним щурам вводили еквівалентний за калорійністю розчин глюкози (10,2 г/кг). Контрольні і алкоголізовані щури споживали щоденно з питною водою L-аргінін, як основний субстрат NO-синтази (Reanal, Угорщина) у концентрації 1,25 г/л та L-NAME – неселективного інгібітора NO-синтази (Sigma, США) у концентрації 70 мг/л впродовж 14 днів.

Результати досліджень показали, що в людей, хворих на алкоголізм, які перебували на стаціонарному лікуванні, активність каталази в гемолізатах цільної крові до лікування є вищою в 1,4 раза, а в гемолізатах еритроцитів – в 1,3 раза порівняно з нормою. Виявлено зниження активності СОД у плазмі крові хворих в 1,8 раза, зниження активності NO-синтази. За хронічної алкогольної інтоксикації спостерігається підвищений вміст ТБК-активних продуктів на 46%, що свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ. Вірогідно знижується спорідненість гемоглобіну до кисню.

У модельних дослідах за гострої алкогольної інтоксикації щурів виявлено зниження (на 65%) активності каталази, СОД та NO-синтази, зростання вмісту ТБК-активних продуктів. Водночас, у варіантах дослідів зі споживанням щурами L-аргініну та L-NAME спостерігається односпрямована дія цих сполук, що призводить до підвищення активності каталази як у нормі, так і за алкогольної інтоксикації. Виявлено зниження вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові. Встановлено, що в умовах дії L-аргініну та L-NAME спостерігається підвищення спорідненості гемоглобіну до кисню на противагу алкогольної інтоксикації.

Отже, одержані результати свідчать про те, що споживання щурами L-аргініну і L-NAME приводить до стабілізації ензиматичної ланки антиоксидантної системи, порушеної хронічною та гострою алкогольною інтоксикацією.

КОРРЕКЦІЯ ЛИПІДНОЇ ПЕРОКСИДАЦІЇ НАНОПРЕПАРАТОМ ЛИПИНОМ ПРИ ТРАВМЕ М'ЯКИХ ТКАНЕЙ

*ЕЛЬСКИЙ В. Н., ЗЯБЛИЦЕВ С. В., КОЛЕСНИКОВА С. В.,
СИДУН М. С., ЗАВЕДЕЯ Т. Л., ХАРЧЕНКО Р. С.*

*Донецкий национальный медицинский университет
имени Максима Горького, Украина;
e-mail: strelchenkoirui@gmail.com*

Согласно современным представлениям, при травме мягких тканей конечностей вследствие травматического токсикоза деструктивные явления развиваются и в тех органах, которые не подверглись непосредственному повреждению: печени, сердце, почках, лёгких, мозге, глазах. В наших исследованиях, проведенных ранее, четырехчасовая компрессия (6 кг/см²) мягких тканей конечностей белых нелинейных крыс обоего пола, массой 190–230 г, приводила к интенсификации процессов перексидного окисления липидов (ПОЛ) в тканях сердца, печени и почек, что выражалось в увеличении содержания токсических продуктов липидной перексидации – диеновых конъюгатов ненасыщенных

жирних кислот (ДК НЖК) и малонового диальдегида (МДА) в субклеточных фракциях лизосом и митохондрий нетравмированных тканей данных органов, которое протекало на фоне снижения активности антиоксидантной системы (АОС) как энзиматического звена – супероксиддисмутазы (СОД), так и неэнзиматического – α -токоферола, что свидетельствует о развитии в митохондриях и лизосомах мембранопатологических процессов, ведущих к структурным повреждениям биомембран, повышению их проницаемости. Степень свободнорадикальных повреждений различных органов зависит от их морфофункциональных особенностей, специфики ответа каждой ткани на действие повреждающего фактора и от периода травмы (4 часа компрессии, 2 и 24 часа декомпрессии).

В данной работе мы поставили целью исследовать влияние нанопрепарата липина, действующим компонентом которого являются липосомы, на процессы липидной перекисидации в тканях сердца, печени и почек на субклеточном уровне. Основанием этого послужило полученное нами ранее в эксперименте увеличение выживаемости лабораторных животных при СДР с 16% без применения липина до 96% на фоне введения препарата. Введение липина вызывает неоднозначные изменения содержания продуктов ПОЛ (ДК НЖК и МДА) и антиоксидантов (СОД и α -токоферола) в лизосомальных и митохондриальных фракциях тканей сердца, печени и почек у животных, находившихся в раннем периоде (2 часа) декомпрессии. Однако нами наблюдались существенные отличия в ходе процессов ПОЛ и в активности АОС у животных, получавших липин по сравнению с животными, не получавшими его. У последних ранний период декомпрессии характеризуется высокой степенью эндогенной интоксикации продуктами ПОЛ и выраженной антиоксидантной недостаточностью. В то же время в группе животных, которым в момент снятия пресса был введен препарат липин, спустя 2 часа декомпрессии происходит уменьшение и стабилизация показателей ПОЛ и увеличение антиоксидантной активности.

Введение липина спустя 24 часа после устранения компрессии приводит практически к нормализации процессов ПОЛ и повышению активности естественной антиоксидантной защиты, что отражено в значениях соответствующих показателей. Уменьшение синдрома перекисидации под влиянием липина в поздний период декомпрессии подтверждается данными морфологического исследования тканей сердца, печени и почек животных, подвергнутых травме мягких тканей конечностей.

Таким образом, в наших исследованиях введение липина животным при травме мягких тканей конечностей предотвращало интенсификацию процессов ПОЛ и повышало антиоксидантную обеспеченность в мембранах митохондрий и лизосом сердца, печени и почек.

ЛПОСОМИ, НАВАНТАЖЕНІ КЛАСТЕРНОЮ СПОЛУКОЮ РЕНІО(III) ТА ЦИСПЛАТИНОМ. ПРИГОТУВАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ ТА ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ

¹ЄГОРОВА Д. Є., ²ШТЕМЕНКО Н. І., ¹ШТЕМЕНКО О. В.

¹ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університетт», Дніпропетровськ;

²Дніпропетовський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: dina.yegorova@gmail.com

Цисплатин є сполукою, яка активно використовується в хіміотерапії проти широкого спектра пухлин завдяки здатності координуватися до молекули ДНК та тим самим уповільнювати процес її реплікації. Але разом з тим, побічна дія цисплатину, яка пов'язана з різноспрямованою токсичністю цієї сполуки, лімітує ефективне використання платинидів у хіміотерапії. Одним із методів, який знижує токсичність протипухлинних препаратів є створення їх ліпосомних форм. З іншого боку, розробка нових препаратів на основі біядерних комплексів родію, рутенію, ренію є дуже актуальним завданням сучасної медицини та координаційної хімії. Такі сполуки взаємодіють з ДНК, пригнічують її реплікацію та синтез протеїнів подібно до цисплатину. Комплексні сполуки диренію(III) займають

особливе місце серед цього ряду завдяки своїй низькій токсичності. У наших роботах ми намагаємося підвищити ефективність протипухлинних засобів на основі металів шляхом використання сполук із різним механізмом дії (комбінаційна терапія) та одночасно шляхом використання змішаних наноліпосом.

Методом дегідратації тонкої ліпідної плівки було отримано ліпосоми, навантажені *cis*- $\text{Re}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCOO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$ (I) та системою *cis*-Pt(CH_3) $_2\text{Cl}_2$ – *cis*- $\text{Re}_2((\text{CH}_3)_3\text{CCOO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$ (Re-Pt) в молярному співвідношенні 1 : 4. Досліджено характеристики одержаних наноліпосом методами електронної спектроскопії, динамічного розсіювання світла, трансмісійної електронної мікроскопії та ефективність в експериментах на тваринах, яким була трансплантована карцинома Герена (T8) за [Shtemenko, 2007-2009].

Методами електронної мікроскопії встановлено, що форма та розміри ліпосом, навантажених тільки I відрізняється від форми ліпосом, які навантажені системою Re-Pt. Так, ліпосоми, які навантажені I мають кубічну форму, середній розмір яких складає 30–80 нм, тоді як ліпосоми, навантажені системою Re-Pt мають сферичну форму з розмірами везикул близько 100 нм. Крім того, ліпосомні форми I та системи Re-Pt характеризуються високим коефіцієнтом включення кластерної сполуки ренію(III) в ліпосому, що складає до 90%. Стійкість одержаних ліпосом контролювалася методом електронної спектроскопії. Кластерний центр Re_2^{6+} сполуки I, інкапсульованої в ліпосомі, зберігається протягом 8 діб, але спостерігається зміна лігандного оточення завдяки заміненню карбоксилатних лігандів та хлоридних іонів на фосфатні групи фосфатидилхоліну або за рахунок утворення зв'язків з цисплатиною. Встановлено, що ліпосомна форма системи Re-Pt виявляє не тільки протипухлинну активність, а й антигемолітичну, гепато- та нефропротекторну активність, притаманну сполукам ренію з почверним зв'язком.

Отже, інкапсульовання системи Re-Pt в ліпосомі дозволяє збільшити її терапевтичну ефективність, а також знизити побічні ефекти цисплатину.

ВПЛИВ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ НА СТАН СИСТЕМИ NO-СИНТАЗА/АРГІНАЗА У М'ЯЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ В УМОВАХ СТРЕСУ

СМЕЛЬЯНЕНКО В. Ю., СКЛЯРОВ О. Я.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;
e-mail: sklyarov@meduniv.lviv.ua

Блокування синтезу ендогенних простагландинів нестероїдними протизапальними препаратами (НПЗП) на тлі стресу може спричинити дисрегуляцію моторики товстої кишки. Як стрес, так і NO-синтазна система та простагландини безпосередньо впливають на моторику, у зв'язку з чим метою роботи було визначення зміни рівня активності ензимів NO-синтазної системи та процесів ліпопероксидації в умовах дії НПЗП на тлі водно-імобілізаційного стресу (ВІС).

Дослідження виконано на 42 щурах масою 180–220 г, яких було розподілено на 5 груп: 1) контрольна група; 2) тварини, яким моделювали ВІС протягом п'яти годин; 3) тварини, яким вводили неселективний блокатор ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксен на тлі стресу; 4) тварини, яким вводили селективний блокатор ЦОГ-2 целекоксиб на тлі ВІС; 5) тварини, яким вводили блокатор ЦОГ-2/ 5-ЛОГ 2-аміно-5-(3,5-дитертбутил-4-гідроксибензиліден)-тіазол-4-один (2A5DHT) на тлі ВІС. Досліджувані НПЗП вводили в дозі 10 мг/кг *per os* за 30 хв до моделювання стресу. У гомогенатах м'язової оболонки товстої кишки (МОТК) визначали активність NO-синтази, аргінази, вміст ТБК-активних продуктів, нітрит-аніона, активність супероксиддисмутази (СОД), у плазмі крові – концентрацію L-аргініну.

В умовах ВІС у МОТК різко зростає активність iNOS (у 6 разів, $P < 0,01$) та знижується активність cNOS (34%) та активність аргінази (16%), підвищується рівень ТБК-активних продуктів (22%, $P < 0,05$), що свідчить про активацію процесів ліпопероксидації.

Блокування ЦОГ-1 на тлі ВІС зумовлює зниження активності iNOS на 50% ($P < 0,05$); активність cNOS та аргінази вірогідно не змінюється. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном призводить до різкого зменшення активності iNOS у МОТК на 57% ($P < 0,05$). Вірогідних змін активності аргінази, вмісту нітрит-аніона та ТБК-активних продуктів не виявлено порівняно з відповідними показниками тварин в умовах дії ВІС. Блокування ЦОГ-2 целекоксибом на тлі ВІС виявляє тенденцію до підвищення активності iNOS, активність cNOS зростає. Вплив блокатора ЦОГ-2/5-ЛОГ 2A5DHT на тлі ВІС не змінювало вміст ТБК-активних продуктів, нітрит-аніона, активності аргінази, тоді як активність iNOS знижується порівняно з показниками за дії стресу та впливу целекоксибу на тлі стресу.

Стрес спричинює різке зростання активності iNOS та вмісту ТБК-активних продуктів, а також зниження активності аргінази у МОТК. Блокування ЦОГ-1/ЦОГ-2 напроксеном на тлі стресу знижує активність iNOS, тоді як вміст ТБК-активних продуктів та активність аргінази вірогідно не змінюються. Блокування ЦОГ-2 та ЦОГ-2/5-ЛОГ на тлі ВІС у МОТК не зумовлює вірогідних змін активності iNOS, аргінази та вмісту ТБК-активних продуктів, активність cNOS зростає порівняно з відповідними показниками за стресу. Блокування синтезу ендогенних простагландинів за дії неселективних блокаторів ЦОГ-1/ЦОГ-2 знижує активність iNOS, що може спричинити зміни моторики товстої кишки.

БІОХІМІЧНІ ПРОЦЕСИ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ЗА РІЗНИХ ДОЗ ХРОМУ(III) В РАЦІОНІ

ІСКРА Р. Я., СВАРЧЕВСЬКА О. З., САЛИГА Н. О., СЛІВІНСЬКА О. М.

*Інститут біології тварин НААН України, Львів, Україна;
e-mail: iskra_r@ukr.net*

Хром(III) належить до есенціальних елементів, який необхідний для нормальної життєдіяльності організму людини та тварин. Він забезпечує регуляцію вуглеводного, ліпідного і протеїнового обмінів. Цей мікроелемент є біологічно активним у складі олігопептиду хромодуліну, який активує дію інсуліну шляхом сприяння зв'язуванню гормону з рецепторами на поверхні клітини. Проте метаболічні процеси, які відбуваються в організмі за відсутності Cr(III) недостатньо вивчені. Тому метою досліджень було встановити особливості біохімічних процесів в організмі щурів у разі застосування хром-дефіцитної дієти та з'ясувати вплив Cr(III) на ці процеси за введення хрому хлориду в різній кількості до раціону.

Дослідження проведено на білих лабораторних щурах лінії Вістар, яких було розділено на три групи, по 6 тварин у кожній. Усі тварини утримувались на раціоні, який містив 64% сахарози, 20% казеїну, 5% кукурудзяної олії та рекомендовану кількість вітамінів і мінералів, крім хрому. Хром-дефіцитна група щурів отримувала дистильовану воду, а дві інші дослідні групи – розчинений у воді хрому хлорид в кількості 70 і 140 мкг Cr(III)/л.

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що за хром-дефіцитної дієти в крові щурів виявлено високий рівень глюкози та низький вміст глікогену в тканинах печінки та м'язів. Це зумовлено неможливістю надходження глюкози до тканин організму та використання як джерела енергії, що порушує його гомеостаз і має негативні наслідки для функціонування як окремих систем і органів, так і організму в цілому. За цих умов встановлено низький рівень загального протеїну в крові щурів, що може бути зумовлено втратою його із сечею та катаболічними процесами, які відбуваються в організмі. Підвищення АсАТ і АлАТ активності в сироватці крові тварин зумовлене виходом цих ензимних протеїнів крізь ушкоджені клітинні мембрани в кров та підвищенням вмісту кортизолу. Крім цього, за хром-дефіцитної дієти в крові щурів виявлено підвищений рівень холестеролу, триацилгліцеролів, гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів пероксидного окислення ліпідів та знижену супероксиддисмутазу, каталазу, глутатіонпероксидазу активність еритроцитів, а також лізоцимну і бактеріцидну активність сироватки крові.

У разі додавання до раціону щурів хрому хлориду в кількості 70 і 140 мкг Cr(III)/л знижується вміст глюкози в крові відповідно в 1,2 і 1,9 раза, що свідчить про покращення її утилізації тканинами, а підвищення вмісту глікогену в печінці і м'язах свідчить про посилення глікогенезу. За додавання до раціону тварин хрому хлориду в кількості 70 і 140 мкг Cr(III)/л збільшується вміст протеїну, відповідно в 1,2 і 1,6 раза, знижується активність АсАТ в 1,3 і 1,5 раза, АлАТ – в 1,2 і 1,1 раза, що свідчить про нормалізацію деструктивних процесів, які характерні для організму тварин за хром-дефіцитної дієти. За додавання до раціону щурів хрому хлориду вміст триацилгліцеролів знижується в крові тварин обох дослідних груп в 1,1 раза, а холестеролу – в 1,1 та 1,5 раза. Відзначені зміни відбуваються, очевидно, завдяки здатності Cr(III) інгібувати гени синтезу холестеролу, жирних кислот, триацилгліцеролів і фосфоліпідів, а також зумовлювати пригнічення синтезу NADP, який необхідний для цього процесу. За надходження до раціону хрому хлориду в крові щурів зменшуються концентрації гідропероксидів ліпідів і ТБК-активних продуктів, проте збільшується вміст відновленого глутатіону та супероксиддисмутазна, каталазна, глутатіонпероксидазна активність еритроцитів. Надходження Cr(III) в організм щурів у дозах 70 та 140 мкг Cr(III)/л води супроводжується підвищенням лізоцимної на 17,0 і 26,2% та бактерицидної – на 16,3 і 26,2% активності відповідно.

Таким чином, надходження хрому(III) в організм щурів (70 і 140 мкг Cr(III)/л) сприяє покращенню утилізації глюкози тканинами, інтенсифікації синтезу загального протеїну, зниженню вмісту триацилгліцеролів і холестеролу в плазмі крові, інгібуванню процесів пероксидного окислення ліпідів, посиленню антиоксидантного захисту та активації гуморальних факторів неспецифічної резистентності.

АНТИОКСИДАНТНІ МЕХАНІЗМИ У КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ

КАЛАЧНЮК Л. Г., КАЛАЧНЮК Г. І.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: lilkalachnyuk@gmail.com*

У печінці людини і тварин під впливом численних екзо- та ендогенних чинників виникають різні порушення внутрішньоклітинного метаболізму. Загальною їхньою рисою є пошкодження структурно-функціональної організації клітин і мембран, що супроводжується зниженням або втраченою синтезуючою, захисною та регуляторною функцією цього важливого органа.

Виникненню стеатозу печінки сприяють умови гальмування процесів включення триацилгліцеролів у ліпопротеїни дуже низької щільності через інгібування синтезу аполіпопротеїну В (apoB) чи мікросомного трансферного протеїну. Причиною цього можуть бути і незадовільне постачання вказаних біополімерів або конкуренція з холестеролестерами. Згадані порушення можуть виникати також на етапах транспортування та секреції ліпопротеїнів дуже низької щільності і, зокрема, під час перенесення їх від ендоплазматичної сітки до комплексу Гольджі (внаслідок порушення кінцевого глікозидування в ньому) чи у разі зниження швидкості утворення секреторних везикул або порушення їх міграції до клітинних мембран. Стеатоз може бути також типовим відхиленням для пацієнтів із загальним парантеральним живленням, що створює надлишок калорій від глюкози, пов'язаний із невідповідним постачанням протеїну й амінокислот. Тут важливим є те, що додавання ліпідної емульсії в їжу супроводжується зниженням інсулінемії в портальній вені та молярного співвідношення інсуліну і глюкозону в ній, призводячи до зменшення ліпідної інфільтрації в печінці. При цьому стало відомо, що стеатоз, індукований дефіцитом в організмі холіну, знижується у разі використання лецитинової добавки.

Поглиблений аналіз наукової літератури свідчить про відсутність конкретних даних щодо вивчення молекулярно-біологічних механізмів регуляції метаболічних процесів у печінці за дії лікарських препаратів у вигляді ліпосом на основі фосфоліпідів молока. Це пояснюється не тільки складністю реалізації ідеї про розробку та одержання лікувально-профілактичної комплексної речовини, але й

необхідного застосування багатьох складних і високовартісних методів молекулярно-біологічних досліджень на органному, клітинному, субклітинному та ще вищому рівнях. У цьому напрямі заслуговують на особливу увагу досягнення гуманної і ветеринарної медицини, зокрема ті, які стосуються посилення регенерації клітин печінки, зникнення в них жирової інфільтрації, активації синтезу рибонуклеїнової кислоти, підвищення рівня глікогену тощо за застосування фосфоліпідів рослинного і тваринного походження із протекторно-відновлювальною метою в людей і тварин. Діючою речовиною протекторних і відновлювальних засобів є фосфоліпіди як рослинної, так і тваринної природи, у складі яких присутні три ненасичені жирні кислоти (лінолева ~70%, ліноленова й олеїнова ~ 30%), що вважаються основними елементами у структурі клітинної оболонки й мембран клітинних органел печінки. Окрім зазначеного, фосфоліпіди протекторних і відновлювальних засобів в організмі сприяють відновленню обміну ліпідів, протеїнів, нуклеїнових кислот, ензимних систем, детоксикаційної функції печінки.

БІОСИНТЕЗ СЕРОТОНІНУ В МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ОЖИРІННЯ, ІНДУКОВАНОГО СПОЖИВАННЯМ РОЗЧИНУ ФРУКТОЗИ

КАРПОВЕЦЬ Т. П., КОНОПЕЛЬНЮК В. В., САВЧУК О. М.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології», Україна;
e-mail: taras.karpovets@gmail.com*

Розвиток ожиріння, як комплексного захворювання, спричинюється цілою низкою факторів, серед яких слід зазначити вживання їжі та напоїв, збагачених моноцукрами. Вивчення впливу фруктози на розвиток ожиріння становить значний інтерес, оскільки цей моносахарид широко застосовується в харчовій промисловості як замітник сахарози. На сьогодні в літературі існує декілька гіпотез щодо впливу надмірного вживання фруктози на патогенез ожиріння та його супутніх ускладнень, проте молекулярні та біохімічні механізми цього впливу залишаються недостатньо вивченими і потребують детального розгляду. Відомо, що ожиріння є ендокринним захворюванням, розвиток якого пов'язаний із дисбалансом у системі серотоніну – нейромедіатору і гормону, що регулює процеси звуження судин, скорочення гладкої мускулатури, формування больових відчуттів, контролю сну, емоційної та харчової поведінки та енергетичний гомеостаз організму. Виділення серотоніну є ключовим у формуванні відчуття насичення. На сьогодні, очевидним є взаємозв'язок між порушенням функціонування серотонінергічної системи та розвитком ожиріння, а також супутніх захворювань, серед яких: артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця та цукровий діабет 2-го типу, проте механізми цього зв'язку залишаються недостатньо вивченими. Тому метою нашої роботи було дослідити біосинтез серотоніну в мозку щурів за розвитку ожиріння, індукованого споживанням розчину фруктози.

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самках із початковою масою 160–200 г. Упродовж першого тижня всі щури отримували стандартну їжу «Purina rodent chow» і воду *ad libitum*. На 8-й день тварин рандомізовано було розділено на 2 групи по 10 тварин в кожній. Тварини першої групи («контроль») протягом 10 тижнів отримували стандартну їжу та воду. Тварини другої групи («фруктоза») знаходились на стандартному раціоні та отримували 10%-й розчин фруктози *ad libitum*.

Вміст триптофану, 5-гідрокситриптофану та серотоніну в мозку щурів визначали, використовуючи іонно-обмінну хроматографію та спектрофлуориметричні методи. Визначення триптофан-гідроксилазної, триптофан-декарбоксилазної та моноаміноксидазної активності у мозку щурів визначали спектрофлуориметричним та спектрофотометричним методами. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Origin і Microsoft Excel. Для

оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $P < 0,05$.

В ході досліджень встановлено зниження вмісту триптофану на $60 \pm 10\%$, 5-гідрокситриптофану, безпосереднього попередника біосинтезу серотоніну, на $52 \pm 15\%$ та серотоніну на $45 \pm 18\%$ у мозку щурів дослідної групи. Внаслідок досліджень було встановлено, що 10-тижневе споживання 10%-го розчину фруктози призводило до зниження активності ключового та швидкості лімітуючого ензиму шляху біосинтезу серотоніну – триптофан-гідроксилази на $30 \pm 2\%$, а також зниження триптофан-декарбоксилазної активності на $58 \pm 10\%$ у мозку щурів дослідної групи. Встановлено зростання активності ензиму, що забезпечує процес розпаду серотоніну – моноаміноксидази на $62 \pm 27\%$ в головному мозку щурів за умов споживання 10%-го розчину фруктози.

Одержані результати свідчать про порушення біосинтезу серотоніну в розвитку фруктозоіндукованого ожиріння, а також вказують на можливе залучення серотонінергічної нейротрансмітерної системи головного мозку на розвиток та прогресування цього багатofакторного захворювання.

ФЕРИТИН ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ НЕЙРОТОКСИЧНИЙ АГЕНТ, ЩО ЗМІНЮЄ КЛЮЧОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЛУТАМАТЕРГІЧНОЇ НЕРВОВОЇ ПЕРЕДАЧІ

*КАСАТКІНА Л. О., КРИСАНОВА Н. В., СІВКО Р. В.,
БОРИСОВ А. А., БОРИСОВА Т. О.*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: tborisov@biochem.kiev.ua*

Складний протеїновий комплекс феритин, який в клітині є основним депо заліза, присутній також у сироватці крові і цереброспінальній рідині та посилено секретується клітинами за певних патологічних станів, а також виходить із пошкоджених клітин за інсульту та травми мозку. Показано, що феритин здатен долати гематоенцефалічний бар'єр, а на клітинах є специфічні рецептори до цього протеїну. Метою роботи було дослідити вплив екзогенного феритину на ключові характеристики глутаматергічної нервової передачі.

Із використанням L-[^{14}C]глутамату та спектрофлуорометричної реєстрації концентрації ендogenous глутамату було показано, що екзогенний феритин підвищує позаклітинний рівень L-[^{14}C] глутамату ($0,200 \pm 0,015$ порівняно з $0,368 \pm 0,016$ нмоль/мг протеїну) та ендogenous глутамату в суспензії ізольованих нервових закінчень головного мозку (синаптосом). Це зумовлено пригніченням початкової швидкості накопичення L-[^{14}C]глутамату синаптосомами ($2,74 \pm 0,20$ порівняно з $1,30 \pm 0,12$ нмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ протеїну) в присутності феритину без змін тонічного вивільнення глутамату.

Феритин спричинює зниження протонного градієнта синаптичних везикул, що реєструється як вивільнення рН-чутливого флуоресцентного зонда акридину оранжевого. Роль заліза в ефектах феритину була проаналізована за проведення паралельних досліджень у присутності апоферитину. Показано, що апоферитин практично не впливає на протонний градієнт синаптичних везикул, проте зумовлює підвищення позаклітинного рівня глутамату та зниження початкової швидкості його накопичення синаптосомами, хоча ефект апоферитину на 30% менш виражений порівняно з феритином.

Одержані результати свідчать про потенційний нейротоксичний вплив феритину, особливо у разі підвищення його рівня вище індивідуальної норми, оскільки він спричинює часткову дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул, пригнічує активне накопичення глутамату, і, як наслідок, зумовлює зростання рівня позаклітинного глутамату. Механізми впливу феритину на зазначені параметри є лише частково залежними від присутності заліза в його молекулі.

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ІНТЕНСИВНОСТІ ПОГЛИНАННЯ
ГЛЮКОЗИ ПЛІВКОУТВОРЮЮЧИМИ ШТАМАМИ БАКТЕРІЙ
РОДИНИ *Enterobacteriaceae* ТА РОДУ *Staphylococcus***

КИРИЧЕНКО К. С., ВОРОНКОВА О. С.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: kirichenkokat2803@gmail.com*

Біоплівка – це спільнота мікробів, які мають змінений фенотип, що виявляється іншими параметрами росту і експресії специфічних генів. Колонізаційна активність мікроорганізмів напряму залежить від метаболічної активності клітин, одним із показників якої є інтенсивність поглинання субстратів. Її визначення певною мірою вказують на колонізаційний потенціал мікроорганізмів, що має особливе значення для штамів патогенних та умовно-патогенних бактерій.

Метою наших досліджень було порівняльне вивчення інтенсивності поглинання глюкози штамми ентеробактерій та стафілококів, як найпоширеніших збудників інфекційних захворювань. Для визначення поглинання глюкози використовували тест-систему «Визначення глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом» (ТОВ НВП Філісіт-Діагностика, Україна).

Згідно з цим методом глюкоза в присутності глюкозооксидази окислюється киснем повітря до глюконової кислоти та пероксиду водню, що в присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміна червоно-фіолетового забарвлення. Абсорбцію вимірювали на КФК-2МП за довжини хвилі 540 нм. Інтенсивність поглинання глюкози визначали за хвилину в перерахунку на 10^3 клітин.

Інтенсивність поглинання глюкози досліджували у плівкоутворюючих штамів представників родини *Enterobacteriaceae* та роду *Staphylococcus*. 50 мкл суспензії планктонної культури мікроорганізмів із кількістю клітин 10^5 КУО/мл вносили в пробірки з м'ясо-пептонним бульйоном, який містив 2% глюкози. Культивування проводили в термостаті при 37 °С. Для проведення аналізу відбирали проби по 50 мкл через 2 та 6 годин. Для контролю ходу реакції та процедури вимірювання використовували контрольну сироватку із зазначенням активності (ФілоПат, Україна).

Було встановлено, що всі штамми інтенсивно поглинали глюкозу від початку культивування. Штами ентеробактерій за перші 2 години культивування поглинули глюкози від $1,57 \cdot 10^{-4}$ до $1,89 \cdot 10^{-4}$ мкМ·хв⁻¹ на 10^3 клітин. А для стафілокока поглинання глюкози становить від $1,85 \cdot 10^{-4}$ до $1,93 \cdot 10^{-4}$ мкМ·хв⁻¹ на 10^3 клітин.

Через 6 годин культивування спостерігається зменшення інтенсивності поглинання глюкози у середовищі. Штами ентеробактерій за 6 годин культивування поглинули глюкози від $2,22 \cdot 10^{-4}$ до $2,59 \cdot 10^{-4}$ мкМ·хв⁻¹ на 10^3 клітин, а штамми стафілокока поглинули – від $2,36 \cdot 10^{-4}$ до $2,63 \cdot 10^{-4}$ мкМ·хв⁻¹ на 10^3 клітин.

На основі одержаних даних можна зробити висновок, що найбільше поглинання глюкози плівкоутворюючими штамми, ідентифікованими як належні до родини *Enterobacteriaceae* та штамми з роду *Staphylococcus* інтенсивно відбувається в перші 2 години культивування. Це явище можна пояснити тим, що у вказаний період клітини бактерій знаходяться в активній фазі росту та поділу клітин. Таке зростання інтенсивності поглинання глюкози вірогідно може бути пов'язано з колонізаційною активністю бактерій та проявом їх патогенетичних властивостей.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ИНДУЦИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК *Dunaliella* К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ ИОНОВ МЕДИ

КИЗИЛОВА В. Ю., МЕНЗЯНОВА Н. Г.

*НИИ биологии, Харьковский национальный университет
им. В.Н. Каразина, Украина;
e-mail: kizilova86@mail.ru*

Аминокислота пролин участвует в процессах адаптации высших растений и микроводорослей к различным неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам. Принято считать, что метаболизм пролина играет важную роль в формировании резистентности одноклеточных микроводорослей к высоким концентрациям меди. Ионы меди в высоких концентрациях индуцируют свободнорадикальные процессы, которые приводят к образованию окисленных липидов и карбонилированных протеинов. Полагают, что пролин может проявлять себя как антиоксидант, перехватывая реактивные формы кислорода, выступать хелатором тяжелых металлов, ингибировать пероксидное окисление липидов, а также выполнять регуляторные функции. Однако конкретные пролинзависимые молекулярно-клеточные события, приводящие к формированию резистентности, изучены недостаточно.

В связи с этим представляло интерес определить роль пролина как антиоксиданта на микроводорослях *Dunaliella viridis* при внесении высоких концентраций ионов меди. Для этого в клетках микроводорослей *D. viridis*, находящихся на стационарной фазе роста (21-е сутки культивирования) определяли динамику содержания пролина в течение первых 17 часов после внесения меди в концентрации 300 мкМ (в форме $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), а также содержание карбонилированных протеинов как показатель окислительного повреждения протеинов. Кроме этого, определяли содержание экзополисахаридов в культуральной среде для исследования роли системы экскреции в формировании устойчивости клеток микроводорослей к высоким концентрациям ионов меди.

Показано, что на стандартной среде без внесения ионов меди в течение первых 7 часов культивирования содержание пролина в клетках микроводорослей уменьшается в 1,4 раза, но затем наблюдается вторичное увеличение содержания пролина: через 17 ч культивирования на стандартной среде содержание пролина было в 1,7 раза больше, чем в точке «0» (культура *D. viridis* на 21-е сутки роста без пересадки на свежую среду).

Содержание пролина в клетках микроводорослей после внесения меди уменьшается нелинейно. Резкое снижение содержания пролина наблюдается через 3 ч после внесения меди (в 4 раза, по сравнению с точкой «0»). В течение последующих 14 часов культивирования содержание пролина значительно не изменяется: через 17 ч после внесения меди содержание пролина в 5 раз меньше (по сравнению с «0» точкой).

Следует отметить, что содержание пролина в клетках микроводорослей на среде с 300 мкМ меди (17 ч культивирования) было в 8,3 раза меньше, чем в клетках микроводорослей через 17 ч культивирования на стандартной среде. При этом содержание карбонилированных протеинов в клетках на среде с медью было в 1,8 раза больше, чем в контрольной культуре. Показано, что уже на 7-й и 17-й час культивирования с ионами меди содержание экзополисахаридов в культуральной среде увеличивается в 1,8 и 2 раза соответственно по сравнению с контрольным вариантом. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что пролин как низкомолекулярный перехватчик радикалов и хелатор меди не единственная система, которая мобилизуется для защиты клетки. Активация системы экскреции и связывание меди с внеклеточными полимерами может играть важную роль в системе защиты клетки от ионов меди.

ПОРУШЕННЯ ОБМІНУ КЛІТИННОГО ЗАЛІЗА ЗА ГЕПАТОЦЕЛЮЛЯРНОЇ КАРЦИНОМИ

*КІНДРАТ І. П., ЕРСТЕНЮК А. М., КОБЕЦЬ Т. С.,
БЕЛАНД Ф. А., ПОГРІБНИЙ І. П.*

*Національний центр токсикологічних досліджень, Джефферсон, США;
Івано-Франківський національний медичний університет, Україна;
e-mail: Ira_Kindrat@i.ua*

Гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК) – одне з найпоширеніших онкологічних захворювань печінки, що швидко прогресують. Істотна роль у розвитку ГЦК відводиться хронічним захворюванням печінки, пов'язаних із вірусами гепатиту В, С, D, гемохроматозом, цирозом та алкоголізмом.

Патогенез ГЦК є складним і характеризується декількома взаємопов'язаними молекулярними змінами. Наявні дані показують, що змінений метаболізм заліза відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні ГЦК. Проте відсутня переконлива інформація щодо механізмів цього порушення регуляції.

В експерименті ми досліджували основні механізми порушень обміну заліза в процесі гепатоканцерогенезу. Експерименти проведено на людських клітинах раку печінки ліній Sk-Hep1, PLC/PRF/5, Hep3B, HepG2 і на онкогенних JM1 та неонкогенних TRL1215 клітинах печінки щурів. У роботі використано методи вестерн блоту та кількісної ланцюгової полімеразної реакції зі зворотною транскрипцією в реальному часі. Представлені результати показують про зміни в регуляції клітинного гомеостазу заліза в щурів і людських ліній клітин ГЦК, що характеризується значним збільшенням рівня мРНК і протеїну трансферинового рецептора 1 (ТфР1). ТфР1 – основний мембранний протеїн контролю клітинного поглинання заліза, експресія якого залежить від внутрішньоклітинної концентрації заліза та інтенсивності проліферації клітин. На противагу цьому, рівень феропортину, основного клітинного протеїну-експортера заліза, не змінюється в досліджуваних лініях клітин. Це свідчить на користь накопичення заліза в клітинах ГЦК. Такі самі тенденції виявлено і в печінці передракових щурів, канцерогенез в яких спричинювався за допомогою 2-ацетиламінофлуорену та в печінці щурів лінії Фішер 344, підданих класичній моделі «стійкого» канцерогенезу гепатоцитів печінки.

Одержані дані результати свідчать, що порушення регуляції клітинного метаболізму заліза під час канцерогенезу печінки пов'язане з підвищенням рівня трансферинового рецептора 1.

ВПЛИВ КЛАСТЕРНИХ СПЛУК РЕНІЮ ТА СИСТЕМИ РЕНІЙ–ПЛАТИНА НА ПРОТЕЇНИ КРОВІ

КЛЕНІНА І. А., ГОРІЛА М. В., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: gorelaya@ukr.net*

Вивчено вплив кластерних сполук ренію та протипухлинної системи реній–платина на протеїни крові щурів у моделі пухлинного росту та в експериментах *in vitro*. Показаний антиоксидантний, коригуючий вплив сполук ренію на тіолдисульфідну та протеїн-синтезуючу системи організму щурів залежно від структури сполук ренію та способів введення.

Застосування ліпосомних сполук ренію різних структурних типів статистично вірогідно не впливає на тіолдисульфідну систему крові щурів, натомість, введення цисплатину зменшує тіолдисульфідний коефіцієнт крові у 5,5 раза, що підтверджує окислювальний вплив цієї сполуки на протеїни. Введення кластерних сполук ренію в ліпосомних формах шурам-пухлиноносій призводить до підвищення концентрації загального протеїну крові в середньому у 2,5 раза порівняно з контролем незалежно від їхньої протипухлинної активності; введення змішаних наноліпосом, які навантажені

цисплатином і сполуками ренію, призводило до нормалізації концентрації загального протеїну крові разом з ефективним гальмуванням пухлини на відміну від введення цисплатину, де спостерігається зменшення концентрації загального протеїну більш ніж у 3 рази в порівнянні з контролем. Одержані дані свідчать про коригуючу дію кластерних сполук ренію щодо протеїн-синтезуючої системи організму щурів в умовах експериментального канцерогенезу. Порівняльне вивчення протеїнового спектра плазми крові у вищезгаданих експериментах свідчить про найсуттєвіший вплив сполуки ренію саме на біосинтез альбуміну (електрофоретична рухомість змінюється на 10–15%, значення ізоелектричної точки зсувається до 2 одиниць), оскільки інші протеїни плазми крові практично не змінювали електрофоретичну рухомість. Показано, що кластерні сполуки ренію впливають на стан тіолдисульфідної системи еритроцитів у моделі канцерогенезу, підвищуючи концентрацію тіолових груп в середньому в 2,5–4 рази порівняно з цисплатином. Коригуючі властивості кластерних сполук ренію щодо тіолдисульфідної системи залежать від природи лігандів, що оточують кластерний фрагмент. Найбільший вплив щодо відновних властивостей знайдено для кластерної сполуки ренію з фосфатними лігандами, що може бути пояснено іонними взаємодіями між фосфатними групами і амінокислотними залишками протеїнів. Вперше вивчено взаємодію кластерних сполук ренію з альбуміном *in vitro* методом турбідиметрії, показано, що сполуки ренію взаємодіють з протеїном в залежності від природи і орієнтації лігандів у просторі. При цьому найактивнішими сполуками у формуванні осаду є сполуки *транс*-конфігурації (за 2–5 хв), а найменш активними – сполуки тетракарбоксилатного типу (за 35 хв.) та *цис*-конфігурації з гідрофобними адамантановими лігандами (за 40–65 хв). За концентраційного співвідношення альбумін–кластерна сполука ренію 1 : 10 відбувається координація почверного зв'язку з ароматичними амінокислотними залишками (ймовірно, гістидину), що відбивається в спектральній картині сумішей сполук, і не спостерігається у разі використання ліпосомних форм сполук; це свідчить про відсутність взаємодії ліпосом з протеїнами та їх незалежний від транспорту протеїну механізм циркуляції в крові.

В процесі взаємодії кластерних сполук ренію з альбуміном змінюється характер спектрів в області поглинання протеїну та кластерного фрагмента метал-метал. Це свідчить про утворення комплексів протеїн–сполука. При цьому почверний зв'язок Re-Re зберігається та відбувається нуклеофільне заміщення аксіальних лігандів і лабільних хлоридних лігандів в екваторіальному оточенні кластеру Re_2^{6+} .

К ВОПРОСУ О МЕЖОРГАННОЙ КООПЕРАЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ХОДЕ ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ НА СТРЕССОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

КНЯЗЕВА М. В.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина,
ГО «Новое мышление в медицине», Украина;
e-mail: m_knyazeva@ukr.net*

Возникновение стрессогенных заболеваний (острый инфаркт миокарда, остеохондроз и др.) по данным литературы (Горизонтов П. Д., 1976; Панин Л. Е., 1983 и др.) связано со срывом адаптационных возможностей организма в ходе ответной реакции на стрессовое воздействие на стадии истощения. Это может возникнуть как результат конкуренции между отдельными органами и тканями за один и тот же метаболит, что было показано нами ранее на примере конкуренции за пролин между тканями костно-суставной и сердечно-сосудистой систем при стрессе (Князева М. В., 1996, 2005). Учитывая важную роль железа и меди в регуляции метаболических процессов в организме, их роль как кофакторов или простетических групп энзимов, для характеристики межорганной кооперации костно-суставной и сердечно-сосудистой систем при стрессе нами изучена динамика содержания этих микроэлементов в тканях тел позвонков (ТП), межпозвоночных дисков (МД), бедренных костей

(БК), аорты (А), миокарда (М), печени (П) 3- и 12-месячных белых беспородных крыс при 30-суточной гипокинезии (Г30) и реадaptации после нее на 1- (РА1), 3- (РА3) и 5-е (РА5) сутки. Гипокинезию моделировали, используя тесные клетки-пеналы. Содержание железа и меди определяли наборами реактивов «Pliva-Lachema». Результаты выражали в г/100 г ткани, высушенной до постоянной массы, и в процентах по сравнению со значениями у 3- и 12-месячных интактных животных (контролем). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Statgraphics Plus 5.0 и Excel 2003. Установлено, что при Г30 в молодом организме в ткани П, а в стареющем – в ткани БК происходит аккумуляция меди (до 250–320%), что у 3-месячных крыс сопровождается снижением ее содержания в тканях ТП (до 7–10%) и А (до 70–80%), а у 12-месячных крыс – снижением в ткани М в 2 раза и повышением в ТП (до 120–130%). В ткани БК молодых крыс при этом наблюдается аккумуляция железа (до 180–190%), снижение его в МД, а в старшей возрастной группе снижение уровня железа в БК (до 65–70%) сопровождается его накоплением в ТП (до 150–155%). Выход из состояния Г30 на 1-е сутки РА характеризуется сохранением пула меди в ткани П, дефицита ее в ТП, снижением содержания в М (до 50–60%), повышением ее уровня в А (до 130–140%) и МД (до 140–150%) у 3-месячных крыс. У стареющих крыс при РА1 была отмечена аккумуляция меди в М (до 380–400%) на фоне снижения ее содержания в П в 2,5 раза и БК (до уровня контроля). Содержание железа во всех исследуемых тканях 3-месячных крыс, кроме П, оказалось сниженным (до 35–70%), а у 12-месячных было снижено в М, А и БК (до 55–80%). На 3 и 5 сутки РА большое количество меди в организме молодых животных сосредоточилось в БК (до 190–200%), пул меди переместился из печени в БК на фоне сниженного содержания в ТП и М, а у стареющих крыс при РА3 аккумуляция меди отмечается в М (до 380–400%) и А (до 145–150%) при сниженном ее содержании в БК и П (до 50–55%). На 5-е сутки РА пул меди у них перемещается в БК (до 190–200%) на фоне повышения ее уровня до контрольного в других тканях. Содержание железа при РА3 и РА5 повышается в БК молодых животных (до 130–140%) на фоне снижения в других исследуемых тканях, а у 12-месячных крыс местом накопления железа при РА3 являются ТП (до 130–140%) и П (до 110–120%), а при РА5 – БК (до 130–140%) на фоне снижения его содержания в М и МД (до 45–60%). Полученные результаты дают основание предположить изменение характера межорганной кооперации в регуляции окислительно-восстановительных процессов с использованием меди и железа в ходе ответной реакции на стрессовое воздействие и при старении организма.

ДИФЕРЕНЦІЙНА ЕКСПРЕСІЯ РКD1 ТА РКD2 В ПУХЛИНАХ РАКУ ШЛУНКА: РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ РКD2 ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ОБ'ЄКТ ТРАНСЛЯЦІЙНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

КОВАЛЕВСЬКА Л. М., ГОРДІЄНКО І. М., ШАБЕЛЬНИК М. Ю.,
ШЛАПАЦЬКА Л. М., КОВЕЛЬСЬКА А. В., СИДОРЕНКО С. П.

*Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: svitasyd@yahoo.com*

Протеїнкінази родини РКD є потенційними мішенями таргетної терапії злоякісних новоутворень. В експериментальних модельних системах було доведено, що різні кінази РКD можуть опосередковувати протилежні ефекти, що обумовлюють виживаність пухлинних клітин та їхню здатність до метастазування. Зокрема, в пухлинах шлунка, простати та молочної залози РКD1 виступає як пухлинний супресор. В той самий час, роль РКD2 та РКD3 в біології пухлинних клітин не є однозначною. Наприклад, РКD3 в пухлинах простати є промотором пухлинного росту. Тому розробка підходів та тест-систем для диференційного виявлення різних протеїнкіназ родини РКD є актуальною для з'ясування ролі окремих кіназ цієї родини в процесах ініціації, промоції та прогресії злоякісних новоутворень різного гістогенезу, визначення можливостей виявлення рівня експресії та активності цих

кіназ як прогностичних факторів для оцінки перебігу захворювання, а також пошуку селективних інгібіторів або активаторів представників родини PKD.

Мета роботи полягала у з'ясуванні ролі PKD1 та PKD2 в регуляції біологічних властивостей лінії клітин аденокарциноми шлунка AGS, а також проведенні аналізу диференційної експресії PKD1 та PKD2 на рівні мРНК і протеїну в зразках пухлин раку шлунка та умовно нормальних тканинах шлунка з урахуванням гістологічного варіанта пухлини, розповсюдженості пухлинного процесу та перебігу захворювання. Показано, що в модельній системі лінії клітин AGS експресія PKD1 та гіперекспресія PKD2 впливає на біологічні особливості клітин. Трансфекція PKD1 призводить до зменшення рівня експресії PKD2, зниження проліферативної активності клітин, їх рухливості та здатності до колонієутворення в напіврідкому агарі. При гіперекспресії PKD2 зростає проліферативна активність клітин, їх рухливість та здатність до колонієутворення в напіврідкому агарі. Трансляційні дослідження експресії PKD1 та PKD2 в злоякісних пухлинах шлунка виявили гетерогенність пухлинних зразків за рівнем експресії PKD1 та PKD2. Показано, що рівень експресії PKD2 в злоякісних пухлинах шлунка є значно вищим рівня експресії цієї кінази в умовно нормальній слизовій шлунка. Встановлено, що рівень експресії PKD2 в злоякісних пухлинах шлунка корелює із розповсюдженістю і стадією пухлинного процесу, зокрема, з наявністю метастазів. У зразках аденокарцином хворих IV ст. та персневидно-клітинного раку шлунка, які характеризуються несприятливим перебігом захворювання, виявлено найвищий рівень експресії PKD2. Найнижчий рівень експресії PKD2 визначений в зразках аденокарцином хворих II–III ст. без наявних уражень лімфатичних вузлів. В той же час, нами не було виявлено істотних відмінностей між рівнем експресії PKD1 в пухлинах і умовно нормальній слизовій шлунка, а також кореляції між експресією PKD1 і розповсюдженістю та перебігом пухлинного процесу. Таким чином, PKD2 можна розглядати як об'єкт трансляційних досліджень із метою визначення можливостей використання рівня експресії PKD2 як потенційного прогностичного маркера при раку шлунка.

Робота виконана за підтримки гранта 0110U005757 в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій».

ЕКСПРЕСІЯ КОНСТИТУТИВНОЇ ТА ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ ІЗОФОРМ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ В ПОЗАПУХЛИННІЙ ТКАНИНІ ТА ГОРМОНАЛЬНО НЕАКТИВНИХ ПУХЛИНАХ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ ЛЮДИНИ

КОВЗУН О. І., ЛУКАШЕНЯ О. С., МИКОША О. С.

*ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ;
e-mail: kovzun@newmail.ru*

Оксид азоту (NO) має фізіологічний вплив на процеси стероїдогенезу в різних ендокринних тканинах – яєчниках, яєчках і надниркових залозах. Імунореактивний протеїн ендотеліальної NO-синтази (eNOS) було виявлено в клубочковій зоні надниркової залози щура. За допомогою імуногістохімічних методів було показано, що eNOS локалізована не тільки в межах судин, але також у клітинах кори надниркових залоз. У декількох дослідженнях із різним дизайном було показано гальмівний вплив NO на стероїдогенез у надниркових залозах. Проте було також показано, що NO збільшує вивільнення кортикостерону з надниркових залоз за рахунок активації адренокортикотропним гормоном NOS та подальшого збільшення NO-залежної активації циклооксигенази, що, в свою чергу, веде до збільшення утворення PGE₂, який полегшує вихід кортикостерону з мікровезикул або інших органел клітин кори надниркових залоз. Тому метою роботи було встановлення експресії конститутивної та індукційної

(iNOS) ізоформ синтаз оксиду азоту в позапухлинній тканині та гормонально неактивних пухлинах кори надниркових залоз людини.

Досліджували постопераційні тканини хворих, прооперованих у клініці інституту. Для визначення експресії мРНК ізоформ синтази NO методом ПРЛ використовували праймери до ізоформ NO-синтази. Методом зворотної транскрипції полімеразної ланцюгової реакції вперше встановлено експресію мРНК ендотеліальної та індукцйбельної форм NO-синтаз в адренкортикоцитах людини. Якщо рівень експресії мРНК eNOS у позапухлинній тканині прийняти за 100%, то в тканині гормонально неактивних пухлин цей показник становив $93,10 \pm 7,02\%$. Подібна закономірність спостерігалась також під час дослідження експресії мРНК індукцйбельної ізоформи NO-синтази. Рівень експресії мРНК iNOS в гормонально неактивних пухлинах не змінювався, по відношенню до позапухлинної тканини цей показник становив $97,20 \pm 3,37\%$. Експресія ізоформ синтази оксиду азоту в тканині кори надниркових залоз людини підтверджує припущення, що NO може слугувати автокринним/паракринним модулятором стероїдогенезу, що забезпечує тонке налаштування клітинної відповіді завдяки впливу або на активність ензимів стероїдогенезу, або на їх експресію через змінення функції факторів транскрипції.

ВПЛИВ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЮВАННЯ НА МЕТАБОЛІЗМ НІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ

КОКОШКІНА О. О., ЗАПОРОЖЧЕНКО О. В.

*Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Україна;
e-mail: sana332@ukr.net*

Важливим напрямом сучасної біохімії є вивчення впливу різних хімічних та фізичних факторів, у тому числі і радіаційного опромінювання, на обмін речовин у клітинах та механізмів його регуляції, що має особливе значення для підтримання гомеостазу біологічних систем.

Мета: вивчення швидкості метаболізму ^{14}C -нікотинової кислоти в тканинах щурів за умови введення нікотинової кислоти (НК) при загальному одноразовому опромінюванні щурів в дозі 6 Гр.

Дослідження проведено на 24 щурах лінії Вістар: 1-а група отримувала внутрішньом'язово фізіологічний розчин (контрольна група); 2-а група – внутрішньом'язове введення НК (10 мг/кг маси); 3-я група – рентгенівське опромінювання в дозі 6 Гр; 4-а група отримувала внутрішньом'язово НК (10 мг/кг маси) на фоні рентгенівського опромінювання в дозі 6 Гр. Щурам всіх чотирьох груп вводили внутрішньом'язово ^{14}C -НК (загальна активність 0,1 мКи (37 мБк), питома активність 4,2 ГБк/ммоль) в дозі 1 мг на кг маси тварини. Через 6 годин проводили радіохроматографію досліджуваних тканин (кров, мозок, печінка, нирки, тонкий кишечник) і визначали радіоактивність, які відповідають НК, нікотинуровій кислоті, сумі $\text{NAD}+\text{NADP}$ і $\text{NADH}+\text{NADPH}$. За допомогою стандартних зразків, які теж наносили на хроматографічну бумагу (0,1 ммоль) розраховували вміст вищеназваних метаболітів в мкг на г тканини.

Рентгенівське опромінювання спричинювало зниження рівня нікотинурової кислоти, особливо в печінці (на 26% відносно контролю), і в той же час сприяло зростанню вмісту суми $\text{NAD}+\text{NADP}$ у всіх тканинах, за винятком крові, в першу чергу суми $\text{NADH}+\text{NADPH}$. Найвираженіші зміни рівня нікотинамідних коензимів виявлені в тканинах: $\text{NAD}+\text{NADP}$ – мозок (на 49,3%), печінка (на 37,6%), тонкий кишечник (на 29,6%), нирки (на 18,8%) і нижче за норму кров (на 48%); $\text{NADH}+\text{NADPH}$ – мозок (на 79,5%), нирки (на 56%) і тонкий кишечник (на 53,2%), печінка (на 42,1%), кров (на 15,4%) по відношенню до контрольної групи. За сумісного застосування рентгенівського опромінювання і введення НК спостерігається високий рівень суми $\text{NAD}+\text{NADP}$ в печінці (159,2%), тонкому кишечнику (142,6%), нирках (138,0%) і мозку (204,0%) за порівняння з контрольною групою тварин, а по відношенню до групи з рентгенівським опромінюванням істотні зміни спостерігаються в тонкому

кишечнику (110,1%), нирках (116,1%) і мозку (136,6%). Виявлено більш значне збільшення рівня суми NADH+NADPH до 170,3% в печінці, до 237,1% у тонкому кишечнику, до 169,1% – в нирках і до 314,4% – в мозку відносно контролю, а по відношенню до групи тварин із рентгенівським опромінюванням приріст суми NADH+NADPH збільшується в печінці (119,8%), тонкому кишечнику (154,8%) і мозку (175,1%). За умови уведення тільки НК слід зазначити, що істотно змінювався вміст суми NAD+NADP в мозку (на 80,0%), печінці (на 59,0%), тонкому кишечнику (на 46,0%), нирках (на 30,6%) відносно контролю, оскільки істотних змін рівня NADH+NADPH не виявлено. До того ж, висока інтенсивність синтезу нікотинурової кислоти була фіксована у всіх тканинах і тільки в другій групі. Вміст НК істотно не змінюється у всіх дослідних групах.

Вивчення метаболізму НК за дії радіаційного опромінювання набуває важливого значення в плані подальших досліджень можливості застосування коензимних форм вітамінів з метою регуляції метаболізму за різних патологічних станів.

ОКСИД АЗОТУ ЯК МОЖЛИВИЙ РЕГУЛЯТОР ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МІТОХОНДРІЙ

КОЛОМІЄЦЬ О. В., ДАНИЛОВИЧ Ю. В., ДАНИЛОВИЧ Г. В.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua*

Оксид азоту (NO) має домінуюче значення в процесах контролю Ca^{2+} -залежної скоротливої активності гладеньких м'язів. Загальновідома роль мітохондрій (MX) в регуляції Ca^{2+} -гомеостазу в гладеньком'язових клітинах. В основі підтримання оптимальної концентрації Ca^{2+} в MX лежить узгоджене функціонування систем енергозалежної акумуляції катіона та його вивільнення з матрикса в цитозоль. Величина електричного потенціалу на внутрішній мембрані MX є важливою характеристикою органел, які контролюють роботу локалізованих в них катіон-транспортивальних систем, у тому числі і тих, які забезпечують трансмембранний обмін Ca^{2+} . Хоча MX є потенційною мішенню дії NO завдяки наявності гемових груп та залізо-сірчаних центрів у складі їхніх ензимів, його вплив на Ca^{2+} -транспортивальні системи та трансмембранний потенціал MX гладеньком'язових клітин залишається недостатньо вивченим.

Метою роботи було дослідити дію донорів NO (нітрозактивних сполук), а саме 100 мкМ нітропрусиду натрію (SNP) та нітриту натрію (SN), на системи трансмембранного обміну Ca^{2+} в ізольованих MX та поляризацію їхньої внутрішньої мембрани в клітинах міометрія. MX були охарактеризовані за допомогою фотонної кореляційної спектроскопії, електронної мікроскопії та функціональних тестів.

Досліджено вплив SNP та SN на енергозалежний транспорт Ca^{2+} в ізольовані MX міометрія щурів. Зміни концентрації Ca^{2+} в матриксі MX оцінювали за допомогою методу спектрофлуориметрії та Ca^{2+} -чутливого зонда Fluo-4 AM (2 мкМ). Доведено, що Mg-АТФ-залежна акумуляція Ca^{2+} MX за наявності сукцинату значно стимулюється нітрозактивними сполуками, зокрема SNP посилює транспортний процес в 1,6 раза відносно контролю. Ефект нітрозактивних сполук стає значущим лише за умови попередньої інкубації з ними MX (15 хв). Оскільки акумуляція Ca^{2+} в присутності SNP ефективно пригнічується протонатором CCCP та рутенієвим червоним (10 мкМ), дійшли висновку про стимуляцію нітрозактивними сполуками Ca^{2+} -уніпортеру внутрішньої мембрани MX. Акумулювальна здатність органел, стимульована SNP, виявляється нечутливою до дії специфічного інгібітору пори перехідної провідності циклоспорину (5 мкМ). Це вказує на те, що активність пори перехідної провідності істотно не впливає на транспорт Ca^{2+} в MX за умови дії на них нітрозактивних сполук. Таким чином, оксид азоту може брати участь у регуляції процесів енергозалежної акумуляції Ca^{2+} -уніпортером MX.

За дослідження впливу SNP та SN на H^+/Ca^{2+} -обмінник МХ, який забезпечує процес вивільнення Ca^{2+} з матриксу в міоплазму, встановлено, що досліджувана транспортна система абсолютно резистентна до дії нітрозактивних сполук.

Із застосуванням методу лазерної конфокальної мікроскопії продемонстровано колокалізацію специфічних щодо МХ флуоресцентних зондів MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, 10 – nonyl acridine orange та потенціалчутливого флуоресцентного зонда 3,3'-dihexyloxycarbocyanine (DiOC₆(3)). Показано, що SNP спричинює гасіння флуоресценції DiOC₆(3) в концентрації 100 нМ, що свідчить про помірне зниження (~17%) трансмембранного потенціалу внутрішньої мембрани МХ. Це спостереження підтверджується методом протокової цитофлуориметрії. Ефективність дії SN в аналогічній концентрації істотно нижча за дію SNP. Помірне зниження потенціалу МХ може відображати протекторну дію NO щодо надмірної продукції активних форм кисню внаслідок функціонування електрон-транспортного ланцюга.

Отже, під впливом донорів NO спостерігається посилення енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в МХ міометрія, що не пов'язане зі зміною їхнього мембранного потенціалу. За цих умов, посилення акумуляції Ca^{2+} з міоплазми та помірне зниження трансмембранного потенціалу МХ можуть мати адаптивне значення.

Автори висловлюють подяку чл.-кор. НАНУ, д.б.н., професору Костерину С. О. за наукову дискусію.

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «АПІБАКТ®» НА ПРОДУКЦІЮ ІНТЕРФЕРОНУ ТА 2',5'-ОЛІГОАДЕНІЛАТ-СИНТЕТАЗНУ АКТИВНІСТЬ ЛІМФОЦИТІВ СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ІЗ ГІПОАЦИДНІСТЮ ШЛУНКОВОГО СОКУ, СПРИЧИНЕНОЮ ОМЕПРАЗОЛОМ

*КОМПАНЕЦЬ І. В., КОРОТКИЙ О. Г., КАРПОВЕЦЬ Т. П.,
ГРЕБІНИК Д. М., БЕРЕГОВА Т. В.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології», Україна;
e-mail: i_kompanets@mail.ua*

Дія препаратів, інгібіторів протонної помпи, спричинює стан шлункової гіпоацидності. При цьому у ШКТ розвивається дисбіоз і запалення, що посилює ризик виникнення ракових пухлин. Із метою корекції складу мікрофлори ШКТ звертає увагу мультипробіотик «Апібакт®» (АПІ). Він складається з 14 штамів пробіотичних бактерій і містить екстракт прополісу. Метою роботи було вивчити продукцію інтерферону (ІФН) та активність індукованого ним ензиму – 2',5'-олігоаденілат-синтетази (2',5'-ОАС) в лімфоїдних клітинах селезінки щурів за введення ним мультипробіотика АПІ на тлі спровокованої омепразолом (ОМ) шлункової гіпоацидності.

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах, яких було розподілено на 3 групи. Тварини 1-ї групи були контролем, тваринам 2-ї групи внутрішньочеревинно вводили омепразол (Sigma, США) в дозі 14 мг на кг маси упродовж 28 днів, тваринам 3-ї групи сумісно вводили омепразол і АПІ (виробництва ТОВ «О.Д. Пролісок») у дозі 0,14 мл/кг.

Показано, що 28 денне введення ОМ збільшує титр ІФН у супернатантах клітинних культур спленоцитів на 32% відносно контролю. При цьому продукція ІФН спленоцитами у відповідь на його індуктори (ФГА і циклоферон) *in vitro* посилюється порівняно з такою для лімфоцитів тварин контрольної групи. Сумісне введення ОМ і АПІ незначно змінює титр ІФН (на 8%) порівняно із тваринами, яким вводили тільки ОМ. Мультипробіотик АПІ посилює продукцію ІФН спленоцитами у відповідь на ФГА і циклоферон *in vitro* відносно такої для спленоцитів тварин, що отримували лише ОМ. Показано, що активність у спленоцитах тварин за введення ОМ статистично вірогідно не змінюється відносно контролю. Дія ФГА і циклоферону посилює активність ензиму відносно такої в

лімфоцитах тварин контрольної групи. Сумісна дія ОМ і АПІ не впливає на ензиматичну активність у нестимульованих клітинах, проте посилює її в клітинах, оброблених індукторами ІФН.

Отже, за шлункової гіпоацидності, зумовленої ОМ, посилюється продукція ІФН лімфоцитами щурів, що не супроводжується збільшенням в них активності 2',5'-ОАС. Це може бути проявом реакції лімфоїдних клітин на запальний процес у ШКТ на тлі дисбіозу. Мультипробіотик АПІ, введений тваринам із гіпоацидністю, посилює як продукцію ІФН, так і 2',5'-ОАС активність у відповідь на індуктори ІФН *in vitro*. Ймовірно, цей препарат збільшує здатність лімфоцитів селезінки до синтезу ІФН за дії зовнішніх стимулів, що може реалізуватися через активацію системи 2',5'-олігоаденілату. Таким чином, встановлено, що мультипробіотик АПІ виявляє імуномодулюючі властивості.

СТАН ГЛУТАТІОНОВОЇ СИСТЕМИ КЛІТИН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА НИЗЬКОПРОТЕЇНОВОГО РАЦІОНУ ТА ГОСТРОГО ГЕПАТОТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ

КОПИЛЬЧУК Г. П., БУЧКОВСЬКА І. М.

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

Аліментарні порушення обміну протеїнів, пов'язані з недостатністю, одноманітністю, дефіцитом або домінуванням окремих амінокислот, відіграють важливу роль у формуванні різних патологій та визначають особливості їх перебігу. Досить часто нераціональне харчування, дисбаланс вітамінів та амінокислот призводять до розвитку гострих або хронічних поліетіологічних захворювань печінки.

Глутатіонова система відіграє провідну роль у реалізації антирадикального та антипероксидного захисту клітин. Узгоджена дія всіх її компонентів (відновленого глутатіону, глутатіонпероксидази, глутатіон-S-трансферази та глутатіоредуктази) сприяє встановленню оптимального рівня пероксидних сполук і збереженню антиоксидантного гомеостазу.

Метою роботи було дослідити глутатіонтрансферазну (ГТ, 2.5.1.18) та глутатіонпероксидазну (ГП, 1.11.1.9) активність в клітинах печінки щурів за низькопротеїнового раціону та ацетамінофеніндукованої гепатотоксичності.

Результати досліджень показали, що в умовах моделювання ацетамінофеніндукованого ураження печінки на фоні протеїнової недостатності в цитозольній фракції спостерігається зниження активності глутатіон-S-трансферази порівняно з показниками контролю, що, з одного боку, може бути пов'язано з недостатністю амінокислот для синтезу поліпептидних ланцюгів ензиму, а, з іншого, відбувається внаслідок порушення процесів кон'югації шляхом утворення активного метаболіту ацетамінофену – *N*-ацетил-*p*-бензохіноніміну.

Водночас синергічна дія двох несприятливих факторів – аліментарної депривації протеїну та розвитку гепатотоксичності супроводжується вірогідним зменшенням у клітинах печінки вмісту відновленого глутатіону (GSH) порівняно з контролем. Вірогідно зменшення вмісту GSH за цих експериментальних умов пов'язано з його частковим розпадом задля вилучення амінокислот із подальшим використанням їх для синтезу тканинних протеїнів або обумовлено формуванням ковалентних зв'язків між цистеїном глутатіону та *N*-ацетил-*p*-бензохінонаміном. Коли запаси глутатіону виснажуються, метаболіти ацетамінофену арилюють нуклеофільні макромолекули, необхідні для життєдіяльності гепатоцитів, спричинюючи, таким чином, некроз клітин печінки.

Щодо глутатіонпероксидазної активності нами відмічено зниження активності ензиму в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки в умовах протеїнової недостатності та гострого гепатотоксичного ураження. Можна припустити, що зниження активності ГП в клітинах печінки тварин, яким вводили токсичні дози ацетамінофену на фоні аліментарної депривації протеїну, порівняно з показниками контролю відбувається внаслідок окислення селену вільнорадикальними метаболітами, що призводить до сповільнення включення мікроелемента до активного центру ензиму

та, як наслідок, зниження його антиоксидантних властивостей. Окрім того, відомо, що за рахунок циркулюючого в плазмі протеїну, який переносить значну частину селену, активність ГП підтримується на певному стаціонарному рівні. Вірогідно, нестача протеїну в харчовому раціоні супроводжується порушенням утворення протеїнів плазми для транспорту селену, що, в свою чергу, виступає модулюючим чинником зниження активності ГП.

Отже, в умовах протеїнової недостатності та гострого гепатотоксичного ураження відбувається порушення функціонування глутатіонової системи, що характеризується зниженням глутатіон-S-трансферазної та глутатіонпероксидазної активності в клітинах печінки тварин.

РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМІВ І ЛІПІДІВ В АДАПТИВНИХ РЕАКЦІЯХ РОСЛИН САЛАТУ СІЙНОГО (*Lactuca sativa* L.) ЗА ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ

КОСИК О. І., ХОМЕНКО І. М., БАБУШКІНА О. О.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології», Україна;
e-mail: o_kosyk@ukr.net*

Кадмій – дуже небезпечний для живих організмів важкий метал, який стоїть в ряду найрозповсюдженіших забруднювачів навколишнього середовища. Він надзвичайно токсичний – легко надходить через корені та атмосферу. У зв'язку зі зростанням забруднення довкілля важкими металами вивчення їх дії на рослини та їх адаптаційні процеси стає все актуальнішим. Головним наслідком впливу важких металів на рослину є поява активних форм кисню, що призводить до пероксидного окислення біополімерів. Тому метою нашого дослідження було дослідити активність пероксидази та зміни вмісту сфінголіпідів як захисних ланок ліпідної фракції рослинної клітини за дії іонів кадмію.

Матеріалом для дослідження були обрані рослини салату *Lactuca sativa* L. сорту Лоло зелений головчастий, одномісячні проростки якого піддавали дії іонів кадмію в концентрації 10^{-4} М. Рослинні зразки відбирали на 1-шу, 7-му та 14-ту добу від початку експозиції. Активність пероксидази визначали за Бояркіним. Екстракцію ліпідів проводили за методикою Зіла і Хармона в модифікації Яковенко та Міхно. Сфінголіпіди екстрагували методом Азмена. Розділення ліпідів проводили методом тонкошарової хроматографії.

Пероксидаза є широко розповсюдженим рослинним ферментом, активність якого підвищується в умовах стресу. Цей фермент нейтралізує надмірне накопичення реакційноздатного пероксиду водню, який зумовлює порушення цілісності біомембран шляхом окислення ліпідної фракції і створює, таким чином, інтенсивний антиоксидантний захист рослинної клітини в умовах кадмієвого стресу. За одержаними результатами на першу добу впливу кадмію нами виявлено спад активності пероксидази в дослідних рослин на 25% порівняно з контролем. Після двотижневої експозиції зафіксовано зниження загального вмісту протеїну з одночасним зростанням активності пероксидази, що може свідчити про негативний вплив іонів кадмію на біосинтетичні процеси рослинної клітини. Одержані дані узгоджуються з рівнем накопичення сфінголіпідів та вказують на високу активність інших ланок антиоксидантного захисту рослинної клітини, що перешкоджають утворенню пероксиду водню.

Сфінголіпіди – міnorні компоненти загального ліпідного екстракту рослин, які присутні у складі плазматичної мембрани і тонопласту. На сьогодні не існує загальноприйнятої методики виділення та ідентифікації рослинних сфінголіпідів. Нами було адаптовано методику та підібрано оптимальні розчинники і проявники для виділення та ідентифікації сфінголіпідів у загальному ліпідному екстракті. Аналіз вмісту сфінголіпідів виявив зворотну залежність між часом експозиції кадмієм та вмістом керамідів.

Одержані нами результати засвідчують зростання вмісту сфінголіпідів у дослідних варіантах на першу добу експозиції, а після двох тижнів кадмієвого стресу їх кількість знижується на 25%

порівняно з контролем. Збільшення сфінголіпідів за надходження іонів кадмію, імовірно, пов'язане із включенням каскадів сигнальних реакцій і синтезом вторинних месенджерів, таких як цереброзиди. При довготривалому кадмієвому стресі відбувається порушення процесів синтезу, що призводить до зниження вмісту сфінголіпідів на подальших етапах експозиції.

Отже, одержані дані дозволяють оцінити роль пероксидази та сфінголіпідів як сигнальних ланок порушення гомеостазу рослинної клітини за дії іонів кадмію.

КАТАБОЛІЗМ КоА В ЕРИТРОЦИТАХ БІЛИХ ЩУРІВ

КРАВЧУК І. О., ТУРОВСЬКА О. С., САЛЬНИКОВА Н. В., ПЕТРОВ С. А.

*Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, Україна;
e-mail: sergey_1951@ukr.net*

Метаболізм пантотенової кислоти від вітаміну до КоА добре вивчений. Відомі ензими, які беруть участь у цьому процесі, а також основні механізми регуляції цих реакцій. Але катаболізм коензиму ацилювання в тканинах тварин і людини майже невивчений.

Метою роботи було вивчити інтенсивність розпаду КоА до пантотенової і 4-фосфопантотенової кислоти в еритроцитах білих щурів. Кількість КоА, пантотенату і 4-фосфопантотенату визначали за допомогою колоночної хроматографії.

Внаслідок проведених нами дослідів встановлено, що інкубація еритроцитів з фізіологічною кількістю КоА призводить до деструкції цього коензиму до 4-фосфопантотенату протягом перших 15–30 хв.

Кількість утвореного 4-фосфопантотенату пропорційно залежить від вихідної концентрації КоА в інкубаційному середовищі. 4-Фосфопантотенат перетворюється в пантотенову кислоту значно повільніше. Цей процес практично не залежить від вихідної концентрації КоА в інкубаційному середовищі.

Таким чином, наші дослідження свідчать, що в еритроцитах існують ензиматичні системи, здатні швидко перетворювати КоА до 4-фосфопантотенату. Дефосфорилювання цієї сполуки відбувається значно повільніше.

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *PPP1R15A*, *GADD45B*, *DDIT1* ТА *DDIT3* В КЛІТИНАХ ГЛЮМИ З ПРИГНІЧЕНОЮ АКТИВНІСТЮ ERN1 ЗА ГІПОКСІЇ

КРИВДЮК І. В., ДАНИЛОВСЬКИЙ С. В., МІНЧЕНКО Д. О.

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

Фактори родини GADD (growth arrest and DNA-damage-inducible), зокрема такі як PPP1R15A (protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A, відомий ще як GADD34), GADD45B (відомий ще як MyD118), DDIT1 (DNA damage-inducible transcript 1 protein, відомий ще як GADD45A), та DDIT3 (відомий ще як GADD153 або СНОР (ССААТ/enhancer-binding protein homologous protein)), відіграють важливу роль у регуляції процесів проліферації та апоптозу, контролюють ріст злоякісних пухлин. Характерною особливістю злоякісного росту є активація сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума. Відомо, що головним сенсорно-сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулума є ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1), який контролює процеси проліферації клітин та неоваскуляризації пухлин, причому пригнічення функції ERN1, що виявляє ензиматич-

ну активність (протеїнкіназу та ендорибонуклеазу), блокує процеси ангіогенезу і проліферації та знижує інтенсивність росту гліоми. У зв'язку з цим, було проведено дослідження експресії генів родини *GADD* у клітинах гліоми за умов виключення ензиматичної активності, як протеїнкіназної, так і ендорибонуклеазної, цього сенсорно-сигнального ензиму або лише його ендорибонуклеазної активності з метою розкрити деякі сторони молекулярних механізмів, за якими відбувається пригнічення проліферації клітин гліоми за відсутності функціональної активності сигнального шляху ERN1.

Встановлено, що блокада ERN1-опосередкованого сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула призводить до значного збільшення рівня експресії гена *GADD45B* у клітинах гліоми лінії U87, але знижує рівень експресії генів *PPP1R15A*, *DDIT1* та *DDIT3*. В той же час, блокада лише ендорибонуклеазної активності сигнального ензиму ERN1 не змінює істотно рівень експресії гена *PPP1R15A*, збільшує рівень експресії генів *GADD45B* та *DDIT1* та знижує рівень експресії гена *DDIT3* в клітинах гліоми. Результати цих досліджень вказують на те, що експресія гена *PPP1R15A* контролюється переважно протеїнкіназною активністю ERN1, а генів *GADD45B*, *DDIT1* та *DDIT3* як протеїнкіназною, так і ендорибонуклеазною активністю ERN1. Встановлено також, що гіпоксія виражено посилює експресію генів *PPP1R15A*, *GADD45B* та *DDIT3* і значно меншою мірою гена *DDIT1* в обох типах клітин гліоми, але пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 посилює ефект гіпоксії на рівень експресії генів *PPP1R15A*, *DDIT1* та *DDIT3*. Водночас, ефект гіпоксії на рівень експресії гена *GADD45B* істотно знижується за пригнічення ензиматичної активності ERN1, як протеїнкіназної, так і ендорибонуклеазної.

Таким чином, результати роботи свідчать про залежність рівня експресії генів *PPP1R15A*, *DDIT1*, *GADD45B* та *DDIT3* у клітинах гліоми лінії U87 від сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1 та гіпоксії, причому вираженість ефекту гіпоксії є різною для різних генів й істотно змінюється за пригнічення протеїнкіназної і ендорибонуклеазної активності цього сигнального ензиму.

ЕКСПРЕСІЯ ПРО- ТА АНТИАНГІОГЕННИХ ГЕНІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛЮДИНИ U87 ЗА ПРИГНІЧЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ERN1

КУБАЙЧУК К. І., МІНЧЕНКО О. Г.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
katrissa@ukr.net*

Стрес ендоплазматичного ретикулула та гіпоксія є обов'язковими компонентами росту злоякісних пухлин і вони грають важливу роль в активації ангіогенезу. Сенсорно-сигнальний ензим стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1/IRE-1 α є інтегральною частиною ендоплазматичного ретикулула, який контролює експресію великої групи генів, відповідальних за процеси проліферації та виживання пухлинних клітин, а також процесів ангіогенезу. Відомо, що блокування функції цього сигнального ензиму має протипухлинний ефект внаслідок пригнічення цих процесів.

Метою нашого дослідження було вивчити рівень експресії генів, які беруть участь в регуляції ангіогенезу, в клітинах гліоми людини лінії U87 із пригніченою функцією ERN1 за умов нормоксії і гіпоксії, а також виявити можливі взаємозв'язки між сигнальним ензимом ERN1, гіпоксією та експресією генів, що контролюють ангіогенез.

Гіпоксію створювали в спеціальному інкубаторі із 3% кисню і 5% вуглекислого газу. Рівень експресії генів у клітинах вимірювали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Об'єктом дослідження були гени тканинного інгібітору матричної металопротеїнази-2 і -3 (*TIMP2* і *TIMP3*), TSR-вмістних протеїнів тромбоспону-1 і -2 (*THBS1* і *THBS2*), мозкового інгібітору ангіогенезу 2 (*BAI2*), фактора росту сполучної тканини (*CTGF*) та членів родини EGF – епірегуліну

(*EREG*), подібного до EGF гепаринзв'язуючого фактора росту (*HB-EGF*) та їхнього рецептора (*EGFR*), що мають як антиангіогенні, так і проангіогенні властивості. Встановлено, що блокування функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми збільшує рівень експресії мРНК таких анти-ангіогенних факторів як *TIMP2*, *TIMP3*, *THBS1*, *THBS2* та *BAI2*. У той самий час, пригнічення функції ERN1 спричинює значне зниження рівня експресії таких проангіогенних генів як *EREG*, *HB-EGF* і *EGFR*. Також показано, що гіпоксія підсилює експресію генів *TIMP2*, *TIMP3*, *THBS1*, *THBS2* та *BAI2* у клітинах гліоми з функціонально активним ERN1, причому ефект гіпоксії на рівень експресії цих генів змінюється в умовах пригнічення функції ERN1, за винятком гена *TIMP3*. Гіпоксія зумовлює зниження рівня експресії проангіогенних генів *EREG*, *HB-EGF* як у клітинах з пригніченою функціональною активністю ERN1, так і у контрольних клітинах. Водночас рівень експресії мРНК *EGFR* в умовах гіпоксії, навпаки, підвищується в обох типах гліомних клітин.

Таким чином, рівень експресії генів, які контролюють процеси ангіогенезу і росту пухлин залежить від функціональної активності ERN1 і рівня кисню, оскільки пригнічення функціональної активності ERN1 посилює експресію генів антиангіогенних факторів, причому ефект гіпоксії на рівень експресії більшості досліджуваних генів зменшується або зникає в цих експериментальних умовах.

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВПЛИВУ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ТА РОЗЧИННОЇ ФОРМИ ЦИСПЛАТИНУ НА СТАН ПЕЧІНКИ

КУЛІНІЧ О. С., ДЬОМШИНА О. О., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: kulinich.es@gmail.com*

Цис-діаміндихлорплатинум (II), або цисплатин, є одним з найактивніших препаратів для лікування в людей новоутворень будь-якої локалізації та гістогенезу [Levi, 1980, Townesend, 2003]. Відомо, що ліпосомальна форма цисплатину є ефективнішою і водночас менш токсичною [Носко, 2008]. Проте, детальних досліджень біохімічних характеристик печінки за введення розчину та ліпосомальної форми цисплатину не проводилося. Отже, метою роботи було порівняти вплив розчину та ліпосомальної форми цисплатину на стан печінки в моделі пухлинного росту.

Роботу виконано на моделі карциноми Герена в щурів. Введення цисплатину в розчині та ліпосомальній формі проводили за [Shtemenko, 2007; Кулініч, 2013]. Об'єктом дослідження було обрано аланін- та аспартатамінотрансферази (АсАТ та АлАТ), гамаглутамілтранспептидазу (ГГТП), лактатдегідрогеназу (ЛДГ), концентрація відновленого глутатіону, а також рівень ТБК-активних продуктів; дослідження проводили в гомогенаті печінки щурів за загальновідомими методами.

Встановлено, що розвиток новоутворення і введення цисплатину (сРt) в розчинній формі зумовлювали явище гіперензимемії, тобто збільшення активності ензимів, як у плазмі крові, так і в тканині печінки. Відбувається зростання активності ензимів у плазмі крові щурів: АсАТ у 4 рази, АлАТ у 5 разів, ЛДГ у 8 разів, ГГТП у 5 разів у плазмі крові порівняно з контролем. Одержані нами результати підтверджують гепатотоксичність сРt та спричинений введенням цього препарату цитоліз гепатоцитів. Введення цисплатину в наноліпосомній формі (сРtнл) призводить до зниження активності діагностичних ензимів: АсАТ – у 2,4 раза, АлАТ – у 3 рази, ЛДГ – у 9 разів, ГГТП – у 3 рази порівняно з групою щурів, яким вводили сРt. Ці дані підтверджують зниження токсичності лікарських засобів у разі використання їх ліпосомальних форм, що також справедливо й для сРtнл. Проте слід відмітити, що активність більшості діагностичних ензимів не досягає рівня контролю, що може свідчити про неповний захист клітин печінки за застосування наноліпосом. Для детальніших порівняльних досліджень у цих експериментах вивчали біохімічні характеристики тканини ізольованої печінки. За введення сРt активність ензимів збільшується в середньому у 2,5 раза порівняно з контрольною групою. За введення сРtнл активність АсАТ, АлАТ, ЛДГ і ГГТП знижується майже до рівня нор-

ми. Розвиток новоутворення зумовлює значне підвищення (майже у 7 разів) інтенсивності процесу пероксидного окислення ліпідів. Введення cPt, не зважаючи на гальмування росту пухлини, також сприяє інтенсивності процесу пероксидного окислення ліпідів та порушення мембран печінки, що вважається однією з причин гепатотоксичності cPt [Івчук В. В., Shtemenko N. I., 2011]. Введення cPtнл знижує токсичний ефект цисплатину, але зниження до рівня норми не спостерігається. Дослідження активності ензимів глутатіонової системи захисту тканини експериментальних тварин також свідчать про негативний вплив введення cPtнл.

Одержані дані дають змогу дійти висновку про те, що застосування ліпосомальної форми цисплатину неповністю знижує токсичний ефект протипухлинного препарату на клітини печінки, хоча його токсичність є менш вираженою. Це можна пояснити зміненою фармакодинамікою ліпосомальних препаратів (Кулик Г. И., 2009), що призводить до більшого накопичення ліків у пухлині та меншого – в печінці. Одним із актуальних напрямів подолання такого токсичного впливу є впровадження комбінаційної протиракової терапії із застосуванням антиоксидантів.

ИЗМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА ТКАНИ СЕРДЦА ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ СТИМУЛИРОВАННОГО ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

ЛАХАЙ Д. А., ШВЕЦ В. Н.

*Запорожский государственный медицинский университет, Украина;
e-mail: talazap@i.ua*

Характерной чертой старения является снижение адаптации организма к действию повреждающих факторов стресса. Однако молекулярные механизмы данного феномена все окончательно не изучены. Данные литературы указывают на то, что свободнорадикальные процессы играют значительную роль в патогенезе стрессового повреждения клеток. Изменение чувствительности тканей к их инициации может оказывать существенное влияние на устойчивость организма к стрессу и формирование адаптивных реакций. Учитывая это, целью настоящей работы было изучение фосфолипидного спектра гомогенатов тканей сердца взрослых и старых крыс, а также характера его модуляции при иммобилизационном стрессе и в условиях стимуляции индуцированного пероксидного окисления липидов (ПОЛ).

В работе использовали 40 крыс-самцов линии Вистар. Животные были поделены на две группы: взрослые (10–12 месяцев) и старые (22–25 месяцев). Крысы обеих возрастных групп делили на две подгруппы: 1) интактные и 2) крысы, подвергнутые иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 30 минут. Животных декапитировали, извлекали сердце, выделяли миокард левого желудочка, из которого готовили 10% гомогенаты. Приготовленные гомогенаты делили на 2 части. Одну из них использовали для исследования фосфолипидной структуры, а другую для определения фосфолипидного состава после предварительной инкубации в реакционной смеси, содержащей систему для стимуляции NADPH–зависимого ПОЛ. Полученные данные подвергли статистической обработке.

Проведенные исследования показали, что концентрация лизофосфатидилхолина и фосфатидилхолина в миокарде старых животных превышает их величину в сердце взрослых крыс. При стрессе сердечной мышцы у животных обеих возрастных групп происходит снижение соотношения фосфолипиды/протеин, уменьшение в фосфолипидном спектре фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также увеличение лизофосфатидилхолина и фракции, содержащей в своем составе фосфатидилсерин. Возрастные различия при этом проявляются в количественном изменении фосфолипидной структуры миокарда.

Можно предположить, что базальные возрастные различия в структуре фосфолипидного спектра миокарда предопределяют изменение чувствительности липидного бислоя мембран кардиомиоцитов взрослых и старых крыс к действию повреждающих внешних факторов. Для проверки данного положения были изучены особенности модификации фосфолипидного состава миокарда в ответ на стимуляцию ПОЛ. Проведенные исследования позволили выявить существование возрастных особенностей со стороны изменения фосфолипидной структуры кардиомиоцитов в условиях стимуляции ПОЛ в экспериментах *in vitro*. По всей вероятности, модификация фосфолипидного состава гомогенатов ткани сердца, возникающая в условиях индуцированного ПОЛ, имеет характер приспособительной реакции.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что стресс сопровождается появлением метаболических сдвигов в сердце, направленных на ограничение чувствительности миокарда к инициации цепных свободнорадикальных процессов. В их основе лежит уменьшение доли фосфолипидов с ненасыщенной структурой в фосфолипидном спектре мембран клеток миокарда. В большей мере данный механизм проявляется у старых, чем у взрослых животных.

ВПЛИВ СЕРОТОНІНУ НА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЖОВЧІ ЩУРІВ

*ЛЕВАДЯНСЬКА Ю. А., АТАМНАХ САЛАХ, ВЕСЕЛЬСЬКИЙ С. П.,
РЕШЕТНИК Є. М., ЯНЧУК П. І.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології», Україна;
e-mail: julia6021@gmail.com*

Серотонін характеризується широким спектром регуляторних ефектів, важливим з яких є його дія на секреторні процеси в травній системі. Однак немає вичерпної інформації щодо його впливу на склад травних секретів, передусім жовчі. Співвідношення специфічних компонентів жовчі – жовчних кислот і холестеролу – відображає її фізико-хімічні властивості та дозволяє мати уявлення про синтетичні, дезінтоксикаційні процеси в печінці та літогенність її секрету. А це, в свою чергу, є важливим із практичної точки зору для дослідження патогенезу захворювань гепато-біліарної системи.

Метою роботи було дослідити вплив серотоніну на фізико-хімічні характеристики жовчі за розрахунками коефіцієнтів кон'югації і гідроксилювання, індексу літогенності та співвідношення глікокон'югатів і таурокон'югатів жовчних кислот.

Для досягнення поставленої мети досліджували властивості жовчі щурів ($n = 14$), зібраної 30-хвилинними пробами впродовж 3 год гострого експерименту. Після взяття проби № 1 (вихідний рівень секреції жовчі) внутрішньопортально вводили серотонін (10 мкг/кг). Надалі збирали 5 проб жовчі, біохімічні показники яких порівнювали з вихідним рівнем. Відповідно до визначених методом тонкошарової хроматографії значень концентрацій окремих фракцій жовчних кислот: таурохолевої (ТХК), таурохенодезоксихолевої і тауродезоксихолевої (ТХДХК+ГДХК), глікохолевої (ГХК), глікохенодезоксихолевої і глікодезоксихолевої (ГХДХК+ГДХК), холевої (ХК), хенодезоксихолевої і дезоксихолевої (ХДХК+ДХК) та холестеролу в жовчі щурів розраховували співвідношення кон'югованих холатів до вільних (коефіцієнт кон'югації), тригідроксихоланових до дигідроксихоланових жовчних кислот (коефіцієнт гідроксилювання), співвідношення суми холатів і холестеролу (індекс літогенності) та співвідношення глікокон'югатів жовчних кислот і таурокон'югатів. Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета Statistica 7.0 (Stat Soft, США). Оскільки розподіл даних не був нормальним, результати подано у вигляді медіани та нижнього і верхнього кuartилів.

Найвище значення коефіцієнта кон'югації (17,4 [14,0; 20,9]) зафіксовано у пробі, одержаній через 1,5 години після введення серотоніну, що на 48,7% ($P < 0,05$) більше, ніж вихідний рівень

(11,7[9,7; 13,0]). Статистично значущих змін коефіцієнта гідроксилювання і співвідношення гліко- до таурокон'югатів жовчних кислот не виявлено в жодній із проб жовчі, зібраної впродовж експерименту. Індекс літогенності після введення серотоніну вірогідно знижується порівняно з вихідним рівнем (19,7 [19,5; 20,3]), досягаючи свого мінімуму в пробі № 3 (18,3 [17,8; 19,6], $P < 0,05$).

Отже, одержані нами результати свідчать про те, що серотонін спричинює підвищення рівня активності ензиматичних систем, які забезпечують кон'югацію жовчних кислот і, відповідно, збільшують їх розчинність, однак не виявляє істотних ефектів на процеси гідроксилювання холатів у гепатоцитах. З огляду на відсутність статистично значущих змін у співвідношенні глікокон'югатів до таурокон'югатів можемо припустити, що серотонін не впливає на колоїдність жовчі, збільшуючи або зменшуючи в ній вміст жовчних кислот, кон'югованих із гліцином. Разом з тим, серотонін у застосованій дозі призводить до зростання літогенності жовчі, передусім, за рахунок збільшення вмісту в ній холестеролу. Таким чином, серотонін є регуляторним фактором, що може бути причетним до змін фізико-хімічних властивостей жовчі.

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ РАННЕГО
РЕАГИРОВАНИЯ C-FOS В НЕЙРОНАХ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ
КРЫС ПРИ ОСТРОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ И НА ФОНЕ
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ПРОИЗВОДНЫМ
КСАНТИНА – В-ΥR-2**

*ЛЕВИЧ С. В., АЛЕКСАНДРОВА Е. В., БЕЛЕНИЧЕВА О. И.,
ШКОДА А. С., МАКОЕД О. Б.*

*Запорожский государственный медицинский университет, Украина;
e-mail: rshlevas@gmail.com*

В последние годы отмечается рост распространённости сосудистых заболеваний, в том числе острых нарушений мозгового кровообращения, которые занимают 3 место в мире в структуре общей смертности населения. Ишемическое повреждение головного мозга сопровождается тяжёлыми неврологическими расстройствами, такими как нарушение когнитивных, моторных, вербальных и других функций ЦНС. При ишемическом поражении мозга в результате снижения мозгового кровотока происходит нарушение функции дыхательной цепи митохондрий и энергетического обмена, нарушение ионного гомеостаза клетки с повышением внутриклеточного содержания ионов кальция, активацией внутриклеточных энзимов, повышением синтеза NO, развитием оксидативного стресса, экспрессией генов, анокисической деполяризацией мембран и смертью клетки. Учитывая ключевую роль оксидативного стресса в повреждении нервной ткани в острейший период ишемического инсульта, актуальным является поиск потенциальных нейропротекторов в ряду соединений с ярко выраженными антиоксидантными свойствами. В этом аспекте внимание ученых привлекают производные ксантина – природного гетероцикла, обладающего широким спектром биологической активности.

Целью данного исследования являлось изучение нейропротективного эффекта нового производного ксантина В-ΥR-2 в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по влиянию на экспрессию генов раннего реагирования c-fos. Исследования проводили на белых крысах линии Vistar с использованием модели неполной глобальной ишемии головного мозга, которую воспроизводили путем двусторонней перевязки общих сонных артерий. Для определения интенсивности экспрессии генов раннего реагирования c-fos изготавливали серийные фронтальные 14-микронные гистологические срезы IV-V слоя сенсомоторной зоны коры головного мозга крыс.

В результате проведенных исследований было установлено, что в условиях острой ишемии головного мозга наблюдается снижение содержания протеина c-fos к 4-м суткам эксперимента. Начиная с 7-х суток экспериментальной ишемии, наблюдается постепенное восстановление количества c-fos в нейронах IV-V слоя сенсомоторной зоны коры с максимальным проявлением активности на 18-е

сутки. Однако и в эти сроки содержание c-fos остается низким. Изменение содержания c-fos в нейронах в разные сроки ишемии тесно связано с преобладанием типа гибели клеток. Так, увеличение содержания c-fos происходит на фоне преобладания гибели клеток по типу апоптоза, а снижение – к усилению гибели по типу некроза. В восстановительный период происходит адаптация клетки и переключение гибели с пути некроза на апоптоз. Введение антиоксидантов (В-YR-2, мексидол, тиотриазолин) увеличивает содержание протеина c-fos и, следовательно, уменьшает интенсивность некроза нейронов. Уменьшается не только процент, но и меняется морфологический тип гибели нейронов. Апоптотическая гибель клетки является оптимальным упорядоченным процессом прекращения жизнедеятельности клетки, при котором стабилизируются клеточные мембраны, содержимое клетки утилизируется путем образования апоптотических телец и их фагоцитоза, без развития воспалительной реакции. Таким образом, антиоксиданты оказывают нейропротективное действие в условиях ОНМК, что является экспериментальным обоснованием их дальнейшего изучения, а особое внимание заслуживает новое производное ксантина В-YR-2.

ИЗОТОПНЫЙ СОСТАВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ИНФОРМАЦИИ ОБ ИХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

ЛЫСЕНКО О. Б., ДЕМИХОВ Ю. Н., БОРИСОВА Н. М., КОЩЛЯКОВА Т. А.

ГУ «Институт геохимии окружающей среды НАН Украины», Киев;
e-mail: lysenko.ob@gmail.com

На протяжении более 10 лет под руководством академика НАНУ Э.В. Собоновича нами проводились экспериментальные работы совместно с ГУ «Институт геронтологии им. Д. Ф. Чеботарёва НАМН Украины», Институтом гематологии и трансфузиологии АМН Украины, Институтом ветеринарной медицины НААН, Научным центром радиационной медицины НАМН Украины по изучению изотопного состава различных компонентов растений, животных и человека. Метод основывается на существовании двух или более изотопов у большинства химических элементов, особенно у органогенных элементов (Н,С,Н,О) и на существовании различий изотопного состава: биогенного и абиогенного вещества; растений С3 (пшеница, свекла, фрукты и др.), С4 (кукуруза, сахарный тростник и др.) и основных составляющих пищи (белков, жиров и углеводов). Хорошо известно применение изотопного состава углерода для диагностики инфицирования микробом хеликобактер (*Helicobacter pylori*). Кроме того, за счет разного состава растений С3 и С4 в рационе людей изотопный состав углерода европейцев ($\delta^{13}\text{C} = -28 \div -21\%$) довольно существенно отличается от изотопного состава американцев ($\delta^{13}\text{C} = -19 \div -13\%$). Изучены особенности изотопного фракционирования органогенных химических элементов в живых организмах, в том числе и человека. Показано, что в живых организмах существует стратегическая связь между особенностями метаболических процессов, физиологическим состоянием организма и свойственным ему изотопным составом. Так, по данным изотопного состава водорода воды (Демихов, 2005) установлено, что период полувывода воды из организма человека составляет около 20 суток, из чего следует, что любая капля воды (либо еды) никогда полностью не выводится из организма. Изотопный гомеостаз человека обеспечивается выводом тяжелых изотопов водорода с мочой, а легких – с липидами сальных желез. Изучение изотопного состава углерода крови обнаружило увеличение тяжелых изотопов в крови кардиобольных (Лысенко, 2013). Различные ткани человека характеризуются разнородными соотношениями изотопов углерода: кровь является наиболее обогащенной $\delta^{13}\text{C}$ в то время как вилочковая железа – наиболее обедненной (разница составляет около 7‰); кость (карбонат кальция) обогащена $\delta^{13}\text{C}$ примерно на 10‰ больше по сравнению с мягкими тканями. Это дает основания предположить, что соотношения свойственных каждому организму изотопов химических элементов в разных его тканях можно назвать его «изотопной картой». Тем не менее, разные ткани характеризуются различной динамикой изотопных соотношений из-за разной

скорости метаболических процессов. Большое внимание изотопным соотношениям углерода в организме человека было уделено А. Ивлевым, который исследовал характер суточных кривых измерения изотопного состава углерода (ИСУ) выдыхаемого воздуха у людей в норме, при диабете и ожирении, зависимость ИСУ волос от состояния здоровья обследуемых, зависимость ИСУ в сыворотке крови от характера эндокринного заболевания, вариации ИСУ CO_2 выдыхаемого воздуха и мочевины мочи у здоровых людей, больных диабетом и лиц с ожирением. Диапазон суточных вариаций $\delta\text{C}13$ показал существенные различия изотопных сдвигов при различных гормональных метаболических состояниях. Сравнение изотопного состава водорода воды крови людей и коров обнаружило накопление в крови человека дейтерия относительно потребляемой геологической воды, в то время, как у коров в крови содержание изотопов водорода совпадает с их содержанием в геологической воде. Возможным объяснением такому различию, на наш взгляд, может быть различие в метаболизме человека и коровы. Влияние физиологии и метаболических процессов на изотопный состав живых организмов остается дискуссионным и требует дальнейшего изучения.

ІНГІБІТОР Ca^{2+} -ПОМПИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ – КАЛІКС[4]АРЕН С-90 СПРИЧИНЮЄ ЗМІНУ КОНЦЕНТРАЦІЇ Ca^{2+} У ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИНАХ МАТКИ

МАЗУР Ю. Ю., БЕКЛІЧ Т. О., ШКРАБАК О. А.

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

Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани (ПМ) виконує кілька важливих для клітин функцій. В першу чергу, після скорочення клітин вона знижує концентрацію цитоплазматичного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) до початкової концентрації. Окрім того, у стані спокою висока спорідненість до Ca^{2+} дозволяє помпі підтримувати $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на постійному рівні, незважаючи на стаціонарне базальне надходження Ca^{2+} до клітини внаслідок значного трансмембранного Ca^{2+} градієнта. Насамкінець, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ бере участь у формуванні сигнальних шляхів на основі локальних змін концентрації Ca^{2+} . Але, на жаль, дотепер відсутній низькомолекулярний специфічний, оборотний та високоафінний інгібітор цієї помпи. Однак раніше нами було показано, що на роль такого інгібітору цілком може претендувати калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил-(фенілсульфоніліміно)метіламіно-25,26,27,28-тетра-пропоксикалікс[4]арен), для якого властивий коефіцієнт інгібування ($I_{0,5}$), близький 20 мкМ.

Метою цієї роботи було дослідження закономірностей дії калікс[4]арену С-90 як на ензиматичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, так і на внутрішньоклітинний Ca^{2+} -гомеостаз в гладеньких м'язах матки.

Калікс[4]арени було синтезовано член-кор. НАНУ В. І. Кальченком та його колегами (ІОХ НАНУ). Визначення ензиматичної активності проводилося на мембранних везикулах міометрія свині шляхом вимірювання P_i , вивільненого внаслідок гідролізу АТР. Зміну $[\text{Ca}^{2+}]_i$ встановлювали на іммобілізованих на полі-L-лізині гладеньком'язових клітинах матки шурів за допомогою Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного зонда fluo-4 АМ на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі LSM 510 META. Навантаження клітин зондом проводили протягом 20 хв при кімнатній температурі, після чого клітини відцентрифугували від зонда, який не зайшов у клітини.

Встановлюючи роль функціональних груп (сульфоніламідинових) та власне калікс[4]аренової «чаші» (С-150) в інгібіторному впливі С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза ПМ вивчали вплив аналогів С-90, які відрізнялися за кількістю та розташуванням сульфониламідинових груп на верхньому вінці калікс[4]аренового макроциклу. За ефективністю зменшувати АТР-гідролазну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази калікс[4]арени (використані у концентрації 100 мкМ) можна розташувати в ряд (від найбільш ефективного до менш ефективного): С-90 (має 4 амідинові групи) – $I_{0,5} = 20,2 \pm 0,5$ мкМ, зменшує активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ на 74,9% відносно контрольного значення; С-716 (містить 2 дистальні амідинові

групи) – $I_{0,5} = 53,4 \pm 3,5$ мкМ, зменшує активність на 61,5%; С-772 (містить 2 латеральні амідінові групи) – $I_{0,5} = 168,3 \pm 21,1$ мкМ, зменшує активність на 45,6%; С-715 (має 4 вкорочені функціональні групи), зменшує активність лише на 30,7%, коефіцієнт напівінгібування не встановлено ($n = 5$, $M \pm m$). Отже, можна стверджувати, що у формуванні інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазу ПМ має значення сукупний ефект усіх просторово організованих 4 сульфоніламідінових залишків на верхньому вінці калікс[4]аренового макроциклу.

У дослідах із використанням конфокальної мікроскопії для дослідження відбиралися клітини з цілісною клітинною мембраною, що було встановлено за відсутністю відповіді на внесення 10 мкМ Ca^{2+} у середовище, та вираженою веретеноподібною формою. Внесення калікс[4]арену С-90 (20 мкМ) до клітин призводило до швидкого зростання флуоресцентної відповіді fluo-4, що вказує на збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у клітинах. Значний спалах флуоресценції fluo-4 супроводжувався незмінною локальною флуоресценцією барвника Hoechst, що є маркером ядра. Важливо відзначити, що протягом 1–1,5 хвилин флуоресценція зонда fluo-4 знижується до вихідного рівня. Це може вказувати на те, що у разі блокування Ca^{2+} -помпи ПМ калікс[4]ареном С-90 та за наступного підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, в оборотне зниження концентрації Ca^{2+} в міоцитах залучаються інші компенсаторні транспортні системи, які мають нижчий афінітет до Ca^{2+} , але вищу кальцієву ємність, ніж Ca^{2+} -помпа ПМ (наприклад, Na^+ , Ca^{2+} -обмінник ПМ, Ca^{2+} -уніпортер мітохондрій).

Автори висловлюють подяку член-кор. НАНУ С. О. Костеріну (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ) та член-кор. НАНУ В. І. Кальченку (ІОХ НАНУ) за обговорення експериментальних результатів.

БИОФЛАВОНОИДЫ – УНИВЕРСАЛЬНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ

МАКАРЕНКО О. А., ЛЕВИЦКИЙ А. П.

ГУ «Институт стоматологии НАМН Украины», Одесса;
e-mail: flavan@mail.ru

Биофлавоноиды (или Р-витаминные вещества) синтезируются исключительно высшими растениями и характеризуются широчайшим спектром биологического действия. Механизм капилляроукрепляющего, антиоксидического, спазмолитического, антистрессового, противовоспалительного, антигрибкового, антибактериального, противовирусного, антиатеросклеротического, противоязвенного, остеопротекторного, антиаллергического, антиканцерогенного, антиаритмического, антигипертензивного, иммуномодулирующего, нефропротекторного, эстрогеноподобного, гепатопротекторного, антидиабетического и антидисбиотического эффектов флавоноидов можно объяснить, главным образом, двумя основными свойствами этих соединений: антиоксидантным, т.е. подавлением активных форм кислорода (АФК) и способностью связываться с физиологически активными протеинами (энзимами, гормонами, рецепторами) с последующей модуляцией их активности. В связи с этим представляется важным использовать комплексный подход к исследованию влияния отдельного флавоноида на этапы генерации АФК, продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), активность провоспалительных энзимов (протеиназ, фосфолипазы A_2 (ФЛА₂) и определить вклад установленных механизмов в реализацию биологических эффектов флавоноидов.

Для осуществления поставленной задачи по показателю IC_{50} *in vitro* была определена способность 15 флавоноидов (синтетических стандартов и выделенных из растительного сырья) тормозить образование АФК, продуктов ПОЛ, ингибировать активность панкреатических протеиназ эластазы, трипсина, химотрипсина, микробной коллагеназы, лейкоцитарной эластазы и ФЛА₂ из пчелиного яда. Установлено, что антиколлагеназное действие флавоноидов обратно пропорционально, а антитрипсиновое и антифосфолипазное – прямо пропорционально их антиоксидантным свойствам. Так, наиболее активные антиоксиданты кверцетин и катехин не обладают или проявляют очень слабую (апигенин) антиколлагеназную активность наряду с присущей им высокой антитрипсиновой и антифосфолипаз-

ной активністю. Найбільш активний інгібітор колагенази і химотрипсина нарингенин є найслабшим антиоксидантом і інгібітором трипсина. При порівнянні активності глікозидних і агліконових форм флавононів встановлено: у аглікона гесперетина виражено в більшій ступені антиоксидантне діє, а у його глікозида гесперидина – антипротеїназне і хелатирує. Серед флавоноїдів, виділених з рослинного сировини активним антиоксидантом і одночасно інгібітором ФЛА₂ і колагенази виявився байкалін.

Таким чином, флавоноїди діють одночасно на антиоксидантне, антипротеїназне і антифосфоліпазне ланки метаболізму. Антиоксидантне і антиензимне діє здійснюється по комбінованому механізмі, який залежить від структури флавоноїдів. Кінетичними дослідженнями встановлено частково конкурентний тип інгібування флавоноїдами активності еластази і трипсина. Найактивнішими антиоксидантами і інгібіторами ферментів є байкалін, кверцетин і катехин. Різноманітність і неоднорідна ступінь проявлення біохімічних ефектів окремих флавоноїдів дозволяє зробити висновок, що для досягнення максимального біологічного ефекту необхідно використовувати природні рослинні композиції або штучно підібрані суміші флавоноїдів.

ВМІСТ РІЗНИХ ФОРМ ЖИРНИХ КИСЛОТ У СПЕРМАЛЬНІЙ ПЛАЗМІ ТА СПЕРМАТОЗОЇДАХ

МАКСИМЮК Г. В.

*Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького, Україна;
e-mail: mhanna.maksymjuk@gmail.com*

Функціональна активність сперматозоїдів безпосередньо пов'язана з їх життєздатністю у нативній та кріоконсервованій спермі. Значною мірою це залежить від багатьох факторів, зокрема від вмісту у системі «сперматозоїди–спермальна плазма» високомолекулярних карбонових жирних кислот (ЖК). Відомо, що конституційований на генному рівні якісний і кількісний склад органічних та неорганічних сполук сперми забезпечує захист клітин від переохолодження, сприяє збереженню цілісності й стійкості їхніх мембран, регулює водно-сольовий обмін та енергоутворюючі процеси, бере активну участь в ендогенному диханні. Необхідно зауважити, що структура будови молекул ЖК впливає на інтенсивність функціональних процесів, які перебігають у сперматозоїдах. Тому метою роботи було дослідження особливостей зв'язку складу ЖК (насичені, ненасичені, етерифіковані, неетерифіковані), довжини їх вуглеводного ланцюга та маси молекул із життєздатністю сперматозоїдів у спермі.

Досліджували еякуляти дев'яти бугаїв чорно-рябої породи віком 5–7 років. У їхній спермальній плазмі і сперматозоїдах, газохроматографічним апаратом «Chrom-5» визначали концентрацію різних форм ЖК. Для аналізу результатів досліджень використали показники концентрації насичених форм неоднакової довжини їх ланцюга (C_{12:0}...C_{22:0}) та маси молекул (200...340 од.), а також однакової довжини (C_{16:0} і C_{16:1}, C_{18:0} і C_{18:1}, C_{20:0} і C_{20:4}) ланцюга насичених і ненасичених та ненасичених ЖК – неоднакової маси молекул (254...312 од.). Статистичний аналіз результатів досліджень проводили за допомогою програми Microsoft Excel.

Особливістю гомеостазу ненасичених неетерифікованих та етерифікованих форм ЖК у спермальній плазмі щодо насичених є те, що середній показник концентрації ненасичених (14,17 мг%) неетерифікованих форм у 2,3 рази або на 57% вмісту більший, ніж насичених (6,39 мг%) неетерифікованих. Однак ця величина для відношень вмісту етерифікованих (10,31 проти 2,01 мг%) форм в 5 разів або на 80% вмісту більша. Це означає, що потреба їх вмісту в плазмі сперми високої якості – неоднакова.

У сперматозоїдах, на відміну від спермальної плазми, концентрація насичених і ненасичених форм ЖК (лауринова, міристинова, пальмітинова, стеаринова, арахідова, ліноленова) – вища, ніж

концентрація їх неетерифікованих форм. Можливо, що обернена до вмісту спермальної плазми, нерівноважність гомеостазу функціонально активних етерифікованих насичених (пентадеканова, бегенова) і ненасичених (пальмітоолеїнова, олеїнова, ліолева, арахідонова) форм ЖК у сперматозоїдах має зв'язок із тривалістю збереження життєздатності статевих клітин поза організмом самця (бугай).

Таким чином, визначені у спермальній плазмі і сперматозоїдах відношення показників концентрації ненасичених неетерифікованих (2 : 1 і 1 : 1) та етерифікованих (5 : 1 і 2 : 1) форм ЖК щодо насичених вказують на те, що статеві органи самців для продовження тривалості збереження функціональної повноцінності і життєздатності сперматозоїдів, формують у спермі високої якості їх нерівноважний гомеостаз.

ВЛИЯНИЕ N-БЕНЗОТИАЗОЛ-2-ИЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМИДА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА СИНТЕЗ S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА БАКТЕРИЯМИ

МАЛЯРЧИК И. О., ГАЛКИН Б. Н., ФИЛИППОВА Т. О.

*Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: igormal85@mail.ru*

Целью работы было оценить влияние производных N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида на синтез предшественника сигнальных молекул системы quorum sensing у бактерий – S-аденозилметионина (SAM).

Бактерии *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* и *Pseudomonas aeruginosa* культивировали в среде Гисса, содержащей 2% глюкозы, при 37 °С в течение 24 часов. По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием и определяли их сырую массу. SAM экстрагировали 1 М муравьиной кислотой в течение 1 часа при 4 °С. Содержание SAM определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследования проводили на жидкостном хроматографе «Gilson» (Франция).

Ранее нами было показано, N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид (соединение I) и его производные с нуклеофильными заместителями в фенильном кольце: Cl (II), F (III) и NO₂ (IV) ингибируют процессы, контролируемые системой межклеточной коммуникации (quorum sensing) у грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Экспрессия генов quorum sensing обеспечивается системой сигнальных молекул, имеющих разную химическую природу, причем для каждого вида бактерий характерен свой набор аутоиндукторов. В то же время, эти молекулы могут иметь сходное строение (например, ацилгомосеринлактоны у грамотрицательных бактерий) либо быть общими для грамотрицательных и грамположительных бактерий – так называемый аутоиндуктор 2 (АИ2). Ацилгомосеринлактоны и АИ2 синтезируются из общего предшественника – S-аденозилметионина.

Показано, что в контроле в клетках *S. aureus*, *S. enteritidis* и *P. aeruginosa* содержание SAM составляет 73,4 ± 5,2; 57,6 ± 4,1 и 62,5 ± 4,6 нмоль/г сырой массы соответственно. Производные N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида значительно снижают уровень S-аденозилметионина в клетках всех изученных микроорганизмов. При этом степень ингибирования напрямую зависит от концентраций изучаемых соединений. При концентрации 0,4 мкМ содержание SAM снижается на 15–24%. Ингибирующий эффект возрастает по мере увеличения концентраций N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида и его аналогов. В присутствии 80 мкМ данных соединений количество SAM в клетках *S. aureus*, *S. enteritidis* и *P. aeruginosa* уменьшается в 2–5,4 раза в зависимости от структуры аналога.

Одновременно для *P. aeruginosa* показано существенное снижение уровня основных аутоиндукторов ацилгомосеринлактоновой природы: N-(3-оксо-додеканоил)гомосеринлактона (3-оксо-C₁₂-АГЛ) и N-бутирил-гомосеринлактона (C₄-АГЛ).

Предполагается, что содержание SAM снижается в клетках бактерий за счет дефицита фолатов, синтез которых ингибируется аналогами сульфаниламидных препаратов.

ADAPTOGENIC ROLE OF LIPOFUSCIN GRANULES TRANSFORMATION AT THE ARACHNOID HONEYCOMB CELL SYSTEM UNDER FORCED COLD ACCLIMATION AND HIBERNATION

MARCHENKO V. S., MARCHENKO L. N., LUTSENKO D. G., KOVALENKO I. F.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv;
e-mail: marchik@list.ru*

Accumulation of lipofuscin (LF) granules in cells is increasingly positioned as a reaction of the cells in response to violation of energy processes (Efimov A. A., 2009). There are carotenoids and myoglobin, which carry out functions of intracellular O₂ store and LF granules in the presence of respiratory enzymes are capable to produce energy in hypoxic conditions. However, the growth of amount of the pigment indicates an irreversible pathology of cell membranes. Therefore the adaptogenic role of LF can be realized only if there is an effective cleaning system. In the brain this function is fulfilled by cerebrospinal fluid (CSF) (glymphatic) system, the effectiveness of which increases in NREM sleep (Nedergaard M. et al., 2013). Recently it was shown that continuous and intermittent cold exposure modified the depth and duration of sleep (Shylo O. V. et al., 2011). We hypothesized that hibernation and acclimation can also activate CSF system, in particular its arachnoid (aglymphatic) link that defined the purpose of this work.

Forced acclimation (FA) of golden hamsters and white rats was carried out by blowing with cold air (10 °C) (6 exposures per minute) for 15 minutes at the beginning of each 9 of daylight hours for 1-3 months. After FA the rats increased of their cold resistance and hamsters fell into a state of hibernation when they were placed into cold chamber (5 °C). Confocal biomicroscopy with fluorescent analysis was carried out using a microscope LSM META 510 through the trepanation hole which was made in the parietal bones of the skull and closed with cover glass. Electron microscopy and histochemistry analysis was performed using a microscope TEM 125K.

It is shown that under FA and hibernation there was characteristic transformations of the ultrastructure like “myelin figures” in the endoplasmic and mitochondrial reticulum, which led to the formation of LF granules. Under these conditions fluorescent analysis *in vivo* showed massive accumulation of LF in the arachnoid honeycomb cell system (AHS). The color of autoluminescence of arachnoendotelium changed from green to bright yellow and red-brown. In the fluorescence spectra of AHS except the emission bands of recovered pyridines (480 nm) and oxidized flavoproteins (520 nm) the emission bands at frequencies of carotenoids (560 nm) and porphyrins (625 nm) appeared (Karnauhov V. N., 2002). The fluorescence intensity of the flow of CSF was heterogeneous, which gave a unique opportunity to evaluate the rate and character of its traffic flow without luminophors. It was shown that in the control animals CSF periodically flowed in the AHS where it ran at a rate about 1-3 mcm/sec. Microvessels of the AHS provided a peristaltic pumping mechanism of the CSF circulation. At FA and hibernation the activity of these mechanisms was reduced and the CSF flow rate slowed down 1.5-2 times. Upon completion of the FA and hibernation the volume of available space for the CSF

flowing was increased, that led to the rise of the CSF flow rate to 8 mcm/sec. The emission bands at frequencies of 560 nm and 625 nm disappeared also.

Thus, under hibernation when activity of brain microcirculation reduced the LF granules of aglymphatic link of the CSF system can partially compensate the function of O₂ delivery.

ДОКІНГ-АНАЛІЗ ПОХІДНИХ ХІНАЗОЛІНУ – ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ АКТИВНОСТІ ЕПІДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТУ

*МЄШКОВА Н. О., КЕЛЬШ Я. П., БДЖОЛА В. Г.,
БОБКОВА Л. С., МІЩЕНКО О. В.*

*ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ;
e-mail: Hamedall@bigmir.net*

Метою роботи було визначення вірогідності зв'язування похідних хіназоліну з тирозинкіназами рецептора епідермального фактора росту (EGFR).

Досліджено зв'язування EGFR із похідними хіназоліну – інгібіторами кінази в АТФ-акцепторній кишені протеїнкіназ EGFR (кристалічні структури макромолекул 1M17, 2ITY, 2GS2 із бази даних протеїнів). Для докінгу було відібрано препарати – похідні хіназоліну: тарцева, іресса, празозин, теразозин, альфузозин, доказозин, з яких для перших трьох відома здатність блокувати активність EGFR із поєднанням гіпотензивної та протипухлинної дії (α 1-адреноблокатори). Тамсулозин (сполука нехіназолінової структури) поєднує зазначені види активності.

Структури відібраних для докінгу молекул розраховано в модулях програмного забезпечення Dock та Autodock, близькі за показниками ліпофільності, не відрізняються за показниками Н-донорів (Num_H_Donors) та числом зв'язків обертання (Num_Rotatable Bonds). Показано, що тарцева характеризується значними величинами енергії зв'язування (від 20 ккал/моль) з амінокислотними залишками трьох кіназ: 1M17, 2ITY та 2GS2). Іресса, теразозин та альфузозин мають значні величини енергії зв'язування (від 20 ккал/моль) з амінокислотними залишками двох кіназ: 2ITY та 2GS2. Для доказозину та тамсулозину енергії міжмолекулярного комплексу «EGFR-інгібітор» значущі тільки щодо кінази 1M17, із найбільш низькими показниками для кіназ 2GS2 та 2ITY.

Проведений докінг-аналіз препаратів показав, що енергія зв'язування їх з амінокислотами кіназ за вірогідністю значущості щодо впливу на EGFR знаходиться в такій послідовності: тарцева, іресса, теразозин, альфузозин, доказозин, тамсулозин. Препарати заслуговують уваги щодо подальшого вивчення із урахуванням пухлин з наявністю активності зазначених тирозинкіназ.

АТРАЗНА АКТИВНІСТЬ АКТОМІОЗИНУ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗІ СТРЕСІНДУКОВАНИМИ ВИРАЗКОВИМИ УРАЖЕННЯМИ ЗА ДЕФОСФОРИЛУВАННЯ І ФОСФОРИЛУВАННЯ

МОРГАЄНКО О. О.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, України;
e-mail: morg@univ.kiev.ua*

Відомо, що вплив стресорних факторів спрямований, зокрема, на органи травного тракту, насамперед на шлунок. Важливою фізіологічною властивістю шлунка є скорочення, яке на молекулярному рівні забезпечується актин-міозиною взаємодією. Ключовим регуляторним механізмом цього процесу є фосфорилювання легкого ланцюга міозину (ЛЛМ), що реалізується функціонуванням кінази ЛЛМ та фосфатази ЛЛМ.

Метою роботи було оцінити основний функціональний показник (АТРазну активність) актоміозинового комплексу, виділеного із гладеньких м'язів шлунків щурів зі стресіндукованими ураженнями за фосфорилювання і дефосфорилювання комплексу.

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 180–200 г. Для індукції виразкових уражень шлунка використовували модель іммобілізаційного стресу за Гройсманом і Каревіною. Було виділено препарати актоміозину, кальмодуліну, кіназно-фосфатазного комплексу за модифікованою методикою Sobieszek. Актomioзин фосфорилювали і дефосфорилювали *in vitro*. Проводили визначення Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної та Mg^{2+} -АТРазної активності актоміозину за кількістю відщепленого неорганічного фосфату.

Показано односпрямоване підвищення АТРазної активності для нативного та дефосфорильованого актоміозину з уражених шлунків порівняно з контрольними зразками. Так, для нативних препаратів було виявлено зростання Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної та Mg^{2+} -АТРазної активності актоміозину на 21 і 14%, тоді як для дефосфорильованих зразків показано підвищення активності відповідних АТРаз на 14 і 11% ($P < 0,05$). У той самий час для фосфорильованих препаратів актоміозину встановлено максимальні значення АТРазної активності порівняно з дефосфорильованим і нативним актоміозином, що узгоджується з теоретичними положеннями, при цьому вірогідної відмінності АТРазної активності між фосфорильованими препаратами з уражених і контрольних шлунків не виявлено.

Одержані дані узгоджуються із попередньо встановленими особливостями трансдукції сигналу в гладеньком'язових клітинах і вказують на посилення скоротливої активності міоцитів шлунка щурів в умовах стресіндукованих уражень. Показники АТРазної активності за різних модифікацій актоміозину дозволяють припустити, що відбувається порушення механізмів, які забезпечують фосфорилювання-дефосфорилювання комплексу.

Проведені дослідження «перехресного» фосфорилювання актоміозину з контрольних та вражених шлунків за участю кінази ЛЛМ, виділеної зі шлунків зі стресіндукованими ураженнями, вірогідних змін досліджуваних показників не виявили.

Таким чином, одержані результати вказують, що зміни АТРазної активності препаратів актоміозину обумовлені порушенням, насамперед, функціонування фосфатази ЛЛМ, ключового ензиму регуляції стану ЛЛМ за Са-незалежним механізмом, що призводить до активації актин-міозинової взаємодії і посилення скоротливої активності шлунка в умовах стресу.

БІОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ПРОГЕСТЕРОНУ

НАГІРНЯК А. В., ЗАЄЦЬ І. В., КОНОПЕЛЬНЮК В. В., САВЧУК О. М.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: Nagirniak_Alena@ukr.net*

Прогестерон є стероїдним гормоном, який синтезується клітинами жовтого тіла яєчника та плацентою в період вагітності. Згідно із сучасними даними літератури, застосування прогестерону як гормональної терапії може призводити до розслаблення гладеньких м'язів шлунково-кишкового тракту і, як наслідок, пригнічувати швидкість проходження їжі та збільшувати кількість поживних речовин, що всмоктуються. Застосування лікарських засобів на основі стероїдних гормонів, зокрема прогестерону, може бути одним із численних факторів, що сприяють розвитку ожиріння. Тому метою роботи було визначення загальних біохімічних показників сироватки крові щурів в умовах 28-добового введення прогестерону.

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях із початковою масою 160–200 г із дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципам експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним кон-

гресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Ожиріння спричинювали підшкірним введенням масляного розчину прогестерону з розрахунку 4,61 мг на 1 кг маси тіла протягом 28 діб. Контрольну групу склали щури, яким протягом 28 діб підшкірно вводили оливкову олію, яку використовували для розведення прогестерону. Біохімічний аналіз крові (вміст загального білірубіну, креатиніну, сечової кислоти, сечовини, загального протеїну та альбуміну; активність лужної фосфатази (ЛФ), аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), α -амілази) проводили за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора Microlab 300 (Vital Scientific, Нідерланди).

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $P < 0,05$.

Внаслідок досліджень нами встановлено, що 28-добове введення прогестерону призводить до збільшення вмісту креатиніну, загального протеїну, альбуміну та сечової кислоти, а також до збільшення активності АСТ в крові щурів дослідної групи, порівняно з контрольними тваринами. Тривале введення прогестерону призводить до зниження вмісту сечовини та загального білірубіну, а також до зниження активності α -амілази, АЛТ та ЛФ в крові тварин дослідної групи.

Зафіксоване нами збільшення вмісту загального протеїну та альбуміну в 1,1 раза порівняно з контрольними показниками, а також зниження вмісту сечовини та загального білірубіну в 1,3 та 1,9 раза відповідно на фоні дисбалансу активності маркерних гепатичних ензимів може свідчити про порушення функціонування та ушкодження печінки, що, ймовірно, пов'язане з жировою інфільтрацією цього органа внаслідок надмірного депонування ліпідів за дії прогестерону в тварин дослідної групи внаслідок довготривалого введення цього гормону. Зниження активності α -амілази в 1,4 раза в крові тварин дослідної групи може вказувати на порушення функціонування підшлункової залози. Проте у разі збільшення вмісту креатиніну в 1,3 раза та сечової кислоти – в 1,4 раза може спостерігатись розвиток хронічної ниркової недостатності в тварин дослідної групи внаслідок затримки води в організмі, зумовленої довготривалим введенням прогестерону.

Таким чином, в ході досліджень нами було показано, що тривале введення прогестерону призводить до дисбалансу функціонування ключових систем у щурів дослідної групи, що може спричинити розвиток та прогресування низки ускладнень та патологій.

СОСТОЯНИЕ АТФ- И Ca^{2+} -АКТИВИРУЕМОГО ПРОТЕОЛИЗА В КЛЕТКАХ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ Р12 ПРИ ДЕЙСТВИИ ТИРОКСИНА И СТРЕПТОКИНАЗЫ

НИКАНДРОВ В. Н., ПЕТРУСЕНКО Г. П., ГРОНСКАЯ Р. И.

*Белорусский государственный педагогический
университет им. М. Танка, Минск;
Институт физиологии НАН Беларуси, Минск;
e-mail: nikandrov.vitaly@gmail.com*

Механизмы контроля внутриклеточного протеолиза по-прежнему далеки от исчерпывающей ясности. Ранее нами были продемонстрированы нейротрофическое и нейропротекторное свойства стрептокиназы (СК). Оказалось также, что степень воздействия СК на клетки существенно изменяется в присутствии других биорегуляторов.

Цель работы – раскрыть особенности изменений уровня АТФ- и Ca^{2+} -активируемых реакций протеолиза при воздействии на клетки феохромоцитомы PC12 СК и тироксина (Т).

Клетки феохромоцитомы культивировали на среде RPMI-1640, обогащенной сыворотками крови. Монослой клеток снимали, разводили взвесь питательной средой и добавляли Т в конечной концентрации 16 нг/мл ($2 \cdot 10^{-8}$ М), СК в конечной концентрации 0,1, 1,0, 10,0, 100 и 1000 МЕ/мл, а также

сочетания SK+T. Через 20 мин и 24 ч клетки отмывали и определяли в них уровень АТФ-, а также I (мкМ) Ca²⁺- и II (мМ) Ca²⁺-протеолиза.

В данной модели изменения уровня протеолиза под действием SK существенно отличались от таковых при культивировании клеток РС12 в дефицитной по белкам питательной среде (В. Н. Никандров и соавт, 2003).

Так, в анализируемом случае добавки SK во всем диапазоне концентраций снижают уровень АТФ-активируемого протеолиза на 10–19% ($P < 0,05$), а не усиливают его как при дефиците протеинов в среде. Уровень I (мкМ)Ca²⁺- и II (мМ) Ca²⁺-активируемого протеолиза клеток феохромоцитомы под действием SK в обогащенной протеинами питательной среде падает соответственно на 25–50 и 65–100% ($P < 0,05$), тогда как при дефиците протеинов в среде изменения II (мМ) Ca²⁺-активируемого протеолиза имеют более сложную концентрационную зависимость с зоной существенного нарастания этого типа протеолиза.

В использованной концентрации T сам заметно не влияет на уровень АТФ-активируемого протеолиза в клетках указанной культуры, вызывая в них угнетение I (мкМ) Ca²⁺-активируемого протеолиза через 20 мин и 24 ч на 57–59%, а также II (мМ) Ca²⁺-активируемого протеолиза через 20 мин на 90% и усиление его к 24 ч на 70% ($P < 0,05$).

Добавка в среду одновременно SK+T мало изменяет действие SK на АТФ-активируемый протеолиз. Уровень I (мкМ) Ca²⁺-активируемого протеолиза при этом через 20 мин при концентрации SK 1000 МЕ/мл не отличается от контроля, при 100 или 1,0 МЕ/мл SK подавляется сильнее в 1,7 и 1,9 раза соответственно по сравнению с одной SK. Через 24 ч не наблюдается принципиальной разницы в действии SK или SK+T. Добавление SK+T через 20 мин уменьшает угнетение II (мМ) Ca²⁺-активируемого протеолиза при концентрации SK 10,0 МЕ/мл до 22%, а при концентрации ее 100 или 1,0 МЕ/мл – до 73–75%. Однако 24 ч добавление SK+T полностью снимает активацию этого протеолиза при минимальной концентрации SK, а при ее концентрации 1,0, 10,0, 100 МЕ/мл ведет к возрастанию его на 83, 58 и 90% соответственно при угнетении на 85% в случае максимальной концентрации SK.

Это подтверждает ранее сделанное нами заключение о зависимости эффекта SK от функционально-метаболического состояния клеток. Далее, поскольку SK и в концентрации 0,1 МЕ/мл ($5 \cdot 10^{-10}$ М) существенно влияет на протеолиз клеток, есть основания считать, что ее эффект реализуется через рецепторы мембраны. Природа и локализация рецепторов SK и T различны, поэтому действие вариантов SK+T аддитивно лишь в отдельных случаях.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЖЕЛАТИНОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНАЗ *Pseudomonas aeruginosa* ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭФФЕКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

НИКАНДРОВ В. Н., ПЫЖОВА Н. С.

*Белорусский государственный педагогический
университет им. М. Танка, Минск;
РНПЦ «НИИ эпидемиологии и микробиологии»
Минздрава Республики Беларусь, Минск;
e-mail: nikandrov.vitaly@gmail.com*

Протеиназы *Pseudomonas aeruginosa* играют двоякую роль: они не только регуляторы метаболизма микробной клетки, но и факторы патогенности госпитальных штаммов при псевдомонадной инфекции. Учитывая важную роль как фактора патогенности коллагеназ (желатиназ) *P. aeruginosa* основное внимание в данном разделе работы было сосредоточено именно на желатинолитических протеиназах.

Методом лизиса протеина-субстрата в тонком слое агарового геля изучено воздействие ряда эффекторов на желатинолитическую активность (при pH 7,5) бесклеточных супернатантов бульонных

культур в конце логарифмической фазы роста госпитальных штаммов *P. aeruginosa*: 23/2гоб1 (наиболее активный продуцент пиоцианина), 23/2гоб2 (имеет наивысшую общую гемолитическую активность и таковую активность сине-зеленых пигментов), 74/5гоб3 (терморезистентный гемолиз проявляется только с 10 ч роста культуры микроорганизма и в отсутствие добавок о-фенантролина). Все исследования выполнены пятикратно, результаты обработаны статистически. Цифровые значения изменений приведены ниже только в случаях статистически значимых изменений ($P \leq 0,05$).

Добавки к супернатантам культуральной жидкости NH_4Cl или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в конечной концентрации 10^{-3} М не вызывают значимых изменений желатинолитической активности всех трех штаммов: изменения не превышают 20%. Внесение NH_4Br или KBrO_3 в такой же концентрации ведет к усилению расщепления желатина протеиназами штаммов 23/2гоб1 и 23/2гоб2 на 29–36% ($P < 0,05$), а в случае шт. 74/5гоб3 – на 59–65% ($P < 0,05$). При добавлении в супернатанты культуральной жидкости NH_4OH в конечной концентрации 0,36 М подобный эффект у шт. 23/2гоб1, 23/2гоб2 и 74/5гоб3 составил по сравнению с контролем 315, 243 и 189% соответственно. Это может быть обусловлено возрастанием рН системы. Но данный эффект нуждается в отдельном углубленном исследовании.

Никотинат в конечной концентрации 10^{-3} М резко угнетает желатинолитическую активность шт. 23/2гоб1, 23/2гоб2 и 74/5гоб3 на 37, 42 и 53% соответственно (при концентрации эффектора 10^{-2} М наступает полная блокада; все изменения – $P < 0,05$). В смеси с 6-аминогексановой кислотой (6-АГК) ингибирующий эффект никотината в концентрации 10^{-3} М усиливается до 53, 63 и 67% соответственно, хотя сама 6-АГК влияния не оказывает.

NAD в конечной концентрации 10^{-3} М угнетает лишь протеиназы штамма 74/5гоб3 на 30%, существенно не влияя на энзимы остальных штаммов, тогда как NADP подавляет активность желатиназ всех трех штаммов на 25–32%. Восстановленные формы пиридиновых нуклеотидов оказывают стимулирующее влияние на желатинолитическую активность. Однако к NADH были чувствительны энзимы штамма 74/5гоб3: активность возрастает на 29%, тогда как при добавлении NADPH повышается желатинолитическая активность протеиназ шт. 23/2гоб1, 23/2гоб2 и 74/5гоб3 всех штаммов на 34, 26 и 86% соответственно.

Данные материалы свидетельствуют о важности пиридиновых нуклеотидов в регуляции желатинолитических протеиназ патогенных штаммов псевдомонад. Однако эффект восстановленных и окисленных форм NAD(P), видимо, определяется метаболической спецификой штаммов, в данном случае – накоплением сине-зеленых пигментов.

РОЛЬ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТКИ В ЕЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

*НИПОТ Е. Е., ШПАКОВА Н. М., ОРЛОВА Н. В.,
ШАПКИНА О. А., ЧЕРЕПАНОВ В. В.*

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;
e-mail: nipotel71@gmail.com*

Изучение устойчивости клеток к стрессовым воздействиям является актуальной задачей современной биологии. Среди большого количества факторов, определяющих такую устойчивость, можно выделить энергетический статус клетки. Основным энергетическим источником в эритроцитах млекопитающих является АТФ. Снижение концентрации АТФ в эритроцитах приводит к изменению их вязко-эластичных свойств, динамического состояния липидного бислоя, функционирования ряда энзимных и транспортных систем.

Целью работы было исследовать влияние истощения по АТФ эритроцитов млекопитающих (человек, бык, лошадь) на их устойчивость к гипотоническому стрессу.

Истощение по АТР проводили путем инкубации эритроцитов с 2-дезоксид-D-глюкозой – ингибитором гликолиза. Затем клетки подвергали действию гипотонического стресса. Концентрация NaCl в среде была подобрана таким образом, чтобы уровень гемолиза контрольных клеток млекопитающих составлял примерно 30%: для эритроцитов человека – 75–80 мМ, быка – 100–110 мМ, лошади – 80–85 мМ. Уровень гемолитического повреждения контрольных и энергетически истощенных эритроцитов определяли спектрофотометрически. Скорость гемолиза определяли как тангенс угла наклона касательной гемолитической кривой.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в результате обработки клеток 2-дезоксид-D-глюкозой уровень гипотонического повреждения эритроцитов человека снижается в 1,4 раза, клеток быка и лошади повышается в 2 и 3,6 раза соответственно. Значения максимальной скорости гипотонического гемолиза контрольных и истощенных по АТР эритроцитов человека достоверно не различаются. После истощения эритроцитов животных по АТР наблюдается рост скорости гипотонического гемолиза эритроцитов быка в 2,5, лошади – в 4,1 раза. Таким образом, метаболически истощенные эритроциты человека становятся менее чувствительными к стрессовому воздействию, а клетки животных – более чувствительными.

В ряде работ исследовано влияние метаболического состояния эритроцитов человека на их вязкость и средний объем. Показано, что в процессе истощения клеток по АТР изменение данных параметров имеет нелинейный характер. Наряду с этим известно, что содержание метаболически активных веществ и активность гликолитических энзимов в эритроцитах млекопитающих характеризуются видоспецифичностью. Можно предположить, что истощение эритроцитов разных видов млекопитающих может характеризоваться разной скоростью уменьшения содержания АТР в клетке. При одинаковых экспериментальных условиях (продолжительность инкубирования с 2-дезоксид-D-глюкозой) метаболический статус эритроцитов разных видов млекопитающих может быть различным, что и определяет характер их ответа на стрессовое воздействие.

ВПЛИВ ІНГІБІТОРУ NO-СИНТАЗ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАБДОМІОЛІЗУ

*НІКІТЧЕНКО І. В., МАТАСОВА Я. В., ВОДОП'ЯНОВА О. О., АЛІ С. Г.,
НІКІТЧЕНКО Ю. В., КАЛІМАН П. А.*

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: nikitchenkoiv@mail.ru*

Однією з моделей геміндукованого пошкодження тканин є гліцерольна модель рабдоміолізу, що характеризується руйнуванням міоцитів та виходом міоглобіну в кровотік. Високі концентрації гему спричинюють активацію вільнорадикальних процесів в різних компартментах клітин. У мітохондріях (МХ) печінки присутня індукібельна форма гемоксигенази – ГО-1, основна функція якої, очевидно, є регуляція вмісту вільного гему і гемопротеїнів, у тому числі компонентів дихального ланцюга та мітохондріальної NO-синтази (mхNOS). Мета роботи – дослідження впливу інгібітору NO-синтаз, N^o-нітро – L – аргініну (L-NNA) на показники прооксидантно-антиоксидантної системи МХ печінки щурів за гліцерольної моделі рабдоміолізу. Робота виконана на 49 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 180–250 г. Рабдоміоліз моделювали внутрішньом'язовою ін'єкцією 50%-го водного розчину гліцеролу в дозі 1 мл на 100 г маси тіла. L-NNA вводили в/ч в дозі 3,5 мг на 100 г маси тіла за 0,5 год до введення гліцеролу. Тварин брали в дослід за 2 год або 24 год після ін'єкції гліцеролу.

Раніше нами було показано, що введення гліцеролу спричинює значне накопичення гемовмісних продуктів у сироватці крові та подальше їх надходження до тканин. В цій роботі встановлено, що вміст загального гему в МХ печінки підвищується в 1,6 раза за 2 год після ін'єкції гліцеролу, а за добу знижується до контрольного рівня. Накопичення гему супроводжується збільшенням

інтенсивності аскорбатіндукованого пероксидного окислення ліпідів (аіПОЛ) більш ніж у 5 разів, тоді як інтенсивність спонтанного ПОЛ та вміст ТБК-активних продуктів не змінюється. Активність ГО збільшується в 1,8 раза в перші години після ін'єкції гліцеролу, а за добу спостерігається подальше підвищення активності ензиму (в 3 рази). Активність глутатіонпероксидази (ГПО) підвищується за добу в 1,4 раза. Введення гліцеролу не змінює швидкість поглинання кисню МХ (V_d), але швидкість фосфорилування ADP (V_3) знижується на 70%, що супроводжується відповідним зменшенням дихального контролю. Активність цитохромоксидази (ЦО) підвищується в 1,4 раза за 2 год і зберігається на тому ж рівні за добу після ін'єкції гліцеролу. Встановлені зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу, очевидно, обумовлені збільшенням вмісту вільного гемму в органелах. Однак певну роль у розвитку окисного стресу в МХ печінки за рабдоміолізу може відігравати посилення синтезу оксиду азоту внаслідок активації мxNOS. Попереднє введення L-NNA не впливає на динаміку вмісту загального гемму, але запобігає підвищенню інтенсивності як аіПОЛ, так і активності ГПО. Збільшення ГО та ЦО активності, що спостерігається за 2 та 24 год після індукції рабдоміолізу, повністю блокується попередньою ін'єкцією L-NNA. На базальний рівень показників, що досліджувались, введення L-NNA не впливає. Відомо, що оксид азоту посилює синтез ГО-1 за рахунок активації експресії гена і стабілізації мРНК ізоензиму, а також NO може посилювати індукуючий ефект гемму на експресію гена ГО-1. У зв'язку з цим за інгібування утворення оксиду азоту причиною зменшення ГО активності, ймовірно, є зниження синтезу ГО-1 *de novo* та/або інгібування транслокації ензиму в МХ. Підвищення активності ЦО в умовах рабдоміолізу може бути пов'язане з роз'єднанням дихання та фосфорилування ADP.

Таким чином, одержані дані свідчать, що в регуляції прооксидантно-антиоксидантної системи МХ печінки щурів в умовах гліцероліндукованого рабдоміолізу прямо та/або опосередковано бере участь оксид азоту, що утворюється в NO-синтазних реакціях.

РОЛЬ NO-РАДИКАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ВЫЖИВАЕМОСТИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ И УСКОРЕННОМ СТАРЕНИИ

*НИКИТЧЕНКО Ю. В., ДЗЮБА В. Н., НИКИТЧЕНКО И. В., МАЛЕЕВ В. А.,
БОНДАРЬ В. В., КОЗЛОВА Е. В., СИДОРОВ В. И., ШЕРЕМЕТ А. А.*

*НИИ биологии Харьковский национальный
университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: yunikitchenko@mail.ru*

Ранее нами было показано, что однократное введение крысам донора NO-радикалов нитропрусида Na увеличивало супероксиддисмутазную активность в печени и содержание церулоплазмينا в крови. Введение крысам ингибитора NO-синтаз N^o-нитро-L-аргинина (L-NNA) снижало супероксиддисмутазную, каталазную и общую антиокислительную активность в исследованных тканях, а содержание гидропероксидов липидов – увеличивало. Учитывая важную роль прооксидантно-антиоксидантной системы в механизмах естественного и, особенно, ускоренного старения, представлялось актуальным изучить влияние длительного введения L-аргинина и L-NNA на прооксидантно-антиоксидантную систему и выживаемость животных при естественном и ускоренном старении, которое моделировали избыточным питанием в первый месяц жизни (Фролькис, 1992).

Влияние 12-дневного введения L-аргинина (33,5 мг/100 г массы тела) или L-NNA (7 мг/100 г массы тела) на прооксидантно-антиоксидантную систему (содержание гидропероксидов липидов, церулоплазмينا, GSH, активность глутатіонпероксидазы, глутатіонредуктазы и интенсивность генерации O₂⁻) и структурно-функциональное состояния мембран (интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования, активность цитохромоксидазы и вязкость липидного бислоя) было исследовано в различных фракциях печени и крови крыс разного возраста. Влияние L-аргинина (2 г/л питьевой воды) на выживаемость крыс при естественном и ускоренном старении исследовано,

начинаючи з 23-місячного віку. Було також досліджено вплив L-аргініну та L-NNA на виживаність мух *Drosophila melanogaster*.

Показано, що надмірне харчування викликає порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу, супроводжується зниженням виживаності тварин. Введення мишам L-аргініну призводить до нормалізації прооксидантно-антиоксидантного балансу. При цьому інтенсивність окислювального фосфорилування та цитохромоксидазна активність мітохондрій печінки не змінюються, а інтенсивність генерації O_2^- та в'язкість ліпидного бішару мітосом нормалізуються. Введення L-NNA не супроводжується нормалізацією показників структурно-функціонального стану мітохондрій та мітосом печінки, а стан прооксидантно-антиоксидантної системи в тканинах обоєх експериментальних груп мишей погіршується. Застосування L-аргініну з питв'ювчою водою достовірно збільшує виживаність мишей, отримувалих стандартний раціон харчування. У підопитних тварин, виживаність яких суттєво нижча, L-аргінін збільшує цей показник до рівня контролю. Додавання до їжі личинок мух L-аргініну суттєво збільшує виживаність, а додавання L-NNA – суттєво знижує цей показник. Так, медіана виживаності мух, отримувалих L-аргінін, збільшилася на 22,9%, а мух, отримувалих L-NNA, – знизилася на 20,8%.

Отримані дані про протилежно направлений ефект L-аргініну та L-NNA на прооксидантно-антиоксидантну систему печінки та крові, структурно-функціональний стан мітохондрій та мітосом та виживаність тварин дозволяють зробити висновок, що позитивний ефект L-аргініну обумовлений посиленням генерації NO-радикалів NO-синтазами, що призводить до підвищення надійності антиоксидантної системи організму та, як наслідок, до уповільнення старіння.

ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-145 НА СУДИННО-ТРОМБОЦИТАРНУ ЛАНКУ ГЕМОСТАЗУ

¹НІКОЛАСНКО Т. В., ¹НІКУЛІНА В. В., ²КОРОЛЬОВА Д. С.,
²ЧЕРНИШЕНКО В. О., ³СКАЧКОВА О. В., ⁴КАЛЬЧЕНКО В. І.,
¹ГАРМАНЧУК Л. В., ²ЛУГОВСЬКОЇ Е. В.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології», Україна;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

³Національний інститут раку МОЗ України, Київ;

⁴Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;
liudmyla_garmanchuk@ukr.net

Клітинна ланка гемостазу, представлена тромбоцитами та ендотеліоцитами, є найчутливішим компонентом гемостазу, оскільки першою реагує на пошкодження судин під час зсідання крові та бере безпосередню участь у формуванні фібриново-тромбоцитарного тромбу. Тому вивчення дії на тромбоцити та ендотеліоцити будь-якого потенційного антитромботичного препарату є неодмінною умовою його успішного впровадження в практику.

Метою роботи було вивчення дії калікс[4]арену С-145 на активацію та агрегацію тромбоцитів, а також на проліферацію та апоптоз ендотеліоцитів.

Раніше було показано, що С-145 є ефективним інгібітором полімеризації фібрину ($IC_{50} = 4 \cdot 10^{-6}$ М). За його концентрації 70 мкМ в досліді *in vitro* час зсідання плазми крові людини в тесті «протромбіновий час» подовжувався вдвічі.

Для вивчення дії калікс[4]арену С-145 на тромбоцитарну ланку гемостазу вивчали агрегацію та активацію тромбоцитів людини та кроля з використанням агрегатометрії та цитометрії. Методом агрегатометрії було показано, що калікс[4]арен С-145 у концентрації 3–300 мкМ не індукуює агрегації тромбоцитів та не впливає на агрегацію тромбоцитів, індуковану АДФ. Цитометричні дослідження не виявили змін форми та гранулярності тромбоцитів, які оцінювали за фронтальним та ортогональним

світлорозсіюванням суспензії тромбоцитів, при інкубації з С-145 до 1,5 год. Як контроль використовували тромбоцити, проактивовані тромбіном або ADP за відсутності калікс[4]арену.

Для вивчення проліферації ендотеліоцитів у присутності калікс[4]арену використовували лінії культивованих клітин ендотелію свині (РАЕ). Інкубацію з С-145 (300 μM) проводили протягом 2 діб та аналізували рівень апоптичних клітин та розподіл за фазами клітинного циклу методом цитометрії. Показано, що у разі внесення С-145 у середовище культивування рівень апоптичних клітин знижується на 19% порівняно з контролем. Популяція клітин проліферативного пулу (G2/M+S) у присутності С-145 підвищується в 2,5 раза порівняно з контролем (65,87 проти 14,29% у контролі).

Таким чином, показано, що калікс[4]арен С-145 безпосередньо не впливає на тромбоцити *in vitro*, не змінюючи їхньої форми та гранулярності, та не впливає на процес їхньої агрегації. Водночас, калікс[4]арен С-145 має антиапоптичний та проангіогенний ефект, показаний на культурі ендотеліальних клітин. Такі властивості калікс[4]арену дозволяють розглядати можливість його використання як терапевтичного препарату, а стимулююча дія на проліферацію ендотеліоцитів може бути додатковою перевагою його застосування при ушкодженні судин та ішемізації органів і тканин.

LDG-ACTIVITY AND ABSORPTION OF GLUCOSE BY MCF-7 IN SERUM FREE CONDITIONS

*NIKOLAIENKO T. V., GARMANCHUK L. V., NIKULINA V. V.,
DZHUS O. I., PETRUK N. A., SARAYEVA I. V.*

*Taras Shevchenko Kyiv National University, Educational
and Scientific Centre «Institute of Biology», Ukraine;
e-mail: nikolaenkotetiana@yandex.ua*

Breast cancers have higher than normal glucose metabolism, but the mechanism of glucose entry into these tumors is not well understood. Glucose is an essential metabolic substrate of all mammalian cells for energy demand. It is taken up into cells by energy-independent transportation down its concentration gradient, which is mediated by glucose transporter proteins. Transport of glucose across the plasma membrane of mammalian cells is the first rate-limiting step for glucose metabolism and is mediated by facilitative glucose transporter (GLUT) proteins. The main glucose transporter isoforms in the tumor cells MCF-7 is mainly GLUT4.

A curious, but common, property of invasive cancer is altered glucose metabolism. A near-universal property of primary and metastatic cancers is upregulation of glycolysis, resulting in increasing glucose consumption, which can be observed with clinical tumor imaging. Persistent metabolism of glucose to lactate even in aerobic conditions is an adaptation to intermittent hypoxia in pre-malignant lesions.

Cell populations with upregulated glycolysis and acid resistance have a powerful growth advantage, which promotes unconstrained proliferation and invasion. The purpose of the research was to investigate an activity of lactate dehydrogenase (LDG-activity) and absorption of glucose by MCF-7 cells in monolayer culture under different conditions.

Glucose absorption and LDG-activity were tested by typical methods (glucosooxidase and kinetic UF-methods respectively). MCF-7 cells were incubated in DMEM medium (Sigma, USA), 2 mM L-glutamine and 40 mg/ml gentamicin. Cell lines were cultured at the standard conditions at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂. Two variants culture media were used: complete (with 10% FBS), and incomplete (without serum).

LDG-activity of MCF-7 cells differ significantly in complete culture medium and serum free medium. Cells under conditions of serum free medium were characterized higher LDG-activity then cells in complete culture medium (0.27 ± 0.02 and 0.18 ± 0.01 $\mu\text{Kat}/1000$ cells respectively). Absorption of glucose has a similar effect: level of glucose was increased in serum free medium (0.32 ± 0.03 and 0.12 ± 0.01 $\mu\text{M}/1000$ cells respectively). A constitutive and persistent increase in glycolysis results in acute and chronic acidification of the local environment.

MCF-7 cells in serum free medium conditions were characterized high metabolism activity of glucose. So, upregulation of glycolytic metabolic pathways in the vast majority of invasive cancers is the result of adaptation to consistent environmental pressures in pre-malignant lesions, when diffusion limitations result in gradients of hypoxia and acidosis.

АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗИ КЛІТИН МОЗКУ ЩУРІВ ІЗ СФОРМОВАНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ЗАЛЕЖНІСТЮ

ОМЕЛЬЧЕНКО Ю. О., СОКУР О. В.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: omelchenkoyulia@gmail.com*

Систематичне вживання алкоголю є передумовою виникнення та прогресування захворювань всіх внутрішніх органів, але особливо чутлива до алкоголю нервова система. Вплив алкоголю на тканини головного мозку супроводжується вираженою гіперемією, розширенням капілярів, загибеллю клітин мозочку. Крім того, порушення фізіологічних функцій при алкоголізмі пов'язано із впливом етанолу на NO-ергічну систему мозку, яка залучена в процеси розвитку як органічних порушень, так і поведінкових дисфункцій. Тому, вивчення біохімічних аспектів патогенезу алкоголізму, а також пошук нових високоефективних лікарських препаратів для комплексного лікування цього захворювання є особливо актуальними як для сучасної біології, так і медицини. Метою роботи було вивчити вплив фенугреку та оцтовокислого цинку на активність NO-синтази в клітинах мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю.

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах (самцях) масою 180–200 г. Алкогольна залежність у тварин в хронічному експерименті формувалась в умовах вільного вибору між 40%-им розчином етанолу та водою протягом 2 місяців. До групи щурів з сформованою алкогольною залежністю відносили тварин, в яких споживання етанолу протягом доби становило 2 мл і більше. Групу щурів із сформованою алкогольною залежністю ділили на 2 підгрупи: одна продовжувала споживати алкоголь, іншій додатково протягом останнього місяця вводили оцтовокислий цинк в дозі 2 мг/кг і фенугрек (лат. *Trigonella foenum-graecum*) в дозі 50 мг/кг маси тварини перорально. Визначення загальної активності NO-синтази, індуцибельної (iNOS) і конститутивних (cNOS) в клітинах мозку щурів проводили стандартними спектрофотометричними методами. Внаслідок досліджень нами було встановлено, що в умовах сформованої алкогольної залежності (4–8 тижнів) загальна активність NO-синтази в клітинах мозку щурів зростає в 2,5–4,5 рази порівняно з контрольними показниками за рахунок індукції її конститутивних ізоформ (nNOS та eNOS), активність яких залежить від концентрації вільних іонів кальцію. Накопичення оксиду азоту в умовах тривалого впливу етанолу може блокувати активність альдегіддегідрогенази і посилювати нейродеструктивні ефекти ацетальдегіду. Застосування комплексу фенугреку і оцтовокислого цинку протягом місяця в умовах сформованої алкогольної залежності призводить до зниження загальної активності NO-синтази та її конститутивних ізоформ (на 4-й тиждень вона була на рівні контрольних величин).

Таким чином, нами продемонстровано зростання активності NO-синтази в клітинах мозку щурів зі сформованою алкогольною залежністю, що в подальшому може призвести до посилення оксидативного стресу та розвитку патологічних пошкоджень. Введення оцтовокислого цинку та фенугреку за досліджуваної патології приводить до поступового зниження активності ферментів, особливо на пізніх етапах дослідження. Одержані результати свідчать на користь можливого використання досліджуваних сполук для корекції метаболічних порушень, спричинених хронічним надходженням етанолу і дає підстави для подальшого дослідження їх як потенційного лікувального засобу хронічного алкоголізму.

**ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ І МІКРОСОМ
МОЗКУ ТА АКТИВНІСТЬ АВТОІМУННИХ ПРОЦЕСІВ
ЗА ДІЇ КОМПОЗИЦІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН
В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО
ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ**

¹ПАСІЧНА Е. П., ¹ДОНЧЕНКО Г. В., ²БУРЛАКА А. П., ¹ДЕЛЕМЕНЧУК Н. В.

*¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. С. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: ellapasich@gmail.com*

Розсіяний склероз (РС) належить до низки автоімунних захворювань нервової системи і характеризується локально та дифузно розташованими осередками демієлінізації та нейродегенерації та хронічним запальовальним перебігом. Традиційно терапія таких захворювань зводиться до імуносупресорних заходів та симптоматичного лікування хворих. Проте існує багато свідчень, що в патогенезі захворювання провідну роль відіграє ушкодження електрон-транспортних ланцюгів (ЕТЛ) мітохондрій і мікросом клітин ЦНС. Причому розвиток мітохондріальної дисфункції та пов'язаних з нею метаболічної гіпоксії й оксидативного стресу в тканині ЦНС на сьогодні вважаються одними з головних механізмів прогресування хвороби. Очевидно, що успішне лікування РС залежить не тільки від корекції імунологічного стану, а й великою мірою – функціонального стану ЕТЛ клітин і адекватної антиоксидантної терапії хворих. Метою роботи було дослідити вплив вітаміну D₃ та його комплексу з вітамінами B₁, B₂, B₆, PP, E, α-ліпоєвою та α-ліноленовою кислотами, а також мінералами Mg, Zn, Se (композиції БАР) на рівень металопротеїнів-компонентів ЕТЛ мітохондрій та стан пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) у головному мозку, цитохрому P450 у тканинах щурів та рівень мієліноспецифічних автоантитіл у крові щурів в умовах експериментального автоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ), що є моделлю РС.

В досліджах використовували 40 щурів-самців масою 200–250 г лінії Wistar, ЕАЕ в яких спричинювали інокуляцією суміші з очищеного гомологічного мієліну і повного ад'юванта Фрейнда. Одна із груп імунізованих тварин з 8-ї доби експерименту отримувала перорально кожного дня протягом 13 діб вітамін D₃ у дозі 5 мкг на кг ваги, інша група – композицію БАР. Дослідження проводили на 21-у добу після імунізації за наявності неврологічних симптомів захворювання. Вміст металопротеїнів у тканинах визначали методом ЕПР-спектрометрії, вміст тіобарбітуратактивних продуктів (ТБК-активних продуктів) як вторинних продуктів ПОЛ – спектрометрично, рівень антитіл у сироватці крові – методом імуноблоту.

Результати досліджень показали, що в умовах значного підвищення мієлінотоксичних антитіл за ЕАЕ в мітохондріях мозку тварин відбувається істотне зниження рівня радикалів убісеміхінону (РУ) та залізо-сірчаних протеїнів N-2 (ЗСП N-2), що належать до I комплексу ЕТЛ, та підвищення нітрозильних комплексів заліза (НКЗ) та ТБК-активних продуктів у мозку, що свідчить про активацію процесів ПОЛ, ушкодження мітохондріального ЕТЛ, роз'єднання клітинного дихання з окислювальним фосфорилуванням та про істотну роль активних форм нітрогену в ушкодженні ЕТЛ мітохондрій мозку. При цьому спостерігається істотне зниження рівня цитохрому P450 в тканині мозку і в печінці, що свідчить про порушення функціонального стану гідроксилазних систем ендоплазматичного ретикулула в цих тканинах тварин. Застосування композиції БАР сприяє нормалізації ЕТЛ мітохондрій та ендоплазматичного ретикулула, усуваючи надмірне утворення НКЗ і продуктів ПОЛ, а також зниження рівня ЗСП N2, РУ в мозку та цитохрому P450 в тканинах щурів. Вітамін D₃, застосований окремо, також впливає на компоненти ЛТЕ мітохондрій, особливо РУ, однак його ефект у запобіганні ушкодження ЗСП N-2 незначний, зокрема, він не запобігає утворенню НКЗ, на відміну від комплексного застосування БАР. Також показано, що вітамін D₃ дозозалежно знижує рівень автоантитіл в організмі щурів за ЕАЕ, однак у складі композиції БАР його дія є значно ефективнішою. Таким чи-

ном, досліджувана композиція БАР в умовах ЕАЕ виявляє подвійний позитивний ефект – специфічно гальмує автоімунні процеси та виявляє протекторний ефект у клітинах головного мозку щурів.

PROTEIN C ACTIVATION IN CELL-ASSOCIATED FIBRIN CLOTS PROMOTES FIBRINOLYSIS

PATALAKH L., REVKA O., DROBOTKO T.

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
e-mail: patalakh@ukr.net*

Activated Protein C (APC) belongs to the proteins of hemostasis system which control balance between processes of blood clotting and thrombolysis. APC functions as physiological anticoagulant agent and additionally promotes fibrinolysis through neutralization of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), the specific inhibitor of the tissue plasminogen activator (tPA). APC level is constantly restored by limited proteolysis of zymogen protein C (PC). Proteolytic activation of protein C is established by thrombin-thrombomodulin complex which preferentially localized on the surface of endothelial cells. Thrombomodulin expression also occurs to a lesser extent during activation of some blood cells, such as platelets, monocytes and neutrophils. All these cells may also play role in the hemostatic mechanism by supporting transformation of prothrombin to thrombin. Nevertheless, the question if protein C activation by non-endothelial thrombin-thrombomodulin complexes can be essential for promotion of the fibrin clot degradation still needed to be investigated.

To determine whether of these cells (platelets, monocytes or neutrophils) provide more effectively the conversion of PC to functionally active APC that can support tPA-dependent fibrinolysis.

Fibrinolysis was spectrophotometrically evaluated by measuring the half-lysis time of plasma clots containing thrombin-stimulated cells and a low concentrations of exogenous tissue plasminogen activator (1.7 IU/mL) or protein C (1 µg/mL), or combination of PC with tPA in the same final concentrations.

Exogenous zymogen protein C by itself and in combination with exogenous tPA promoted acceleration of fibrinolysis of the monocytes-containing clots. In contrast, it did not affect fibrinolysis of clots which contain platelets and neutrophils. The presence of platelets in monocytes-containing clots significantly inhibited profibrinolytic effect of protein C. Nevertheless, it was restored by simultaneous application of tPA.

The acceleration of fibrinolytic degradation of the monocytes-containing clots by zymogen protein C gives evidence for *in situ* formation of the functionally active APC generated on the monocyte cells surface. Monocytes obviously produced APC in sufficient amounts for neutralization of tPA inhibitors (as well as plasmin inhibitors), which monocytes usually secrete during their activation. In return, the overall inhibitory activity of both monocytes and platelets significantly reduced profibrinolytic activity of newly generated APC. The received results also demonstrate that PC activation on the surface of platelets or neutrophils was not enough to maintain an appropriate level of APC to maintain tPA-dependent fibrinolysis.

**ЭФФЕКТЫ α -ТОКОФЕРОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ
НА СОДЕРЖАНИЕ И АКТИВНОСТЬ
NAD(P)H-ХИНОНОКСИДОРЕДУКТАЗЫ 1
В ТИМОЦИТАХ КРЫС**

ПЕТРОВА Г. В., ДОНЧЕНКО Г. В.

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: petrova@biochem.kiev.ua*

NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза 1 (DT-диафараза, NQO1, 1.6.99.2) – цитозольный гомодимерный флавопротеин – участвует, по крайней мере, в трех системах биохимических реакций: одноступенчатом двухэлектронном восстановлении хинонов до гидрохинонов, поддержании в восстановленной активной форме эндогенных антиоксидантов, регуляции стабильности опухолевого супрессора и проапоптического фактора протеина p53. Физиологические колебания активности DT-диафаразы находятся в довольно широких пределах, причем существует целый ряд биологически активных соединений (в том числе и антиоксидантов), которые способны существенным образом ее изменять. Однако в литературе практически отсутствуют данные об активности и содержании DT-диафаразы при индукции гибели клеток и действии α -токоферола (ТФ) и его производных на этот процесс.

Цель работы – анализ содержания и активности DT-диафаразы в изолированных тимоцитах крысы при индукции их гибели и действии ТФ, его аналогов и синтетических производных.

Установлено, что тимоциты крысы стабильно экспрессируют энзим в количестве, достаточном для вестерн-блот-анализа. ТФ, его ацильное производное α -токоферилацетат (ТАц) и окисленная форма α -токоферилхинон (ТХ) в диапазоне концентраций 10–100 мкМ не влияют на содержание DT-диафаразы в тимоцитах в контроле. При этом только ТФ увеличивает активность DT-диафаразы на 40%. Митохондриальные токсины антимицин А и олигомицин индуцируют соответственно апоптоз и некроз тимоцитов крыс, что сопровождается снижением активности энзима. Только ТФ эффективно предотвращает гибель клеток, увеличивая при этом активность DT-диафаразы. Однако ни гибель тимоцитов под действием указанных соединений, ни цитопротекторное действие ТФ не сопровождаются изменением содержания DT-диафаразы в клетках.

Синтетические производные ТФ, боковая цепь которых укорочена с 16 до 6 атомов углерода (ТФ-С₆, ТАц-С₆ и ТХ-С₆), а также α -токоферилсукцинат (ТС) в концентрациях 50–100 мкМ индуцируют соответственно некроз и апоптоз тимоцитов, что сопровождается снижением активности DT-диафаразы. Впервые установлено, что указанные соединения не влияют на содержание DT-диафаразы в клетках, однако вызывают дозозависимую протеолитическую деградацию молекулы энзима путем отщепления фрагмента с Мм ~5 кДа. Специфический протеолиз – один из наиболее характерных для апоптоза биохимических процессов – обеспечивается многоступенчатой активацией специфических для апоптоза протеаз – каспаз. Поскольку активация каспаз характерна для апоптической, но не для некротической гибели клеток, мы предположили, что в случае короткоцепочечных производных ТФ протеолиз DT-диафаразы катализируется иными энзимами. Наиболее вероятным представляется участие в данном процессе протеолитических энзимов лизосом – катепсинов. О правомерности данного допущения свидетельствует установленный нами ранее факт нарушения короткоцепочечными производными ТФ интеграции мембран лизосом, а также данные литературы о существовании формы гибели клеток, которая зависима от лизосом и опосредуется пермеабиллизацией их мембран и выходом катепсинов в цитозоль клетки. Известно также, что клетки, дефицитные по катепсину D, устойчивы к проапоптическому действию ТС.

Таким образом, можно сделать вывод, что цитотоксическое действие на тимоциты крысы короткоцепочечных производных ТФ и α -ТС сопровождается снижением активности и протеолитической деградацией DT-диафаразы. Антиапоптический эффект α -ТФ не связан с изменением содержания энзима.

ЦЕРУЛОПЛАЗМІН І КОМПОНЕНТНИЙ СКЛАД ПРОТЕЇНІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА РОЗВИТКУ РЕЗИСТЕНТНОЇ ПУХЛИНИ

ПЕТРУШЕНКО А. М., ЛЕУС І. В., ГОРІЛА М. В., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: anastasiya.petrushenko.0403@mail.ru*

Протеїни крові – багатокомпонентна та поліфункціональна динамічна система, що відіграє значну адаптаційну роль в організмі, проте є маловивченими у феномені хіміотерапевтичної резистентності за розвитку новоутворень. Одним із важливих діагностичних протеїнів крові є церулоплазмін (ЦП), рівень якого зростає під час багатьох запальних та некротичних процесів, канцерогенезі та знижується у разі важких пошкоджень печінки, за нефротичного синдрому та ентеропатій [Arner, 2014]. Нещодавно було показано, що за розвитку звичайної карциноми Герена і введення цисплатину відбувається явище гострої гіпопротеїнемії та зміна компонентного складу протеїнів крові щурів [Кленіна, 2011].

Метою роботи було вивчення компонентного складу протеїнів та концентрації ЦП в крові щурів із резистентною до цисплатину карциномою Герена за введення цисплатину.

Експеримент проводили на білих щурах лінії Вістар, яким було трансплантовано резистентну до цисплатину (сPt) карциному Герена. сPt вводили за [Леус, 2012]. Визначали вміст загального протеїну, компонентний склад протеїнових фракцій та рівень ЦП за загальноприйнятими методами.

Розвиток звичайної карциноми Герена призводить до зниження концентрації загального протеїну крові на 57%, а резистентної – на 47%; концентрація альбумінів знижується на 33 та 28% відповідно; а β -глобулінів – на 56 та 69%; γ -глобулінів – на 44 та 17%. Отже, розвиток як звичайної так і резистентної карциноми супроводжується гіпопротеїнемією і зниженням концентрації всіх вищеперахованих фракцій. Проте, слід відмітити незначне зниження концентрації γ -глобулінів у крові щурів із резистентною карциномою. Особливі відмінності знайдено у вмісті α_2 -глобулінової фракції (фракція протеїнів гострої фази) та концентрації ЦП, який входить саме до цієї фракції: якщо в крові щурів зі звичайною карциномою вміст цієї фракції підвищується на 60% і ЦП підвищується практично у 4 рази порівняно з контролем, то підвищення концентрації α_2 -глобулінів у щурів із резистентною карциномою становить тільки 33%, а концентрація ЦП знижується на 25% порівняно з контролем. Введення сPt, який більш істотно пригнічує ріст звичайної карциноми, ніж резистентної, також призводить до гіпопротеїнемії з подібним до описаного вище співвідношенням протеїнових фракцій, проте концентрація ЦП у крові щурів зі звичайною карциномою перевищує таку в групі з резистентною більше ніж у 8 разів. Така значна відмінність в експресії ЦП в крові щурів зі звичайною і резистентною карциномою Герена може свідчити про різний метаболізм міді в клітинах цих пухлин, оскільки відомо, що експресія генів купрумхелатування в гепатоцитах пухлиноносіїв тісно пов'язана із прогресією, метастазуванням пухлини, ангиогенезом [Babich, 2013]. Оскільки ЦП є поліфункціональним металоглікопротеїном, не виключена його роль у регуляції оксидативного стресу [Nealy, 2007], який відіграє істотну роль у виникненні хіміотерапевтичної резистентності [Spitz, 2012].

Отже, вперше показано значні зміни компонентного складу протеїнів, переважно у фракції протеїнів гострої фази, та особливо у концентрації ЦП в крові щурів зі звичайною та резистентною до сPt карциномою Герена, які знайдено в групах щурів-пухлиноносіїв та ще значніше виявлялися за введення сPt; зроблено припущення про значну роль метаболізму міді у формуванні явища хіміотерапевтичної резистентності.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ХОЛОДУ НА АКТИНОВІ ФІЛАМЕНТИ КЛІТИН *Arabidopsis thaliana*

ПЛОХОВСЬКА С. Г., ЄМЕЦЬ А. І.

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

Рослинні організми в природних умовах дуже часто піддаються впливу несприятливих факторів навколишнього середовища. Низька температура є одним із найважливіших абіотичних чинників, що обмежує ріст і розвиток рослин. Однією з мішеней впливу холоду може бути цитоскелет (мікротрубочки та актинові філаменти) рослинної клітини, який регулює важливі процеси життєдіяльності клітин рослин. У низці робіт показано, що низька температура призводить до істотних змін організації мікротрубочок, зокрема до їх деполімеризації (Willin and Stromberg, 1995; Zhao, 2003). Вплив холоду (+0,5 °C) на проростки *Arabidopsis* призводить до деполімеризації кортикальних мікротрубочок у клітинах перехідної зони, зони розтягування та диференціації головних коренів (Sheremet, 2011).

Вперше нами були зроблені спроби вивчити вплив низької температури на ріст, морфологію та організацію актинових філаментів у клітинах головних коренів 4-денних проростків *Arabidopsis thaliana*, що експресують химерний ген *GFP* (green fluorescent protein) – *fabD2* (fibrin actin-binding domain 2), який дозволяє візуалізувати актинові філаменти в клітинах цієї лінії *in vivo* за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопу LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина). Встановлено, що обробка холодом (+4 °C; +0,5 °C) протягом 24, 48 и 72 год чинить інгібувальний вплив на ріст коренів *A. thaliana* (*GFP* - *FABD2*). Так, через 24 год приріст головних коренів зменшується в 2,5–2,6 раза, через 48 год в 2,9–3,0 раза, через 72 год – в 3,2–3,3 раза. Зроблено припущення, що інгібування росту головних коренів низькими температурами може бути результатом їх впливу на поділ та/або елонгацію клітин. Також було встановлено, що обробка температурою +0,5 °C спричинює анізотропне збільшення діаметра епідермальних клітин зони розтягнення, а обробка температурою +4 °C ініціює формування ектопічних кореневих волосків та збільшення їх кількості у зоні диференціації. Водночас спостерігали зміни і у вихідній організації актинових філаментів у клітинах різних зон головних коренів *A. thaliana*. Так, було встановлено, що в інтерфазних меристематичних клітинах необроблених коренів *A. thaliana* (*GFP-FABD2*) вони являють собою тонку і високодинамічну сітчасту структуру, а в епідермальних клітинах і клітинах кортексу зон розтягнення і диференціації – подовжені закручені товсті тяжі. Однак після обробки коренів температурою +4 °C протягом 1 год спостерігається часткова деполімеризація актинових філаментів, а після 2 год обробки в деяких випадках їх повна деполімеризація. У більшості клітин перехідної зони актинові філаменти дезорієнтуються, а в окремих клітинах виявляються лише їх поодинокі довгі тяжі. Встановлено, що особливу чутливість до дії низької температури мають актинові філаменти в диференційованих клітинах, зокрема в клітинах кореневих волосків, де вони дезорієнтуються або повністю деполімеризуються, що може призводити до значних порушень ініціації, формування та подальшого їх росту.

EXPRESSION OF GENES ENGAGED IN ISGYLATION DURING THE EARLY STAGE OF LIVER REGENERATION^{1,2}*POLIEZHAIEVA T. A., ²KUKLIN A. V., ²OBOLENSKAYA M. Yu.*¹*Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv*²*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: TPolezhaeva@mail.ru*

It has been recently reported that expression of interferon alpha (Ifn α) is upregulated during the early stage of rat liver regeneration. Ifn α is a cytokine that induces interferon stimulated genes, particularly the proteins of ISGylation system. ISGylation is a post-translational modification of proteins by covalent attachment of Isg15 protein to the target proteins with the subsequent changes of their biological properties. ISGylation strongly resembles ubiquitination by the three reactions sequentially catalyzed by the specific enzymes – activation of Isg15 by UbelL, conjugation – by Ubch8 and ligation – by Trim25. An enzyme Usp18 catalyzes a detachment of ISG15 from the proteins (deISGylation). The (de)ISGylation has impact on different cellular processes like antiviral response, translation, cell cycle regulation, nuclear transport, signalling etc. though the specific target proteins and their properties after modification are poorly identified.

The aim of this study was to determine the expression of *Isg15*, *Ubell*, *UbcH8*, *Trim25* and *Usp18* genes in rat liver during the processes of G₀/S cell cycle transition induced by partial hepatectomy (PHx) and acute phase response induced by laparotomy (LAP).

Male rats 200–250 g underwent classical operation of 2/3 PH or LAP. The liver samples excised from each animal during PH were used as the control to the experimental ones from the same animal in 1, 3, 6 and 12 h post PH. Total RNA was isolated using TRIzol and its quality was evaluated by the standard characteristics. Absolute mRNA content was assessed by reverse transcription and quantitative real-time PCR and expressed in copies of RNA per ng of total RNA. The isolated and purified amplicons of the corresponding cDNAs were used to the construction of standard curves for the absolute quantification of the amount of RNAs.

There are substantial changes in the ratio of ISG15 mRNA and mRNAs that encode the enzymes of ISGylation system. Considering the mRNA content of ISG15 as one unit at each time point, the balance *ISG15/Ubell/UbcH8/Trim25/Usp18* in the control tissue will be equal to 1/0.1/0.73/1.5/1.78. After LAP the proportion of mRNAs coding the enzymes substantially decreases in relation to that of ISG15 amount and gradually returns to the initial values till 12 h postsurgery. During the liver restoration process this proportions acquire the following forms: 1 hour – 1/0.1/0.7/1.1/2.3; 3 hour – 1/0.2/0.8/2.4/3.9; 6 hour – 1/0.2/1.4/4.6/5.0 and 12 hour – 1/0.2/2.2/6.3/3.5. The amount of *Isg15* and *Ubell* RNAs synchronously decreases nearly two times but their ratio remains constant. The amount of *UbcH8* RNA changes not significantly but at the background of substantial decrease of *Isg15* RNA the ratio *Ubch8/Isg15* increases at 6 and 12 h after PH. The amount of *Trim25* gradually increases to 12 h while the amount of *Usp18* RNA is the highest at 3 and 6 h and returns to the initial values to 12 h.

Liver transition from quiescence to proliferation is followed by changes in the RNA content that encode the proteins of ISGylation system in a manner that the balance may be shifted from the process of ISGylation to deISGylation.

ВИВЧЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ КЛАСТЕРНОЇ СПОЛУКИ РЕНІЮ З ФЕРУЛАТНИМИ ЛІГАНДАМИ

¹ПОЛОХІНА К. В., ²ГОЛІЧЕНКО О. А., ¹БАБІЙ С. О.,
²ШТЕМЕНКО О. В., ¹ШТЕМЕНКО Н. І.

¹Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
²Український державний хіміко-технологічний університет, Дніпропетровськ;
e-mail: contra89me@gmail.com

Серед металоорганічних сполук, що знаходять все більше використання в медичній практиці, кластерні сполуки ренію з почверним зв'язком є одними з найперспективніших завдяки низькій токсичності і антиоксидантним властивостям [Shtemenko, 2013]. Показано, що протипухлинна активність цих сполук залежить від структури органічних лігандів та способу їх орієнтації (*цис*-, *транс*-) навколо кластерного фрагмента Re_2^{6+} . Так, кластерна сполука диренію з лігандами – похідними γ -аміномасляної кислоти у *цис*-положеннях – виявляє 60% протипухлинний ефект, у той час як аналоги з алкільними лігандами в середньому 20–35% [Shtemenko, 2009]. В той же час відомо, що куркуміноїди є природними антираковими сполуками [Anand, 2008], а куркумін за своєю структурою є димером ферулової кислоти. Отже, метою роботи було дослідити протипухлинну активність нещодавно синтезованого *біс*-диметилсульфоксид-*цис*-тетрахлориди- μ -ферулатодиренію(III), $(\text{cisRe}_2(\text{RCOO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{DMCO})$, де $\text{R} = \text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CH}-$) (I) в експериментах *in vivo* та вивчити взаємодію цієї сполуки з ДНК *in vitro*.

Експерименти *in vivo* проводили на щурах із карциномою Герена. Введення цисплатину і ліпосомної форми I проводили за [Shtemenko, 2007]; функціональний стан нирок вивчали за [Бабій, 2011]; взаємодії I з ДНК тимуса теляти досліджували методом електронної спектроскопії (область поглинання 260 нм), визначенням температури плавлення та методом візкозиметрії.

Одержані дані про значну протипухлинну активність кластерної сполуки ренію (гальмування пухлини на 98,9%), яка перевищує активність цисплатину. Введення I і протипухлинної системи реній-платина характеризується зниженням активності діагностичних ензимів в сечі дослідних щурів здебільшого до контрольних значень. Ці дані підтверджують нефростабілізуючі властивості кластерної сполуки ренію, які виявляються як за розвитку пухлини, так і за введення цисплатину. Електронні спектри поглинання ДНК у присутності зростаючої кількості I виявляють гіперхромний ефект, характерний для явища вивільнення нуклеїнових основ із комплементарних взаємодій. За додавання I до ДНК гіперхромізм посилюється, також з'являється нова смуга поглинання (~330 нм), що вказує на утворення ковалентних аддуктів ДНК-I. Підтвердженням ковалентного зв'язування сполуки I з нуклеїновими основами ДНК є також підвищена температура плавлення ДНК-I порівняно з вихідною ДНК, що подібне до відомих характеристик аддуктів ДНК з комплексами платини. Розраховане значення константи зв'язування K_b для I дорівнює $1,041 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Знайдене K_b для I менше, ніж відоме значення для класичних інтеркаляторів та має один порядок із величинами K_b дикарбоксилатів диренію, для яких доведено ковалентну взаємодію з ДНК через аденін і гуанін [Chifotides, Dunbar, 2007–2009].

Отже, показано значну протипухлинну активність кластерної сполуки ренію з ферулатними лігандами, яка перевищує активність раніше синтезованих сполук диренію, що відкриває нові перспективи спрямованого синтезу антиканцерогенних сполук, які містять кластерний фрагмент і біологічно активні ліганди. Доведено ковалентну взаємодію кластерної сполуки ренію з ферулатними лігандами із ДНК.

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ СИНТЕЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С РАЗЛИЧНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ В КОЖЕ ПРИ ЕЁ ДЕФОРМАЦИИ *IN VITRO*

ПОНОМАРЕНКО А. Н., БАБИЧ Р. Ю., КОСТИНА Т. В., МЕЛЬНИК Н. И.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: a.n.ponomarenko@mail.ru*

Гиалуроновая кислота (ГК) низкой (до 100 кДа), средней (100–900 кДа) и высокой (выше 1000 кДа) молекулярной массы (Мм) образуется под действием гиалуронат-синтетаз HAS3, HAS2 и HAS1 соответственно. В коже в нормальных условиях в основном активна HAS1, что обуславливает преобладание высокомолекулярной формы ГК. Известно, что деформация соединительной ткани вызывает изменение метаболизма фибробластов, приводящее к перераспределению удельного содержания протеинов межклеточного матрикса. Однако сведений о воздействии деформации на возможные изменения состава гликозаминогликанов (ГАГ) матрикса до настоящего времени не было. В работе исследовано влияние механической деформации кожи крыс на удельное содержание в ней ГК с низкой, средней и высокой Мм.

Исследования проведены на коже спины беспородных белых крыс 3-месячного возраста. Образцы кожи извлекали после декапитации животных, проведенной под эфирным наркозом. После удаления шерсти и подкожного жирового слоя образцы инкубировали *in vitro* в среде Рингера–Кребса при температуре +37 °С под действием статического механического напряжения в диапазоне 0–0,12 МН/м². Кожу гидролизовали папаином и коллагеназой, суммарные ГАГ осаждали из гидролизата 2%-ым хлористым цетилпиридином. ГК из общих ГАГ выделяли ионообменной хроматографией на колонке со смолой Dowex 1×2 (200–400 меш) определяли Мм молекул ГК. Гель-фильтрацией на смоле Sephacryl HR-400 (50 μm). Концентрацию ГК определяли карбазоловой реакцией на D-глюкуроновую кислоту.

Показано, что в контроле, без деформации кожи, 93% ГК составляет фракция с Мм ≥ 1000 кДа, 6% – с Мм = 200–1000 кДа и не более 2% – с Мм до 100 кДа. Зависимость общего содержания ГАГ в коже от приложенного напряжения имеет форму колоколообразной кривой. В максимуме, при напряжении 0,025 МН/м², общее содержание ГАГ в коже в полтора раза больше, чем в контроле. При этом концентрация низкомолекулярной, среднемолекулярной и высокомолекулярной ГК соответственно составляют 28, 34 и 38%.

При дальнейшем увеличении напряжения до 0,12 МН/м² общее содержание ГАГ в коже снижается, а концентрации низкомолекулярной, среднемолекулярной и высокомолекулярной фракций равны 4; 84 и 12% соответственно.

Таким образом, деформация соединительной ткани вызывает перераспределение фракций ГАГ с различными Мм. Полученные результаты указывает на то, что механическое напряжение в ткани может регулировать содержание различных ГАГ, изменяя либо активность гиалуронат-синтетаз путем изменения степени экспрессии генов *HAS3*, *HAS2* и *HAS1*, либо активности гиалуронидаз.

**ЗБІЛЬШЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ФАКТОРІВ
РОСТУ В ПІДШКІРНІЙ ЖИРОВІЙ ТКАНИНІ
В ЧОЛОВІКІВ З ОЖИРІННЯМ І ПОРУШЕННЯМ
ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ГЛЮКОЗИ**

^{1,2}РАТУШНА О. О., ²БАШТА Ю. М., ¹МІНЧЕНКО О. Г.

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

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: ratushnaoksana@hotmail.com

Фактори росту відіграють важливу роль у регуляції процесів проліферації та міграції клітин у різних тканинах, у тому числі і у підшкірній жировій тканині за ожиріння, але детальні молекулярні механізми розвитку ожиріння та його ускладнень вивчені ще недостатньо. Метою роботи було вивчити рівень експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *SFRP2*, *SERPINE1*, *CCDC80* та *TPD52* у підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і нормальною або порушеною толерантністю до глюкози порівняно з групою нормальних осіб для виявлення тих генів, зміна експресії яких може бути пов'язана як із розвитком ожиріння, так і його ускладнень.

Рівень експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *SFRP2*, *SERPINE1*, *CCDC80* та *TPD52*, а також β -актину як контрольного гена, досліджували в підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням та нормальною або порушеною толерантністю до глюкози порівняно з групою нормальних осіб методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті «The 7900 HT Fast Real-Time PCR System» (Applied Biosystems), використовуючи Absolute QPCR SYBR-Green Mix (Thermo Scientific, Велика Британія) та специфічні для кожного гена пари праймерів (Sigma-Aldrich, США).

Встановлено, що рівень експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *SFRP2*, *SERPINE1*, *CCDC80* та *TPD52* в підшкірній тканині чоловіків з ожирінням й нормальною толерантністю до глюкози підвищений порівняно з контрольною групою, але вираженіші зміни виявлено для генів *SERPINE1* та *CTGF*. За умов ожиріння, ускладненого порушеною толерантністю до глюкози, рівень експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *MEST*, *SERPINE1*, *CCDC80* та *TPD52* в підшкірній жировій тканині також є підвищеним порівняно з контрольною групою за винятком гена *SFRP2*, але за порівняння значень рівня експресії цих генів з даними, виявленими в групі чоловіків з ожирінням і нормальною толерантністю до глюкози, зміни є різноспрямованими. Так, рівень експресії генів *CTGF*, *MYLK*, *CCDC80*, *SFRP2* та *TPD52* в підшкірній жировій тканині чоловіків з ожирінням і порушеною толерантністю до глюкози при цьому знижується, а для гена *SERPINE1* було виявлено збільшення рівня експресії за відсутності істотних змін у рівні експресії гена *MEST*.

Результати даної роботи вказують на те, що в підшкірній жировій тканині чоловіків за умов ожиріння посилюється експресія генів низки важливих факторів, що контролюють процеси проліферації, а особливо генів *SERPINE1* та *CTGF*, але з порушенням толерантності до глюкози асоціюється збільшення рівня експресії лише гена *SERPINE1* та зниження рівня експресії більшості досліджених генів: *CTGF*, *MYLK*, *CCDC80*, *SFRP2* і *TPD52*.

СИНТЕЗ, СКЛАД ТА СТРУКТУРА ПРОТЕЇНІВ ЛИЧИНОК ЧОРНОТІЛКИ *Tenebrio molitor* ПІД ЧАС ХОЛОДОВОЇ АКЛІМАЦІЇ

РЕЛІНА Л. І., ГРИЩЕНКОВА О. О., ТРЕТЯК Д. В., ГУЛЕВСЬКИЙ О. К.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: lianaisaakovna@gmail.com

Холодостійкі личинки *Tenebrio molitor* (род. *Tenebrionidae*) мають цілий комплекс захисних механізмів, які забезпечують їх виживання за низьких температур. Інгібіторний аналіз, проведений за допомогою антибіотиків, що пригнічують синтез протеїнів (циклогексиміду) та РНК (α -аманітину) свідчить про те, що під час холодової аклімації дійсно відбувається синтез протеїнів та РНК *de novo*. Використовуючи метод SDS-електрофорезу в ПААГ було показано, що після двотижневої аклімації в умовах зниженої температури 5–7 °С у личинок *T. molitor* з'являється новий протеїн з Мм 65 кДа, який відсутній у більшості комах при кімнатній температурі. На можливість синтезу цього протеїну *de novo* вказує істотне кількісне зменшення цієї смуги в протеїнових зразках особин, яким напередодні аклімації вводили циклогексимід. Ці зміни мають лабільний характер, оскільки після деаклімації протягом 7 діб при кімнатній температурі зазначений протеїн зустрічається з такою самою частотою, як і до аклімації. Логічно припустити, що низькі температури спричиняють також і структурні зміни протеїнових молекул. У разі використання органічного барвника бромтимолового синього, який за нейтральних значень рН зв'язується із протеїнами за рахунок гідрофобних взаємодій, виявлено, що гідрофобні області в аклімованих личинок доступніші розчиннику. Відтак, в процесі аклімації до низьких температур протеїни личинок *T. molitor* зазнають структурних змін, які полягають у збільшенні неполярних поверхонь, експонованих у розчинник, для забезпечення конформаційної гнучкості. Доцільність таких змін зумовлена необхідністю зберігання оптимального поєднання функції і структури протеїнових молекул у змінних умовах існування організму. Таким чином, у личинок *T. molitor* за холодової аклімації відбувається синтез протеїнів та РНК *de novo*, змінюється якісний склад протеїнів та фізико-хімічні властивості їх у бік більшої гідрофобності зовнішніх ділянок.

РЕГУЛЯЦІЯ ПРОЛІФЕРАЦІЇ І ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ДОРΟΣЛОЇ ЛЮДИНИ ТРОМБОЦИТАРНИМ ЛІЗАТОМ

РОГУЛЬСЬКА О. Ю., ПЕТРЕНКО Ю. О., ЧЕРКАШИНА Д. В.,
МАЗУР С. П., ВОЛКОВА Н. О., ПЕТРЕНКО О. Ю.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: alexander_petrenko@cryo.org.ua

Жирова тканина є доступним джерелом мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (МСК) для регенеративної медицини і тканинної інженерії. Застосування МСК у клінічній практиці обумовлює необхідність пошуку безсироваткових середовищ культивування, здатних підтримувати оптимальні умови росту і диференціювання клітин. Метою цієї роботи було порівняльне оцінювання проліферативно-диференційовального потенціалу МСК за культивування в середовищах, що містять ембріональну сироватку (ЕС) або тромбоцитарний лізат (ТЛ).

Для одержання ТЛ цільну кров дорослих донорів фракціонували шляхом двократного центрифугування. Після видалення бідної тромбоцитами плазми, одержаний препарат ($\sim 3 \times 10^{10}$ тромбоцитів/мл) заморожували і зберігали при -20 °С. Для нівелювання індивідуальних відмінностей аліквоти ТЛ від 5 донорів перед використанням змішували, центрифугували і фільтрували. У ТЛ імуноензимним методом визначали вміст факторів росту ендотелію судин (ФРЕС), епідермісу (ЕФР), тромбоцитів

(ФРТ-ВВ), нервів (ФРН-β), стовбурових клітин (ФРСК), фібробластів (ФРФ-β), трансформуючого фактора росту (ТФР-β) і фактора некрозу пухлини (ФНОα) за допомогою набору Human Growth Factor ELISA Strip II (Signosis, США), а також фактора росту гепатоцитів (Німеччина) (Human HGF ELISA Kit, RayBiotech, США).

У роботі використовували МСК жирової тканини дорослої людини 4–6-го пасажів. Експансію МСК проводили в середовищі α-МЕМ, доповненому 10% ЕС або 10% ТЛ. Адіпогенне і остеогенне диференціювання проводили в середовищах, що містять специфічні індуктори, і виявляли за накопиченням ліпідів, які забарвлювались Oil Red O, або експресією клітинами лужної фосфатази.

Культикування МСК жирової тканини в присутності 10% ЕС протягом 7 діб призводить до збільшення кількості клітин у 1,5–2,2 раза. У середовищі, що містить 10% ТЛ, проліферативна активність МСК в 3 рази вище. Під час культивування МСК у присутності ЕС виявлено 3 типи колоній, які відрізняються щільністю упаковки та морфологічними особливостями клітин (щільні, змішані і дифузні). У разі доповнення середовища ТЛ виявляються колонії більшого розміру, а їх співвідношення змінюється на користь щільних і змішаних. При цьому кількість новоутворених колоній в 1,6 раза вище. МСК після експансії в середовищі з ТЛ зберігали здатність до індукованого диференціювання, причому ефективність їх остеогенного диференціювання на 15% вище, ніж у МСК, що пройшли експансію в ЕС. Розмір внутрішньоклітинних ліпідних включень у ТЛ-культурах менше, ніж у разі використання ЕС, хоча кількість клітин, які вступили в адіпогенне диференціювання, не відрізняється. Спонтанне диференціювання в обох групах становить менше 4%.

Аналізом ТЛ на наявність ростових факторів встановлено, що він містить ФРЕС, ЕФР, ФРТ-ВВ, ФРН-β, ФНП-α, ФРФ-β і слідову кількість ФРН. ТФР-β і ФРСК не виявлено. Присутність такого спектра біологічно активних речовин – відомих регуляторів росту, проліферації і диференціювання клітин, багато в чому обумовлює потенціал ТЛ, що отримало підтвердження в нашій роботі.

Таким чином, результати роботи демонструють, що тромбоцитарний лізат є перспективним природним замінником ксеногенної сироватки і може бути використаний за розробки технологій культивування МСК для клінічної практики.

СТАН СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТА ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У КРОВІ ТА ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ІНТОКСИКАЦІЇ ХЛОРПІРИФОСОМ

РОСАЛОВСЬКИЙ В. П., САЛИГА Ю. Т.

*Інститут біології тварин НААН України, Львів;
e-mail: ros.volodymyr@gmail.com*

Хлорпірифос (ХПФ) – фосфороорганічна сполука, токсична дія якої на організм донедавна пояснювалася в основному інгібуванням нею ацетилхолінергетичної активності. Але останнім часом було виявлено інші, незалежні від згаданого ензиму біохімічні шляхи токсичного впливу ХПФ. Найвагомим з них є, очевидно, індукування цією сполукою оксидативного стресу і спричинення тим самим патологічних змін у різних системах та органах, особливо у центральній нервовій системі. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідити характер змін ключових індикативних показників системи антиоксидантного захисту та пероксидного окислення ліпідів у крові та головному мозку щурів після їх інтоксикації ХПФ.

Дослідження були проведені на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою тіла 200–220 г. Тваринам дослідних груп одноразово внутрішньоочеревинно вводили ХПФ з розрахунку 15 і 30 мг/кг. Через 24 год проводили евтаназію тварин, після чого відразу виділяли мозок та ізолювали з нього гіпокамп, мозочок і кору великих півкуль. У виділених відділах головного мозку, а також у крові

визначали активність супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, а також вміст відновленого глутатіону.

Виявлено, що отруєння тварин ХПФ призводить до активації процесів пероксидного окислення у плазмі крові, що виражається, зокрема, у зростанні вмісту ТБК-активних продуктів у дослідних щурів. Одночасно в тварин дослідних груп відбувається зниження супероксиддисмутази активності. Також встановлено, що інтоксикація щурів ХПФ спричинює зміни ключових ензиматичних параметрів антиоксидантної системи в тканинах головного мозку. Відмінності антиоксидантних показників у різних відділах головного мозку під впливом ХПФ, очевидно, залежать від їхніх морфофункціональних характеристик, а також від особливостей організації і роботи в них нейрональних мереж. Так у корі великих півкуль і гіпокампі переважають збуджуючі нейрони, які як нейротрансмітер вивільняють глутамат. На противагу цьому у мозочку домінуючу роль відіграють ГАМК-ергічні клітини, які особливо чутливі до оксидативного стресу.

Через 24 год після одноразового внутрішньочеревинного введення тваринам хлорпірифосу в дозах 15 і 30 мг/кг спостерігається пригнічення активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та зменшується вміст відновленого глутатіону у досліджуваних відділах мозку. Виявлено, що різні відділи головного мозку відрізняються за активністю антирадикального захисту. Це свідчить про різну інтенсивність прооксидантно-антиоксидантних процесів, які в них відбуваються. Найвища інтенсивність антиоксидантних процесів спостерігається у великих півкулях головного мозку, найнижча – у мозочку.

Одержані результати дозволяють стверджувати про тісний взаємозв'язок між станом антиоксидантної системи організму і токсичними ефектами фосфороорганічних сполук, зокрема хлорпірифосу.

ВПЛИВ ГІПЕРТЕРМІЇ НА ФОРМУВАННЯ РЕЗЕРВІВ ВІЛЬНИХ АМІНОКИСЛОТ ЗАЛЕЖНО ВІД ЙОДНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ ОРГАНІЗМУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

РОСТОКА Л. М., ТУРЯНИЦЯ І. М., РЕЙТИ Г. Е.

*ДВНЗ «Ужгородський національний університет», Україна;
e-mail: rostoka@yandex.ru*

Відомо, що стрес-синдром носить системний характер і реалізується з участю нейрогенних та гуморальних факторів. Стрес значно впливає на функцію щитовидної залози, гормонам якої належить провідна роль у регуляції протеїнового (зокрема, амінокислот), ліпідного, вуглеводного і метаболізму в цілому, у регуляції інтенсивності біоенергетичних реакцій клітини, адаптаційно-трофічних реакцій організму, регуляції імунітету. Дефіцит йоду у навколишньому середовищі призводить до розвитку йодної недостатності і порушення функції щитовидної залози.

Метою роботи було вивчення впливу гіпертермії на формування резервів вільних амінокислот (ВАК) в сироватці крові та тканинах білих щурів залежно від йодної забезпеченості організму.

Досліди проведено на 48 однорічних білих щурах. Тварин першої група (24 щура) утримували на стандартному раціоні віварію, другої група протягом 3 міс. – на малойодному раціоні, що включав пшеницю, овес та кукурудзу, вирощені в гірських районах Карпат – біогеохімічних регіонах, що характеризуються недостатністю мікроелементу йоду в доквіллі. Експериментальний перегрів у тварин був спричинений підвищенням температури навколишнього середовища. Тварин поміщали в повітряний термостат з високою температурою (45 ± 1 °C). Попередньо тварин розділили на три групи: 1-ша група знаходилась в термостаті 7, 2-га – 20, 3-тя – 50 хв. Тварин кожної групи було поділено на 2 підгрупи, з яких у першій відтворювалась гіпертермія в умовах повноцінного раціону, в другій – на фоні малойодної дієти. Кількісне визначення ВАК в сироватці крові та тканинах проводили методом одновимірної нисхідної хроматографії на знесоленому папері FN-1 (Німеччина).

Підвищена температура зовнішнього середовища в умовах повноцінного раціону спричинює перебудову тканинного пулу ВАК. При цьому найхарактернішим є зменшення резервів більшості ВАК у сироватці крові, головному мозку та скелетних м'язах внаслідок дії тепла впродовж 7 хв; їх зростання в сироватці крові, тканині печінки та серця за 20-хвилинного перегріву; накопичення резервів більшості ВАК у сироватці крові, печінці, серці, мозку та нирках при 50-хвилинній гіпертермії. Зменшення тканинних резервів ВАК у разі короткочасної теплової дії, вірогідно, пов'язане з інтенсивнішим їх використанням на потреби тканин, а накопичення фондів більшості ВАК до 50 хв перегріву ми відносимо за рахунок пригнічення їх обміну і вираженого зниження швидкості їх використання в процесі біосинтезу протеїну. Недостатня йодна забезпеченість організму знижує адаптаційні можливості до дії підвищеної температури, здатність тканин до широкомасштабного залучення ВАК у процеси метаболізму, про що свідчить розбалансування АК пулу тканин різного ступеня внаслідок 7, 20 та 50 хв теплової дії.

Таким чином, за гіпертермії в умовах йодної нестачі порівняно з показниками на повноцінному раціоні в білих щурів в сироватці крові і скелетних м'язах відмічено підвищення кількості більшості ВАК, проте в інших тканинах (печінка, серце, головний мозок, нирки) виявлено їх дефіцит. Це, вірогідно, є результатом зниженої йодно-тиреоїдної регуляції метаболізму, зокрема амінокислот, за дії значної йодної недостатності, що вказує на необхідність підвищення вихідної йодної забезпеченості організму в умовах різких змін клімату, температур, або інших стресорів, особливо в умовах екологічно зумовленого йодного дефіциту, що необхідно враховувати для проведення відповідної корекції у разі потрапляння людини в такі умови.

КОРИГУЮЧИЙ ВПЛИВ КОНЦЕНТРАТУ ПРИРОДНОГО ПОЛІФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ З ВИНОГРАДНОГО ВИНА ЗА РАДІОІНДУКОВАНОГО НІТРАТИВНОГО СТРЕСУ

САБАДАШКА М. В., СИБІРНА Н. О.

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: m.sabadashka@meta.ua*

Для фенольних сполук виноградного вина характерними є потужні антиоксидантні властивості, адже вони швидко вловлюють та знешкоджують активні форми кисню та нітрогену. Скавенджеруючи пероксинітрил, поліфеноли унеможливають модифікації протеїнів шляхом нітрування, тим самим запобігають порушенням функціонування окремих ензимів та сигнальних шляхів клітини. Поліфеноли червоного вина можуть бути ефективними радіопротекторами, оскільки ці сполуки виявляють детоксикуючу, протизапальну та імунomodуючу дії.

Метою роботи було дослідити ефект концентрату природного поліфенольного комплексу, одержаного з виноградного вина (концентрат ПК) на показники системи L-аргінін/NO у лейкоцитах щурів за рентгенівського опромінення у дозах 10 та 30 сГр. Активність NO-синтази (NOS), вміст стабільних метаболітів NO (NO_2^- та NO_3^-) та 3'-нітротирозин-модифікованих протеїнів (НТП) визначали в тварин без та за споживання концентрату ПК за 10 діб до та впродовж 7 діб після опромінення.

За впливу іонізуючого випромінювання в дозах 10 та 30 сГр відмічено коливальний характер зміни активності NOS: зниження на 24 год та зростання в подальші терміни експерименту порівняно з контролем. Активність NOS зростає на 24 год в лімфоцитах щурів, яким на фоні дії іонізуючого випромінювання дозою 30 сГр вводили концентрат ПК, та наступне зниження досліджуваного показника на віддаленіші терміни експерименту. За опромінення тварин меншою дозою радіації активність NOS знижується лише на 24 год в 1,4 раза, порівняно з показниками групи опромінених тварин. Показано зниження вмісту NO_2^- на 24 год в 1,8 раза та збільшення у 1,5 та 1,6 раза на 48 і 72 год за вищої дози радіаційного чинника, тоді як за опромінення дозою 10 сГр досліджуваний показник зростає в 1,3 раза на 72 та 168 год порівняно з контролем. За опромінення дозою 30 сГр вміст NO_3^- зростає упро-

довж всього експерименту, а за дії дози 10 сГр – лише на 24 год. За споживання концентрату ПК вміст NO_2^- зростає у 1,6 раза на 24 год після опромінення 30 сГр. Зростання вмісту NO_3^- у 1,2 раза виявлено лише на 48 год. За дії рентгенівського випромінювання (10 сГр) вміст NO_2^- знижується в 1,5 раза на 72 год, а вміст NO_3^- – у 1,2 на 24 год в лейкоцитах щурів, які споживали концентрат ПК порівняно з показниками опромінених тварин. Вміст НТП у лізатах лімфоцитів щурів зростає у всі досліджені терміни експерименту за дії обох доз радіації. Після опромінення дозою 10 сГр за споживання концентрату ПК відмічено зниження вмісту НТП на 24 та 48 год, тоді як за більш високої дози радіації вірогідне зниження цього показника спостерігається на 72 та 168 год порівняно з такими в опромінених щурів.

Встановлено, що дія малих доз іонізуючого випромінювання призводить до порушень у системі L-аргінін/NO та до накопичення НТП, і, отже, до розвитку нітративного стресу в імунокомпетентних клітинах периферичної крові щурів. Поліфеноли з виноградного вина є потужними адаптогенами, оскільки їхнє споживання запобігає розвитку таких радіоіндукованих порушень вже в ранній пострадіаційний період.

ВПЛИВ ДІЄТИ НА ТРИВАЛІСТЬ ЖИТТЯ *Drosophila melanogaster*

СЕМАНІУК У. В., ЮРКЕВИЧ І. С., ЛУЦЯК О. В.

*Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: u_semaniuk@ukr.net*

Продовження тривалості життя і активного довголіття сьогодні активно досліджується та має важливе значення для людства. Часто дослідники пов'язують довголіття людей з характером харчування. Зміни у харчовому раціоні можуть впливати на тривалість життя організмів. Механізми, які лежать в основі цих процесів зберігаються від безхребетних – до ссавців, хоча й недостатньо досліджені. Плодова мушка, *Drosophila melanogaster*, як модельний об'єкт, дозволяє вивчати механізми старіння, поведінки і різноманітних захворювань, пов'язаних із характером харчування. Відносно короткий життєвий цикл, дешевизна і простота в утриманні, а також високий ступінь подібності основних метаболічних шляхів у різних організмів роблять плодону мушку привабливим модельним об'єктом у дослідженнях тривалості життя, а одержані дані можна екстраполювати і на інші види, в тому числі і людину.

Метою роботи було дослідити адаптаційні механізми та зміни в метаболізмі за споживання живильних компонентів (сахарози та дріжджів), що знаходяться роздільно або сумісно в їжі *D. melanogaster*.

В дослідженнях використовували самок *Drosophila melanogaster* лінії *Canton S*. Експериментальне середовище містило комбінації із 3, 6, 12% сахарози (С) та 3, 6, 12% дріжджів (Д) в суміші та роздільно, 1,2% агар-агару, 0,18% ніпагіну. Живильне середовище кожні дві доби замінювали на свіже і фіксували кількість мертвих мух. Криві тривалості життя порівнювали за тестом Log-rank. Плодючість визначали за середньою кількістю відкладених яєць однією мухою. Інтенсивність споживання їжі оцінювали за кількістю мух, які розміщувалися на експериментальних середовищах (розраховували як середнє значення з 4 вимірювань в одні й ті самі проміжки часу). Для визначення вмісту трегалози, її попередньо інкубували в присутності 2,3 од./мл трегалази (0,2% об'єм:об'єм), а глікогену в присутності 70 од./мг амілоглюкозидази (0,8% маса:об'єм) із розщепленням до глюкози. Вміст глюкози визначали колориметрично ензиматичним методом із використанням діагностичного набору за вказівками виробника (Liquic Cor-GLUCOSE, Cormay).

Внаслідок досліджень показано, що в особин, які утримувались на дієтах зі змішаними компонентами, середня тривалість життя та плодючість є вищою порівняно з особинами, які могли обирати між сахарозним або дріжджовим середовищем. Інтенсивність споживання їжі у мух, яких утримува-

ли на роздільній дієті, споживали більше дріжджів – 60%, і тільки 10% мух обирали сахарозу, а решта в час визначень не харчувалась. Вміст глюкози і трегалози в гемолімфі та тілі, глікогену змінювався залежно від концентрації поживних речовин та форми їх надходження.

Узагальнюючи результати роботи можна стверджувати, що в мушок, яких утримували на дієтах зі змішаними компонентами середня тривалість життя та плодючість є вищою, ніж у мушок, яких утримували на роздільних дієтах.

Одержані результати свідчать, що форма, в якій надходять поживні речовини (в суміші або роздільно) впливає на тривалість життя, плодючість та метаболізм у *D. melanogaster*.

ВПЛИВ КЛАСТЕРНИХ СПОЛУК РЕНІЮ НА ОКИСНО-ВІДНОВНИЙ СТАН ТКАНИНИ НИРОК

СЕМЕНОВ С. С., БАБІЙ С. О., АНТРОПОВ С. М., ШТЕМЕНКО Н. І.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: babiy.sveta@gmail.com*

Більшість перехідних металів має вплив на окисно-відновний стан клітин шляхом опосередкованого впливу або прямої взаємодії з компонентами антиоксидантної системи [Sabolic, 2004]. Особливо чутливою до їх дії є глутатіонова система клітин, висока активність якої визначається в нирках [Meirson, 1984; Babiy, 2012]. Це пов'язано з функціональними особливостями цього органу і обумовлює високу чутливість нирок до токсичної дії металоорганічних сполук. У наших попередніх дослідженнях було показано, що введення кластерних сполук ренію (III) щурам у моделі інтоксикації тетрахлорметаном сприяло нормалізації процесів клубочкової фільтрації та каналцевої реабсорбції в нирках експериментальних тварин [Бабій, 2010]. Така дія комплексів ренію, обумовлена гальмуванням вільнорадикальних реакцій *in vivo*, що пов'язано з наявністю почверного зв'язку в їхній структурі. Новосинтезовані сполуки ренію з адамантановими лігандами мають значні антиоксидантні властивості *in vitro*.

Отже, метою роботи було дослідити вплив кластерних сполук ренію з адамантановими лігандами на окисно-відновний стан ниркової тканини у щурів з моделлю інтоксикації тетрахлорметаном та активність глутатіонзалежних антиоксидантних ензимів.

У дослідженні використовували кластерні сполуки ренію в наноліпосомній формі – біс-ацетонітрил-цис-тетрахлороди- μ -адамантилдикарбоксилатодиреній(III) – $\text{Re}_2(\text{HOOC}C_{10}H_{14}\text{COO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{CH}_3\text{CN}$ – I, і біс-диметилсульфоксидо-цис-тетрахлороди- μ -аміноадамантанатодиреній(III) – $\text{Re}_2((\text{NH}_3C_{10}H_{14}\text{COO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{DMSO})\text{Cl}_2$ – II, синтезовані в УДХТУ [Golichenko, 2006]. Модель інтоксикації тетрахлорметаном на щурах та введення I–III проводили за [Бабій, 2010]. Вимірювали активність ензимів: глутатіонредуктази (1.8.1.7), глутатіон пероксидази (1.11.1.9), глутатіон-S-трансферази (2.5.1.18) і γ -глутамілтрансферази (2.3.2.2.) в гомогенаті нирок щурів.

Введення тетрахлорметану спричинювало розвиток оксидативного стресу, що було показано раніше. За введення сполук I і II експериментальним тваринам відбувалося зниження інтенсивності окисних процесів, на що вказує зменшення в нирковій тканині вмісту ТБК-активних продуктів на 57,6%, підвищення вмісту SH-груп і збільшення значення тіол-дисульфідного коефіцієнта в 7,7–10 разів порівняно з групою з тетрахлорметановою інтоксикацією. Показано, що введення тетрахлорметану призводить до зниження концентрації глутатіону (до 2,7 раза порівняно з контролем) та до дисбалансу ензиматичної системи глутатіонового захисту в нирковій тканині; введення сполук ренію призводить до підвищення концентрації глутатіону (в середньому на 33% порівняно з групою щурів, яким вводили тетрахлорметан) у гомогенаті нирок та до нормалізації роботи ензиматичної системи глутатіонового захисту.

Отже, одержані результати свідчать про ефективну антиоксидантну дію сполук I–II у тканині нирок. Механізм їх антиоксидантної дії може бути обумовлений як безпосередньою реакцією почверного зв'язку з радикалами, так і активацією антиоксидантних ензимів. Антиоксидантні властивості Re здійснюються не лише за рахунок почверного зв'язку, як припускалось раніше [Shtemenko, 2008], а також завдяки органічним лігандам, розташованим навколо кластерного фрагмента Re-Re.

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ЗМІНИ МЕТАБОЛІЗМУ В НИРКАХ КРОЛЯ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ХРОНІЧНОЇ ІШЕМІЇ

*СЕРБИНА І. Є., НИКУЛІНА Г. Г., МИГАЛЬ Л. Я.,
ПИРОГОВ В. О., НІКИТАЄВ С. В.*

*ДУ «Інститут урології НАМН України», Київ;
e-mail: irinaserbina@gmail.com*

Порушення ниркової гемодинаміки за патології різного генезу веде до розвитку ішемічного процесу, що призводить до дистрофічно-деструктивних змін як на рівні елементів клітин ниркової паренхіми, так і на рівні всього органу. Поряд з цим, в умовах кисневого голодування відбувається також перебудова всього метаболізму нирки. Морфологічні і метаболічні зміни обумовлюють розлад цілого каскаду біохімічних реакцій, зокрема таких, що каталізуються ензимами тубулярного апарату нефрону. Тому метою роботи було вивчити в експерименті вплив порушення ниркової гемодинаміки на паренхіму нирки на основі дослідження змін активності низки каналцевих ензимів як показників метаболічного та структурно-функціонального стану паренхіми нирки за хронічної ішемії.

Експеримент було проведено на кролях (самки та самці віком до 2 років із масою тіла 2,5–3 кг). В гомогенаті паренхіми нирки було досліджено активність низки ензимів нефротелію: лужної фосфатази (ЛФ) – гідролази (3.1.3.1), що локалізована в клітинній мембрані і бере участь у транспорті фосфору та каталізує гідроліз складних ефірів фосфорної кислоти і органічних сполук; гамма-глутамілтранспептидази (ГГТ) – трансферази (2.3.2.2), за участю якої відбувається транспорт амінокислот крізь клітинну мембрану в процесі реабсорбції із первинної сечі; нейтральної та кислої альфа-глюкозидаз (НАГ та КАГ) – ензимів-гідролаз (3.2.1.20), що локалізовані відповідно в мікосомах та гіалоплазмі (НАГ) та лізосомах нефротелію (КАГ) і які беруть участь в розщепленні олігосахаридів.

Дослідна група складалася з 10 кролів, в яких було змодельовано сегментарну хронічну ішемію шляхом перев'язки лігатурою верхнього полюсу лівої нирки на строк 6–8 місяців. Групою порівняння слугували результати, одержані на 3 здорових кролях (6 нирок).

Активність ЛФ вивчали за швидкістю утворення фенолу за розщеплення фенілфосфату. Активність ГГТ досліджували за швидкістю звільнення пара-нітроаналіну при переносі L-гамма-глутамілового залишку з L-гамма-глутаміл-пара-нітроаналіду на гліцилгліцин. Активність НАГ та КАГ визначали за швидкістю приросту кількості глюкози в пробі за розщеплення мальтози, при цьому вміст глюкози визначали специфічним глюкозооксидазним методом.

Внаслідок проведених експериментів визначено, що в паренхімі нирки в нормі у здорових кролів активність ЛФ становить $442,9 \pm 24,3$ нкат на 1 г сирової тканини, активність ГГТ – $750,7 \pm 47,6$, активність НАГ і КАГ – $266,3 \pm 16,9$ та $148,0 \pm 10,7$ відповідно. Водночас було показано, що за хронічної ішемії в паренхімі лівої ураженої нирки активність вищезазначених ензимів складає $259,2 \pm 47,7$; $533,1 \pm 104,2$; $101,1 \pm 21,6$ та $52,6 \pm 10,5$ нкат на 1 г сирової тканини ($P < 0,01$ – $0,001$ порівняно з нормою). В паренхімі правої інтактною (контрлатеральною) нирки активність ензимів встановлена на рівні $326,6 \pm 59,8$; $667,5 \pm 111,2$; $142,6 \pm 22,5$ та $83,6 \pm 15,9$ нкат на 1 г сирової тканини ($P < 0,01$ – $0,001$ порівняно з нормою).

Як видно із представлених результатів, за хронічної ішемії в паренхімі обох нирок відбуваються значні зміни активності ензимів, що опосередковано може свідчити про зміни ниркового метаболізму.

Найбільших змін за хронічної гіпоксії зазнає ланка обміну вуглеводів (активність НАГ та КАГ). Найменше за цих умов змінюється ланка обміну протеїнів (ГГТ), а саме транспорту амінокислот через клітинну мембрану, що може свідчити про довготривале збереження функції реабсорбції амінокислот із сечі для запобігання надмірної втрати протеїну.

СУМІСНИЙ ВПЛИВ НІКОТИНАМІДУ, АЦЕТИЛ-L-КАРНІТИНУ ТА α -ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ НА ДИСФУНКЦІЇ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-го ТИПУ

¹СЕРГІЙЧУК Ю. Т., ²ТИХОНЕНКО Т. М., ^{1,2}КУЧМЕРОВСЬКА Т. М.

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

e-mail: yuluapentek@gmail.com;

Відомо, що розвиток дисфункцій центральної та периферичної нервової систем за цукрового діабету (ЦД) відбувається внаслідок порушень різних біохімічних процесів. Нервово-психічні розлади в пацієнтів із ЦД можуть виникати завдяки змінам вмісту нейромедіаторів та порушенням функціонування відповідних їм медіаторних систем, зокрема ГАМК-ергічної. У зв'язку з цим метою роботи було з'ясувати зміни вмісту ГАМК у мозку та стан процесів його захвату та вивільнення за експериментального ЦД 2-го типу, а також протестувати сумісну дію нікотинамідом (NAм), ацетил-L-карнітину (АК) та α -ліпоєвої кислоти (α -ЛК).

Експериментальний ЦД 2-го типу спричинювали одноразовим внутрішньочеревним введенням новонародженим щурятм лінії Wistar розчину стрептозотоцину в дозі 80 мг/кг маси тіла. Через 3 місяці після індукції діабету щурів-самців розділили на 3 групи – контрольна, щури з ЦД 2-го типу та щури з ЦД 2-го типу, яким протягом 14 днів сумісно вводили NAм в дозі 100 мг/кг, α -ЛК – 50 мг/кг та АК – 100 мг/кг маси тіла тварин. Концентрацію глюкози визначали за допомогою приладу «Accu-Chek, Roshe Diagnostics». Вміст NAD у мозку щурів визначали ензиматично за Bergmeyer. Синаптосоми та синаптичні мембрани виділяли методом центрифугування в градієнті густини сахарози за методом Abita. Зв'язування NAD синаптичними мембранами досліджували радіолігандним методом з використанням міченого [U-¹⁴C]NAD. Захват та вивільнення ГАМК синаптосомами оцінювали з використанням [U-³H]ГАМК. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Microsoft Excel.

Розвиток ЦД 2-го типу тестували за рівнем глюкози крові. Так, у щурів з ЦД 2-го типу спостерігали підвищення рівня глюкози натще в 1,8 раза порівняно з показниками контролю. Введення досліджуваних сполук призводить до зниження вмісту глюкози в 1,6 раза порівняно з показниками щурів з ЦД 2-го типу. Встановлено, що вміст NAD у мозку щурів з ЦД 2-го типу знижувався на 44% у порівнянні з контролем. Введення досліджуваних сполук діабетичним щурам призводить до підвищення його вмісту на 53% порівняно з показниками за ЦД 2-го типу. Виявлено, зниження зв'язування [U-¹⁴C] NAD синаптосомами на 28% за ЦД 2-го типу порівняно з показниками контролю. Сумісне введення NAм, α -ЛК та АК підвищує рівень зв'язування [U-¹⁴C] NAD на 70% порівняно з показниками щурів з ЦД 2-го типу. В той самий час, зв'язування [U-¹⁴C] NAD синаптичними мембранами головного мозку за ЦД 2-го типу знижується на 34% порівняно з показниками контролю. За введення досліджуваних сполук спостерігали підвищення його зв'язування на 44%. Виявлено, що захват ГАМК синаптосомами мозку щурів в динаміці протягом 7 хв за ЦД 2-го типу знижувався на 18% порівняно з групою контролю. За введення досліджуваних сполук спостерігали часткову нормалізацію захвату ГАМК синаптосомами. Водночас вивільнення ГАМК за ЦД 2-го типу незначною мірою зростає, а впливу сумісного введення досліджуваних сполук не встановлено.

Таким чином, одержані нами результати підтверджують, що сумісне введення досліджуваних сполук може бути використане для покращення функціонування нервових клітин мозку як стратегія

під час лікування ЦД 2-го типу. Позитивна дія на функціонування мозку за ЦД може здійснюватися за рахунок їх впливу на вміст NAD та ГАМК, а також шляхом нормалізації дисфункцій ГАМК-ергічної медіаторної системи.

МЕТОДИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВИВЧЕННЯ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ В БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ШТАМІВ ЕПІДЕРМАЛЬНОГО СТАФІЛОКОКА

СКЛЯР Т. В., ВОРОНКОВА О. С., КРИСЕНКО О. В., ШАТАЛІН Д. Б.

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: microviro@rambler.ru*

Здатність до біоплівкоутворення є типовою властивістю для багатьох мікроорганізмів, розвиток яких пов'язаний із твердими поверхнями. Особливої уваги потребує вивчення біоплівок, що формуються патогенними бактеріями під час розвитку інфекційних уражень. Здатність до утворення біоплівки зумовлює підвищення стійкості їх до факторів довкілля, у тому числі антибіотиків і фагів. Подібні властивості вірогідно обумовлені змінами метаболічної активності клітин, що створюють біоплівки. На жаль, більшість досліджень стосується структурних особливостей біоплівок, у той час як відомості про метаболічні властивості бактерій в плівках розрізнені і не дають повною мірою уявлення про ці процеси. Крім того, слід відмітити, що практично не розроблено методики, здатні визначати інтегративні показники метаболічної активності бактерій у складі біоплівок. Класичні методики її дослідження та процесів трансформації енергії, що використовуються для планктонних культур, є малоінформативними для дослідження метаболізму бактерій у складі біоплівки.

Метою наших досліджень було розроблення методики вивчення таких інтегративних показників метаболізму, як інтенсивність дихання і генерація мембранного потенціалу на різних етапах розвитку біоплівки.

Для визначення інтенсивності дихання сформованої біоплівки було використано електрод Кларка, а для визначення мембранного потенціалу – селективні електроди для проникаючих іонів тетрафенілфосфонію (TRP⁺).

Модифікація, яку вносили в конструкцію кювети, була спрямована на збереження цілісності біоплівки, сформованої культурами епідермального стафілокока за 8 діб, оскільки збереження фізичної цілісності є необхідною умовою для об'єктивної оцінки метаболічної активності біоплівки на різних етапах її розвитку.

Устрій кювети спроектовано з таким розрахунком, щоб мішалка була ізольована та в процесі роботи не пошкоджувала біоплівку. Для цього кювету було розділено на дві частини. Нижня частина захищена циліндричною пластиною товщиною 0,5 мм для розміщення на ній біоплівки, пластина виготовлена з отворами для циркуляції розчину. У верхній частині кювети зроблено вибірку під посадку +0,1 мм для герметичності розташування електрода, передбачені два канали для внесення біомаси, субстратів та інгібіторів. Кювета та пластини виготовлені з акрилового скла.

Встановлено, що швидкість ендogenous дихання штамів епідермального стафілокока у складі 3–8-добової біоплівки змінюється: максимальний показник активності визначали на п'яту добу: він становив 460 ± 23 нмоль $O_2 \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1}$ протеїну, мінімальний показник – 390 ± 21 нмоль $O_2 \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1}$ протеїну – визначено на восьму добу. Показник на третю добу становив 420 ± 19 нмоль $O_2 \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1}$ протеїну. Вивчення динаміки поглинання проникаючих катіонів тетрафенілфосфонію (TRP⁺) як інтегративного показника генерації мембранного потенціалу штамми показало, що порівняно з п'ятою добою на восьму добу культивування поглинання іонів було зниженим на 32%, а на третю – на 19%.

Таким чином, можна констатувати, що розроблені методи вивчення інтенсивності дихання і генерації мембранного потенціалу можуть бути застосовані для вивчення метаболічної активності в нативному стані на різних термінах формування біоплівки.

**EFFECT OF C₁₋₂ MONOHYDRIC ALCOHOLS ON THE GROWTH,
PHOTOSYNTHESIS AND RESPIRATION OF UNICELLULAR
GREEN ALGAE *Chlamydomonas reinhardtii***

¹STEPANOV S. S., ²WALDECK P., ²STORANDT R.,
¹ZOLOTAREVA E., ³OLKHOVYCH O. P.

¹M.G.Holodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: serhiy1986@ukr.net;

²IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Germany;

³Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine

The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* has importance as model for many biotechnological processes and algal biofuels. Availability of a sequenced genome, a proteomic database, and metabolomics protocols benefits the use of *Chlamydomonas* to establish many fundamental aspects of metabolic control in photoautotrophic organisms. Significant stimulation of microalgae growth by exogenic methanol at mixotrophic cultivation was shown for unicellular green algae *Chlorella minutissima*, *Scenedesmus obliquus*, *Botryococcus braunii*. Another alcohol – 2-carbon ethanol, following methanol in the homologous series of monohydric alcohols, is able to enhance the growth of microalga *Euglena gracilis*, being one of the most efficient carbon sources for this microalga. From other hand, it was established that the addition of 0.3% v/v ethanol in the culture medium of *Dunaliella viridis* accompanied by cessation of culture growth and increased intracellular concentrations of DNA, RNA and total protein. Ethanol increases ploidy of the cells and inhibits their metabolism. It was found toxic effects of ethanol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, ethanol inhibited the growth of these algae at a concentration of 0.05%. The ability of C₁₋₂ monohydric alcohols to regulate productivity of *C. reinhardtii* under aerobic conditions in the light has not been investigated. The aim of our study was to determine the effect of exogenic C₁₋₂ monohydric alcohols on productivity of batch culture of *C. reinhardtii* and its effect on photosynthesis and respiration.

Unicellular green alga *C. reinhardtii* was obtained from the microalgae collection of Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine (IBASU-B - 163). The ethanol effects were studied at the stage of exponential growth phase of batch culture. The packed cell volume (PCV) was determined as a measure for the biomass accumulation. The PCV, the volume of the cell pellet in µl, was measured by the centrifugation of a defined volume of the cell suspensions at 1400×g for 5 min in haematocrite tubes (Navakoudis E. 2007). Intensity of visible photosynthesis (A) and dark respiration (R) was determined in the gas phase above the suspension of algae by IRGA method with QUBIT Systems S151 Carbon Dioxide Analyzer (Canada).

In the presence of methanol in the culture medium at a concentration of 25-100 mM PCV was increased compared with control. Best stimulation the growth of autotrophic cultures of *C. reinhardtii* in terms of PCV was observed with addition of 50 mM methanol. When methanol concentration exceeded 100 mM, the growth of *C. reinhardtii* culture was suppressed. Addition of ethanol at a concentration greater than 10 µM reduces the growth of *C. reinhardtii* biomass in in terms of PCV. Ethanol at a concentration of 100 µM inhibits the accumulation of biomass by 23% at a concentration of 1 mM and 10 mM of ethanol inhibits the cellular growth by 33%.

Addition of methanol does not affect the rate of A, since the difference between control and experiment is within the measurement error. Addition of ethanol lead to depression of photosynthesis (A) to 25% compared to controls. By adding methanol R index increased by 23% compared with the control without the addition of methanol. R index of batch culture of *C. reinhardtii* was increased twice by culturing microalgae with ethanol compared to control.

So in conditions of mixotrophic growth the ethanol, unlike methanol, does not stimulate productivity of batch culture *C. reinhardtii*. Also, ethanol 100 times more toxic than methanol. Addition of C₁₋₂ monohydric alcohols increases dark respiration, which may indicate the activation of metabolism. Methanol did not affect the rate of the visible photosynthesis and ethanol inhibits it.

МОДУЛЯЦІЯ ЛИПІДНОГО ОБМЕНА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ, ВИЗВАННИХ ДОКСОРУБИЦИНОМ ИЗМЕНЕНИЙ, ИНГИБИТОРАМИ СФИНГОМИЕЛИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

СТОРОЖЕНКО Г. В., ГАРЬКАВЕНКО В. В.

*НИИ биологии, Харьковский национальный университет
им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: storojenko_g@rambler.ru*

Доксорубицин – препарат, оказывающий мощное цитостатическое действие, применяющийся в химиотерапии онкологических заболеваний различного генеза. Последние исследования демонстрируют новые механизмы действия доксорубицина на клетки различных тканей. Доксорубицин индуцирует краткосрочную активацию анаболизма нейтральных и сфинголипидов. При этом доксорубицин стимулирует накопление в клетках-мишенях церамида – активного метаболита сфингомиелина, обладающего апоптогенными эффектами. Накопление церамида под действием доксорубицина может иметь двойственную природу – за счет стимуляции синтеза *de novo* и повышения активности энзимов сфингомиелиназ, гидролизующих сфингомиелин. Целью нашего исследования является определение модулирующего действия ингибиторов различных групп сфингомиелиназ на эффекты доксорубицина в клетках печени. Одним из характерных эффектов индуцированного доксорубицином накопления церамида является быстрая активация липогенеза. Эксперименты, проведенные с добавлением короткоцепочечных церамидов в культуру изолированных гепатоцитов, показывают, что церамид вызывает активацию синтеза свободных жирных кислот (СЖК) и накопление нейтральных липидов – диацилглицеролов и триглицеролов (ДАГ и ТАГ). Введение доксорубицина в культуру изолированных клеток вызывает накопление ДАГ, ТАГ и фосфолипидов (ФЛ), повышение синтеза СЖК, т.е. эффекты аналогичные добавлению в среду инкубации экзогенного церамида. Введение в культуру клеток, обработанную доксорубицином, ингибиторов сфингомиелиназ (GW4869 – специфического ингибитора нейтральной сфингомиелиназы и имипрамина – ингибитора кислой сфингомиелиназы) подавляет индуцированный цитостатиком липогенез, а также накопление в клетках церамида. Полученные результаты позволяют предположить высокую значимость активации сфингомиелиназ, как кислой, так и нейтральной групп, в стимулированном доксорубицином повышении уровня церамида. Поскольку церамид является мощным индуктором апоптоза, и, вероятно, вносит весомый вклад в развитие цитотоксических эффектов доксорубицина, можно предположить, что применение препаратов, ингибирующих активность сфингомиелиназ, может снижать эффективность цитостатического действия доксорубицина.

ХАРЧОВИЙ РАЦІОН БАТЬКІВ ВПЛИВАЄ НА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНИЙ СТАН НАЩАДКІВ *Drosophila melanogaster*

СТРІЛЬБИЦЬКА О. М., ЮРКЕВИЧ І. С., ЛУЦАК О. В.

*Прикарпатський національний університет
імені Василя Стефаника, Івано-Франківськ, Україна;
e-mail: olya_b08@ukr.net*

Відомо, що велике різноманіття людських хвороб пов'язане із характером харчування матері під час вагітності. Тому фізіолого-біохімічний стан нащадків, а також виникнення таких захворювань, як ожиріння, серцево-судинні захворювання та метаболічний синдром можливо корегувати/лікувати зміною дієти.

Метою роботи було дослідити вплив харчового раціону батьків на фізіолого-біохімічний стан нащадків першого покоління плодової мушки дрозофіли.

Об'єктом дослідження була лабораторна лінія мух *Canton-S Drosophila melanogaster*. На 5-й день життя мух переносили в контейнери, до яких прикріплювали пробірки із 5 мл живильного середовища такого складу (у відсотках маса/об'єм): сахароза/дріжджі – 1С/4Д, 4С/4Д, 10С/4Д, 20С/4Д, 4С/0,25Д, 4С/10Д, 4С/15Д, агар-агар – 1,2%, ніпагін – 0,18%. На 25-й день життя мух було використано для одержання нащадків, яке розвивалось на середовищі 4С/4Д і використовувалось для подальших досліджень. Стійкість до теплового стресу визначали за швидкістю впадання в кому при 44 °С і за швидкістю виходу з неї при 25 °С. Холодовий стрес здійснювали при 0 °С протягом 10 хвилин та реєстрували час виходу при 25 °С. Плодючість мух спричинювали шляхом перенесення мушок у пробірку із середовищем 4С/4Д однієї самки і двох самців на 24 години. Кількість яєць підраховували на 5-, 10-, 15-, 20-й день експерименту. Стійкість до оксидативного стресу визначали шляхом поміщення мух у пробірки, які містили змочений фільтрувальний папір розчином 20 мМ менадіону та 5% сахарози. Стійкість до голодування визначали в мушок, що споживали 0,5% агарози. Кількість мертвих мух за споживання 20 мМ менадіону та голодування підраховували кожні 6 годин. Вміст триацилгліцеролів визначали колориметрично ензиматичним методом із використанням діагностичного набору за вказівками виробника (Liquicor TG, CorMay), що містив реагент № 1 (1-TG) та реагент № 2 (2-TG), а також стандартний розчин ТАГ у концентрації 0,25 ммоль/л.

Вживання самців знижується зі збільшенням вмісту протеїну в дієті батьків. У самок ця тенденція залежить від вмісту вуглеводу. За споживання дієт 1С/4Д та 4С/4Д нащадки першого покоління менш стійкі до дії теплового стресу порівняно з іншими дієтами. У самців першого покоління, батьки яких споживали середовища 10С/4Д та 20С/4Д, чутливіші до холодового стресу приблизно на 20% порівняно із нижчими концентраціями вуглеводів. Менш стійкими до низьких температур є самки, за споживання їхніми батьками середовищ із високим вмістом сахарози. Найвища плодючість спостерігається в самок, батьки яких споживали дієту з найнижчим вмістом протеїну.

Самці, батьки яких споживали середовище 20С/4Д, виявляються стійкішими до 20 мМ менадіону порівняно з 4С/4Д, де особини гинули у 2 рази швидше. Щодо самок, то менш стійкіші були особини, батьків яких утримували на середовищах із високим вмістом протеїну.

Споживання дріжджів в концентрації 4% сприяє незначному підвищенню концентрації ТАГ у батьківського покоління та в першого покоління нащадків, а 10 та 15% знижує кількість ТАГ. Щодо дієти зі зміною вмісту вуглеводу, то підвищення вмісту сахарози сприяє збільшенню вмісту ТАГ у батьківського покоління особин обох статей, однак майже не впливає на накопичення цього ліпиду в їх нащадків.

Отже, споживання дієт із високим вмістом вуглеводів знижує тривалість життя у самок першого покоління, проте підвищує їх стійкість до теплового стресу та знижує резистентність до низьких температур. Споживання високого вмісту протеїну в дієті батьків, призводить до зменшення тривалості життя самців першого покоління.

A TYPE OF ENERGY SUBSTRATE CONSUMED BY THE NERVE TERMINALS INFLUENCES PRESYNAPTIC IGLUR-INDUCED ROS GENERATION

TARASENKO A., KRUPKO O., HIMMELREICH N.

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv*

Challenging the generally accepted view of a primary role for glucose oxidation in brain energetic, so-called astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis suggests that neurons preferentially utilize the lactate over glucose. According to this hypothesis, astrocytes respond to an increase in synaptic activity by intensified glucose consumption and production of lactate/pyruvate. The latter is secreted to the extracellular space to be taken up by neurons for further oxidative degradation.

Our previous study showed that the release of the main inhibitory neurotransmitter GABA from isolated nerve terminals (synaptosomes) under the activation of presynaptic ionotropic glutamate receptors (iGluR) is partially attributed to ROS generation. In the present study we compared the effect of glutamate receptor agonists on ROS production in synaptosomes under conditions, when energy metabolism was supported by either glucose or pyruvate consumption. The experiments were carried out on cortical and hippocampal rat brain nerve terminals using NMDA and kainate as agonists of glutamate receptors. ROS production was measured with the fluorogenic compound dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA),

The obtained results showed that spontaneous ROS generation was much more intensive in synaptosomes supplied with glucose than with pyruvate, suggesting the significant contribution of NADPH oxidase to the total ROS production. This assumption is based on the evidence that NADPH oxidase is widely expressed in neurons and requires NADPH, which is produced during glucose metabolism (in pentose phosphate pathway). It is of interest that in the case of simultaneous presence of both energy substrates in the medium, ROS production was similar to that observed in pyruvate-containing medium, confirming that the synaptosomes preferentially utilized pyruvate over glucose. We also revealed that the type of the energy substrate influenced the relative rate of ROS production evoked by different glutamate receptor agonists. NMDA slightly increased ROS production in nerve terminals consumed glucose and negligibly, if any, in the case of pyruvate consumption, whereas the efficacy of kainate was significantly higher in the medium containing pyruvate than glucose. It should be noted that the main difference between NMDA and kainate action is the total amount of ROS generated evoked by these agonists. The amount of kainate-induced ROS was much higher than of NMDA-induced one. A more potent action of kainate irrespective of the type of energy substrate seems to indicate a dominant role of kainate/AMPA receptors in presynaptic ROS generation during iGluR-induced modulation of neurotransmission.

THE ACTIVITY OF ORNITHINE DECARBOXYLASE IN GASTRIC MUCOSA CELLS UNDER EXPERIMENTAL CARCINOGENESIS

TYMOSHENKO M., KRAVCHENKO O.

*Educational and Scientific Centre «Institute of Biology»
Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: maria.bulavka@gmail.com*

Ornithine decarboxylase (ODC) is the first and key regulatory enzyme in synthesis of polyamines, which are essential for proliferation, differentiation, and migration of mammalian cells so aberrant regulation of ODC is reported to play a role in neoplastic transformation and tumor growth. Polyamines are required for the protooncogene transcription. It has been shown that cellular polyamines are absolutely required for *c-myc* and *c-jun* mRNA synthesis in IEC-6 intestinal cells. Also it has been supposed a participation of protooncogene *c-jun* in ODC transactivation. A potent transcriptional regulator c-Jun is a critical promoter of cellular proliferation, and dysregulated expression and activation of its oncogene are frequently observed in most human cancers including gastric malignancy.

Thus, the aim of the study was to determine the activity of ODC and to reveal whether there was any relation between phospho-c-Jun content and ODC activity in gastric mucosa cells during the gastric cancer development in rats.

The gastric carcinogenesis was initiated in 49 white male rats by 10-week replacement of drinking water by 0.01% solution of a gastric carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), at the same time they were redefined on the diet containing 5% NaCl. After this period expiry the animals were fed with standard vivarium diet till the end of the 24th week. The gastric mucosa cells were extracted at the end of the 4th, 6th, 8th, 10th, 12th, 18th and 24th week. The standard spectrophotometric method was used to determine the

ODC activity. The phospho-c-Jun content was measured by Sandwich ELISA method using the assay kit Path-Scan Phospho-c-Jun (Ser63) (Cell Signaling Technology, USA).

Results: the 4th week of MNNG-stimulated gastroduodenal carcinogenesis was characterized by ODC activity growth and the reference value of phospho-c-Jun in gastric mucosa cells. The established increase of ODC activity is accorded to the data about malignant transformations including those were initiated by chemical agents.

It was established direct relation between phospho-c-Jun content and ODC activity on the other stages of gastric cancer development (from 6th to 24th week): the gastric mucosa cells were characterized by increased activity of ODC at average 2,3-fold over the control and the increased phospho-c-Jun content at average 3,8-fold. The growth of the phosphorylated form of c-Jun content from 6th to 24th weeks of gastric cancer development probably was caused by its high expression, amplification of JNK-mediated phosphorylation or inactivation of phosphatases. Before mentioned effects could be a consequence of activity ODC increase, as polyamines have an influence on the rate of protein synthesis in cells: activate RNA polymerases, affect the acetylation of histones and non-histone chromatin proteins, stabilize ribosomes and tRNA, that ultimately affects cell growth and development.

Beside the increased ODC activity from 6th to 24th week of gastroduodenal carcinogenesis could probably be caused by the growth of phospho-c-Jun and it is belonging to an ODC transactivation.

Thus, it was shown the complex relationships between the examined enzyme and transcription activator during the process of gastric cancer development, that pointed to an aggravation of pathological disturbances due to reciprocal action between ODC and c-Jun.

DISRUPTION OF ENDOPLASMIC RETICULUM HOMEOSTASIS OF SMALL INTESTINE LYMPHOCYTES UNDER CHRONIC SOCIAL STRESS

TOPOL I. A., KAMYSHNY A. M.

*Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine;
e-mail: alexkamyshny@yandex.ru*

Chronic social stress (CSS) is a risk factor for many affective and somatic disorders. Several lines of evidence support an intimate relationship between disruption of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis, unfolded protein response (UPR) activation, and human autoimmune diseases. X-box binding protein 1 (XBP1) is a unique transcription factor whose active form is generated by a non-conventional splicing reaction upon disruption of homeostasis in the ER and activation of the UPR.

Researches have been conducted on 70 rats (female) of Wistar line, which were divided on 7 experimental groups: control rats (group 1); rats, which were modeled CSS1 by means of three weeks social isolation and prolonged psychoemotional influence (group 2); rats, which having CSS 2 modeling by means of keeping animals in over populated cages with every day change of grouping (group 3); rats with CSS1 and CSS2 which were made the modeling of intestinal microflora by means of administrations of aminoglycosed antibiotic *kanamycin* (group 4 and 5, accordingly); rats with rats with CSS1 and CSS2 which were made the modeling of intestinal microflora by means of everyday administrations of *lactobacterine* (groups 6 and 7, accordingly). Structure of population of Xbp1⁺-cells has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to Xbp1 of rat.

GALT lymphocytes actively express Xbp1: the greatest number of Xbp1⁺ cells is localized in Payer patches lymphoid follicles, the least number – in LFV. Xbp1⁺-small lymphocytes prevail among Xbp1⁺-cells, they share from 60% (in LFV) to 68% (in PP Lf) of the total number of Xbp1⁺ cells. CSS development is accompanied with the reduction of total number of Xbp1⁺-lymphocytes in lymphoid structures of ileum (31% - 3 fold reduction, $P < 0.05$), mostly expressed in lymphoid follicles, and changes the concentration of Xbp1 protein in immunopositive cells. Modulation of the composition of intestinal microflora by antibiotics and

probiotics under CSS results in the increase of total number of Xbp1⁺ lymphocytes in GALT, the degree of it depends on the kind of stress.

Thus, increased understanding of the molecular actions and transcriptional networks regulated by XBP1 in immune cells may aid in the development of potential therapeutics targeting immune disorders.

ПЕРОКСИДНЕ ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ У МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ ЯК ПОКАЗНИК АДАПТАЦІЇ ДО ДІЇ ХРОНІЧНОГО ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ

ТУГАЙ А. В., ГИРЕНКО Л. С., ПІДГЕРСЬКА Л. О., ТУГАЙ Т. І.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: andre.07111982@gmail.com

У фізіологічних умовах концентрація активних форм кисню (АФК) та ініційоване ними пероксидне окислення ліпідів (ПОЛ) у мікроскопічних грибів знаходяться на певному стаціонарному рівні. У відповідь на дію різних абіотичних факторів, зокрема підвищення рівня АФК, який спостерігається за дії іонізуючого опромінення, відбувається активація ПОЛ – одного з ключових ланцюгів між впливом стресу та реалізацією захисних реакцій організму. У попередніх дослідженнях нами було показано, що за дії відносно великих (150 Гр, 800 Гр) доз опромінення відбуваються кількісні зміни жирнокислотного (ЖК) складу клітинних ліпідів мікроскопічних грибів, які здатні адаптуватися до дії таких доз опромінення. Відомо, що збільшення ступеня ненасиченості ЖК може сприяти подальшому розвитку ПОЛ, в зв'язку з тим, що інтенсивність ПОЛ збільшується зі зростанням числа подвійних зв'язків в молекулах ЖК. Інтенсивність ПОЛ – важливий показник ступеня впливу іонізуючого опромінення на мікроскопічні гриби, що дозволяє отримати інформацію щодо їхніх адаптаційних можливостей.

Метою роботи було дослідити вплив іонізуючого випромінювання на інтенсивність ПОЛ у мікроскопічних грибів.

Об'єктом був мікроскопічний гриб *Cladosporium cladosporioides*; для дослідження використовували два штами: контрольний – 4061, який було виділено з чистих територій, та такий, що був виділений із забруднених радіонуклідами місць та виявляв радіоадаптивні властивості – 4. Компонентами ПОЛ були дієніди кон'югати (ДК) та малоновий діальдегід (МДА). Вимірювання кількості ДК та МДА проводили на трьох етапах онтогенезу гриба.

Порівняльне дослідження інтенсивності ПОЛ за вмістом ДК у штамів *C. cladosporioides* контрольного та з радіоадаптивними властивостями дозволило встановити, що рівень ДК у контрольному штаму вірогідно не відрізняється впродовж досліджених фаз росту в той час, як у штаму з радіоадаптивними властивостями вміст ДК в кінці стаціонарної фази росту є удвічі вищим, ніж в експоненційній. За дії хронічного іонізуючого опромінення тільки у штаму з радіоадаптивними властивостями виявлено істотне (у 3–3,5 раза) збільшення вмісту ДК в експоненційній та кінці стаціонарної фази росту. У контрольного штаму вміст МДА зменшується в динаміці культивування та є удвічі нижчим в кінці стаціонарної фази росту порівняно з експоненційною, на відміну від штаму з радіоадаптивними властивостями, в якого не виявлено істотних змін у кількості МДА в процесі росту. За опромінення значне підвищення вмісту (в 3 і 5 разів) МДА в контрольного штаму виявлено напочатку, а у штаму з радіоадаптивними властивостями наприкінці стаціонарної фази росту.

Виявлені істотні відмінності в інтенсивності ПОЛ на різних етапах онтогенезу як в умовах без опромінення, так і за дії хронічного опромінення у штаму з радіоадаптивними властивостями та контрольного, свідчать про можливий вклад особливостей перебігу ПОЛ в реалізацію радіоадаптивних властивостей в досліджених мікроскопічних грибів.

МЕТАБОЛІЧНІ ЗМІНИ У ФУНКЦІОНУВАННІ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ МІКРОСКОПІЧНИХ ГРИБІВ ЗА ДІЇ ХРОНІЧНОГО ОПРОМІНЕННЯ

ТУГАЙ Т. І., ТУГАЙ А. В.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;
e-mail: tatyana.tugay2@gmail.com*

Взаємозв'язок між функціонуванням антиоксидантної системи та реалізацією радіоадаптаційних властивостей у мікроскопічних грибів нині не встановлено, хоча є низка праць щодо змін системи антиоксидантного захисту в радіорезистентних видів дріжджів та бактерій. Залишається відкритим питання завдяки яким механізмам вони адаптуються до дії хронічного іонізуючого опромінення. Як відомо, вплив іонізуючого опромінення призводить до підвищеного утворення в них активних форм кисню, тому особливої уваги заслуговують дослідження функціонування їхньої антиоксидантної системи, її ролі в адаптації до опромінення, яка здатна знешкоджувати надлишок активних форм кисню – супероксид-аніону (O_2^-), пероксиду водню (H_2O_2) тощо, які утворюються під впливом іонізуючого випромінювання. Метою роботи було визначення метаболічних змін у функціонуванні антиоксидантної системи мікроміцетів за дії хронічного опромінення.

Порівняльне дослідження активності антиоксидантних ензимів чотирьох видів мікроміцетів у штамів із радіоадаптаційними властивостями та контрольних без опромінення (вихідний рівень) та за опромінення в умовах створеної нами модельної системи на різних етапах онтогенезу в експоненційній (7 діб, поглинута доза 85 мГр) та стаціонарній (14 діб культивування, доза 170 мГр) фазах росту дало можливість вперше встановити, що в досліджених видів вихідна (без опромінення) активність одного із ключових ензимів антиоксидантного захисту – СОД істотно відрізняється. Показано, що темнопігментованим видам *C. cladosporioides* та *H. resinae* властивий нижчий порівняно зі світлопігментованими рівень активності СОД. За збільшенням величини активності СОД досліджені види можна розташувати так: *C. cladosporioides* < *H. resinae* < *A. versicolor* < *P. lilacinus*. За дослідження змін в активності СОД в онтогенезі грибів, тобто у різних фазах росту, було встановлено, що в контрольних штамів *C. cladosporioides*, *H. resinae*, *A. versicolor* активність СОД є вищою в стаціонарній фазі, а у *P. lilacinus* 101 – однаковою в експоненційній та стаціонарній фазах росту. У штамів із радіоадаптаційними властивостями *C. cladosporioides* і *P. lilacinus* рівень активності СОД вищий в стаціонарній фазі, у *H. resinae* – в експоненційній, а у *A. versicolor* – однаковий в обох фазах росту. Отже, за дії опромінення зміни в активності СОД у досліджених видів мікроміцетів були в межах 50–650%. Одержані дані свідчать, що іонізуюче опромінення слугувало індуктором значних змін в активності цього ензиму тільки в темнопігментованих видів *C. cladosporioides*, *H. resinae* як у штамів із радіоадаптаційними властивостями, так і в контрольних.

Аналіз вихідної активності ензимів каталази та пероксидази, які різними шляхами здатні трансформувати надлишок пероксиду водню в цих самих видів дав змогу виявити низку закономірностей. Так, у всіх видів мікроміцетів виявлено активність позаклітинних ензимів – каталази та пероксидази – чи принаймні одного з них. Проте у кожного з досліджених видів співвідношення активності цих позаклітинних ензимів є різним.

На основі одержаних даних висунуто і експериментально підтверджено гіпотезу, що за дії хронічного опромінення для різних видів мікроміцетів характерні унікальні зміни в профілі активності антиоксидантних ензимів, які забезпечують їх радіостійкість. Виявлено більшу стабільність ензиматичного складника антиоксидантної системи в штамів із радіоадаптаційними властивостями порівняно з контрольними, при цьому ступінь стійкості до опромінення визначається фізіолого-біохімічними властивостями штамів переважно на рівні різнопланової зміни протеїнів, що секретуються, в різних видів.

ВЛИЯНИЕ ТИАМИНА НА АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ЭНЗИМОВ В ТКАНЯХ БЕЛЫХ КРЫС

¹УСТЯНСКАЯ О. В., ²ГОЖЕНКО С. С., ¹БЫТЛАН А. Н.,
¹ПОНОМАРЬ А. А., ¹ПЕТРОВ С. А.

¹Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
²ГП Украинский научно-исследовательский институт
медицины транспорта, Одесса;
e-mail: ustjansky_olga@ukr.net

Изучение некоэнзимных функций витаминов – важное направление в витаминологии. За последние три десятилетия в нашей лаборатории получены данные относительно регуляции активности протеолитических энзимов тиаминном и его метаболитами. Однако механизмы таких взаимодействий многообразны и изучены недостаточно.

В последние три десятилетия в витаминологии сложилось новое научное направление, посвященное изучению некоэнзимной регуляции тиаминном и его метаболитами активности протеолитических энзимов. К успехам этого направления следует отнести также выяснение механизма взаимодействия тиамина с сульфгидрильными группами активного центра катепсинов.

Исследований, посвященных изучению некоэнзимной регуляции тиаминном и его метаболитами активности протеолитических энзимов в литературе очень мало. Однако имеющиеся единичные работы свидетельствуют о существовании взаимоотношений между тиаминном и некоторыми протеолитическими энзимами, в частности, катепсинами.

Влияние тиамина и его метаболитов на активность трипсиноподобных протеиназ до настоящего времени не выяснено. Поэтому целью исследования было изучение влияния инъекций тиамина на активность трипсиноподобных энзимов.

Исследование проводили на половозрелых крысах-самцах линии Wistar, массой 180–200 г. Тиамин вводили путем внутримышечной инъекции. Контрольной группе крыс вводили по 0,2 мл физиологического раствора, а опытной группе – тиамин в дозе 10 мг на килограмм массы тела.

Активность трипсиноподобных протеиназ определяли по методу М. Kunitz в модификации К. Н. Веремеенко. Для исследования использовали гомогенаты печени, почек, желудка и тонкого кишечника белых крыс.

При анализе данных получены следующие результаты: после внутримышечного введения тиамина активность трипсиноподобных энзимов снижалась в печени (в 2,6 раза относительно контроля), в почках (в 1,4 раза) и в желудке (в 4 раза). Исключение составляли ткани тонкого кишечника. В этом органе активность исследуемых энзимов увеличилась в 1,67 раза.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тиамин способен снижать активность трипсиноподобных энзимов в исследуемых органах (печени, почках и желудке) белых крыс. Этот факт может свидетельствовать о возможности некоэнзимного воздействия тиамина или его метаболитов на активность трипсиноподобных энзимов. Выявлено регуляторное органоспецифичное действие тиамина или его метаболитов после внутримышечного введения на активность трипсиноподобных энзимов в тканях печени, почках, желудке и тонкого кишечника белых крыс.

ВПЛИВ АГМАТИНУ НА АПОПТОЗ ЛЕЙКОЦИТІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ В ЩУРІВ*ФЕРЕНЦ І. В., БРОДЯК І. В., ЛЮТА М. Я., БУРДА В. А.**Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: iryna_brodyak@yahoo.com*

Активация індукцибельної NO-синтази та надсинтез NO в умовах оксидативного стресу є передумовою утворення в лейкоцитах цитотоксичного пероксинітриту, який виявляє ушкоджувальну дію на всі компоненти клітини. Пероксинітрит модифікує азотисті основи та спричинює одно- та двониткові розриви молекул ДНК. У разі дії факторів, які провокують порушення структури ДНК, у клітині підвищується рівень протеїну p53. Завдяки своїй транскрипційній функції цей протеїн здатний активувати гени, що беруть участь в індукції загибелі клітини шляхом апоптозу. Також p53 безпосередньо індукує апоптоз шляхом запуску каспазного каскаду за мітохондріальним шляхом. Важливим елементом в ініціації апоптотичної загибелі клітини є співвідношення між індукторами та супресорами цього процесу. Особливого інтересу в цьому відношенні заслуговує протеїн Bcl-2. Відомо, що Bcl-2 інгібує p53-залежний і p53-незалежний шляхи апоптозу. Тому метою роботи було дослідити вплив селективного інгібітору NO-синтази – агматину на процес апоптозу лейкоцитів периферичної крові щурів у нормі та в умовах експериментального цукрового діабету (ЕЦД), індукованого введенням стрептозотцину.

Імуноцитохімічним методом визначено вміст проапоптотичного протеїну p53 і антиапоптотичного – Bcl-2. Встановлено, що в умовах ЕЦД підвищується кількість клітин із позитивною реакцією (p53⁺) та різко позитивною реакцією (p53⁺⁺) на наявність цього протеїну порівняно з контролем. Водночас виявлено зниження (на 27%) кількості клітин із негативною реакцією (p53⁻). На фоні збільшення вмісту в лейкоцитах тварин з ЕЦД проапоптотичного протеїну спостерігається зростання кількості клітин з антиапоптотичним протеїном Bcl-2. Введення агматину контрольним тваринам супроводжується зменшенням кількості як p53⁺⁺, так і Bcl-2⁺⁺ клітин, що відбувається на фоні незначного підвищення кількості клітин із негативною реакцією на ці протеїни. У тварин з ЕЦД агматин призводить до вірогідного зростання числа клітин із негативною реакцією на p53, що супроводжується зменшенням кількості клітин із різко позитивною реакцією (на 62%). Водночас виявлено зростання кількості Bcl-2- клітин.

Однією з ранніх ознак апоптотичних змін в еукаріотичних клітинах є екстерналізація на зовнішню поверхню клітинної мембрани фосфатидилсерину (ФС), що виявляють за зв'язуванням анексином V. Дослідження клітин методом проточної цитофлуориметрії дало змогу виявити зростання кількості анексинпозитивних клітин за експериментального діабету майже у 4 рази, що свідчить про посилення екстерналізації ФС на поверхні лейкоцитів. Водночас кількість анексинпозитивних клітин, які давали також позитивну реакцію у разі фарбування пропідій йодидом, зростає на 89%. Це є ознакою зміни цілісності мембрани і свідчить про порушення життєздатності таких клітин. Введення агматину контрольним тваринам супроводжується зростанням кількості клітин із ранніми ознаками апоптозу на 31%, а кількість клітин, які перебувають на пізніх стадіях апоптотичної загибелі не змінюється. Водночас у тварин з ЕЦД агматин призводить до зниження кількості клітин із підвищеним вмістом на зовнішній поверхні їхньої мембрани ФС (на 31%), і клітин із пошкодженою мембраною (на 29%). Аналізуючи біохімічні та молекулярні маркери апоптозу лейкоцитів, встановлено, що введення тваринам агматину виявляє пригнічуючий вплив на генетично запрограмовану загибель лейкоцитів, інтенсивність якої значно підвищується в умовах діабету.

РОЛЬ ЦЕРАМИДА В РЕГУЛЯЦІИ АКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПАЗЫ D ПРИ ПАКЛИТАКСЕЛ- ИНДУЦИРОВАННОЙ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

ХАРЧЕНКО В. С., БЕЛЫЙ А. Н., БАБЕНКО Н. А.

*НИИ биологии, Харьковский национальный
университет им. В. Н. Каразина, Украина;
e-mail: kharchenko_vitalina@meta.ua*

Сфинголипиды являются вторичными посредниками и регулируют ключевые сигнальные пути клеток, обеспечивающие их выживание или гибель. Церамид подавляет в клетках активность протеинкиназы Akt, киназы гликоген синтазы 3, фосфолипазы D (ФЛД), которые принимают участие в передаче инсулинового сигнала в клетках. Накопление церамида отмечено в инсулинрезистентных клетках и тканях и при действии цитотоксических препаратов. Известно, что паклитаксел является противоопухолевым препаратом, механизм цитотоксического действия которого направлен как на изменение цитоскелета клеток, так и накопления в них проапоптозного сфинголипида – церамида. Целью настоящей работы явилось изучение роли церамида в нарушении ФЛД-зависимого пути сигналинга инсулина в условиях индуцированной паклитакселем резистентности клеток-мишеней к действию гормона.

Исследования проводили на гепатоцитах 3-месячных крыс-самцов линии Вистар. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью трипанового синего; она составляла $94 \pm 5\%$. Суспензию клеток печени инкубировали на протяжении 90 мин при 37°C в присутствии паклитаксела (30 нМ), паклитаксела и мириоцина (5 мкМ) или фумонизина В1 (1 мкМ), или GW4869 (20 мкМ), или имипрамина (50 мкМ), или суммы ингибиторов, или без них. Для определения активности ФЛД клетки предварительно метили [^{14}C]-пальмитиновой кислотой (0,25 мкКи/мл). Для определения индуцированной инсулином активации ФЛД под действием инсулина, изучали образование [^{14}C]-фосфатидилэтанола в клетках, предварительно обработанных 300 мМ этанолом, в условиях инкубации с инсулином (10^{-9} М) или 0,9%-ым NaCl (в качестве контроля к инсулину) в течение 0–30 минут.

Установлено, что жизнеспособность клеток достоверно не изменяется при действии цитотоксического препарата паклитаксела и ингибиторов обмена сфинголипидов. Показано, что паклитаксел индуцирует в гепатоцитах молодых крыс накопление церамидов с $6,01 \pm 0,24$ до $15,99 \pm 0,39$ нмоль/мг протеина по сравнению с контрольными клетками. Кроме того, отмечено подавление активности ФЛД в гепатоцитах под действием паклитаксела, что может быть связано с увеличением в клетке уровня церамида, ингибитора ФЛД. Цитостатик может повышать содержание церамида разными путями, индуцируя путь синтеза *de novo*, или усиливая сфингомиелиназную активность. Ингибиторы синтеза сфинголипидов *de novo* – мириоцин и фумонизин – подавляют накопление церамида в клетках под действием паклитаксела, уровень сфинголипида в клетках составляет $9,31 \pm 0,16$ и $10,36 \pm 0,46$ нмоль/мг протеина соответственно. Содержание церамида при действии ингибитора нейтральной сфингомиелиназы – GW4869 – составляет $8,85 \pm 0,34$ нмоль/мг протеина, а ингибитор кислой сфингомиелиназы имипрамин снижает образование церамида под действием паклитаксела до $9,56 \pm 0,212$ нмоль/мг протеина. Внесение суммы всех ингибиторов в среду инкубации гепатоцитов сочетанно с паклитакселем предотвращает накопление церамида в клетках (содержание церамида $6,95 \pm 0,33$ нмоль/мг протеина). Это свидетельствует о том, что противоопухолевый препарат индуцирует разные пути накопления сфинголипида. В то же время, изучение действия паклитаксела и ингибиторов обмена сфинголипидов на активацию инсулином ФЛД и поглощения [^3H]-глюкозы гепатоцитами показало, что подавление активности гормониндуцированной ФЛД под действием паклитаксела предотвращает ингибитор мириоцин. В то же время, поглощение глюкозы восстанавливает мириоцин и ингибитор кислой сфингомиелиназы – имипрамин. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что вновь синтезированные церамиды в условиях моделирования состояния инсулинорезистентности с помощью цитотоксического препарата паклитаксела приводят к подавлению гормониндуцированной активности

ФЛД. Тогда как в ингибировании поглощения глюкозы цитостатиком принимают участие, как вновь синтезированные церамиды, так и кислая сфингомиелиназа.

ОКСАЛАТЗАЛЕЖНЕ ГАЛЬМУВАННЯ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ РЕАКЦІЇ В ТКАНИНІ ПЕЧІНКИ БІЛИХ ЩУРІВ

ХЛУС К. М.

*Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна;
e-mail: khlus_k@rambler.ru*

Щавлева кислота та її солі є важливими компонентами продуктів з повсякденного раціону людини. Беручи до уваги відомі несприятливі ефекти оксалатів їх можна вважати впливовими екологічними факторами, ефект яких істотно збільшується при ендогенних порушеннях оксалатного метаболізму.

У цій роботі вивчали активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) в без'ядерних гомогенатах тканини печінки білих безпородних щурів віком 6 місяців. Окремо визначали активність ензиму через 5 хв після внесення до реакційного середовища розчину щавлевої кислоти з кінцевою концентрацією 0,1; 0,25; 0,5 або 1,0 ммоль/л і вираховували ступінь зниження інтенсивності ензиматичної реакції.

Одержані дані піддавали кореляційно-регресійному та дисперсійному аналізу з використанням комп'ютерних програм Excel, NCSS і Statgraphics. За проведення однофакторного дисперсійного аналізу первинні дані зводили в комбінаційну таблицю по 2–8 варіантів у кожній з 4 градацій (концентрацій щавлевої кислоти) організованого фактора А, тобто ступеня інгібування ЛДГ. Розраховували факторіальну D_A , випадкову, або залишкову D_e та спільну D_Y дев'яти (суми квадратів відхилень); 2) відповідні вибіркові дисперсії (середні квадрати відхилень) σ_A^2 , σ_e^2 і σ_Y^2 ; 3) ступені свободи k_A , k_e і k_Y ; 4) показник сили впливу фактора А з помилкою $\eta_A^2 \pm S\eta_A^2$; 5) емпіричне значення F -критерію Фішера F_ϕ ; 6) вірогідність помилкової оцінки P . Обчислювали групові середні показники інгібування та їх стандартні відхилення у кожній градації комплексу. Однорідність дисперсій окремих градацій оцінювали за критеріями Кохрена, Бартлета і Хартлі. Вірогідність різниці між груповими середніми оцінювали із застосуванням кількох тестів множинного порівняння.

Згідно з проведеним кореляційним аналізом існує досить висока дозозалежність зниження активності ЛДГ за дії щавлевої кислоти. Параметричний коефіцієнт кореляції (за Пірсоном) дорівнює $0,691 \pm 0,1616$. Непараметричний коефіцієнт рангової кореляції (за Спірменом) має ще більшу величину $-0,7301$; $z\ t = 4,533$ і $P < 0,001$.

Проте здійснений надалі регресійний аналіз показав, що рівняння лінійної регресії загального виду $Y = a+b \cdot X$ недостатньо адекватно описує зв'язок між ступенем інгібування ЛДГ (Y) і концентрацією щавлевої кислоти (X). Найповніше досліджуваній залежності відповідають рівняння сигмоїдної (S-подібної) і подвійної реципрокної регресії, які на три чверті пояснюють варіювання гальмівного ефекту змінами концентрації діючої сполуки. За F -критерієм перевагу має модель сигмоїдної залежності, а окремі її компоненти, зокрема вільний член регресії a , відзначаються порівняно більшими величинами t -критерію Стьюдента. Асимптотичний коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами a і b рівняння $Y = e^{(a+b/X)}$, який дорівнює $-0,740$, є набагато нижчим за граничний рівень (0,95), що свідчить про високу точність оцінки цих параметрів.

Отже, щавлева кислота гальмує *in vitro* інтенсивність ключової реакції енергетичного обміну, яку каталізує лактатдегідрогеназа печінки білих щурів, що дозволяє вважати її потужним екологічним фактором. Спостерігається виражена дозозалежність ефекту в інтервалі концентрацій щавлевої кислоти 0,1–1,0 ммоль/л. Зв'язок ступеня інгібування ЛДГ з діючою концентрацією щавлевої кислоти описується рівнянням сигмоїдної регресії $Y = e^{(3,7737-0,1344/X)}$, яке на 76,04% (за величиною коефіцієнта детермінації $R_{\text{кв}}$) пояснює дисперсію активності ЛДГ змінами концентрації ксенобіотика.

**ВМІСТ АМІНОКИСЛОТ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ
ЗА ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ**

ЦАРЕНКО Т. М., КОНОПЕЛЬНЮК В. В., САВЧУК О. М.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

e-mail: tsarenko1091@gmail.com

Сьогодні одним із поширених факторів несприятливого впливу на організм є алкоголь. Алкогольна залежність є однією з найактуальніших проблем, які постають сьогодні перед сучасним суспільством пов'язаних із здоров'ям людини. В попередніх дослідженнях розвитку хронічної алкогольної інтоксикації нами було показано залучення функціонування серотонінергічної системи до патогенезу хронічної алкогольної інтоксикації. Серотонін не проходить гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), а оскільки триптофан є попередником для синтезу серотоніну і конкурує з валіном, лейцином та ізолейцином за проходження ГЕБ, доцільним було визначення вмісту цих амінокислот в сироватці крові за хронічної алкогольної інтоксикації.

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самках з початковою масою 160–200 г з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи 1997 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, загальним етичним принципам експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Розвиток експериментальної алкогольної інтоксикації у піддослідних тварин відтворювали за методом Халилова М. Х. та Закихорджаєва Ш. Я. з власними модифікаціями, шляхом внутрішньошлункового введення 30%-го етилового спирту з розрахунку 2 мл на 100 г маси тіла тварини. Контрольну групу складали щури, яким у тому ж віці внутрішньошлунково вводили чисту питну воду, яку використовували для розведення етанолу. Тварин було розділено на 2 групи: 1 – контрольна група щурів; 2 – група щурів, яким вводили розчин етанолу протягом 11 діб. Амінокислотний склад визначали на автоматичному амінокислотному аналізаторі Т-339 (Microtekno, Чехія) у літій-цитратному буфері в одноколунковому циклі.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між контрольними та дослідними показниками за $P < 0,05$. Дані представлено як середнє арифметичне (M) з його стандартною похибкою (m): $M \pm m$.

Результати експериментальних та клінічних досліджень вказують на те, що вміст та метаболізм амінокислот порушується під час розвитку алкогольної інтоксикації. Одним із основних чинників амінокислотного дисбалансу може бути дисфункція нейроендокринної регуляції, що виникає з причини імунного конфлікту, що розвивається за надходження в організм розчину етанолу. Внаслідок досліджень встановлено зниження вмісту валіну в 1,6 раза в сироватці крові щурів за розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. Показано зниження вмісту ізолейцину та лейцину в 2 та 2,8 раза в сироватці крові дослідних тварин порівняно з показниками контрольної групи тварин.

Таким чином, в ході досліджень встановлено, що амінокислоти, які конкурують з триптофаном за проходження гематоенцефалічного бар'єру, залишають кров'яне русло використовуються в синтезі протеїну і, таким чином, вміст триптофану в крові підвищується, відповідно до цього зростає кількість молекул цього метаболіту, який надходить у мозок.

**THE INFLUENCE OF IMMOBILIZATION STRESS
ON THE PROOXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM
IN THE STOMACH OF RATS UNDER SHORT-
AND LONG-TERM HYPOMELATONINEMIA**

TSVYAKH O. A., LARICHEVA E. N.

*O. V. Sukhomlynsky Mykolaiv National University, Ukraine;
e-mail: tsviakho@mail.ru*

Mechanism of antioxidant action of melatonin is directly related to the ability to neutralize free radicals and indirectly to activating antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GP).

We studied the changes occurring in the prooxidant-antioxidant system of the stomach with a lowered level of melatonin under stress. Experiments were conducted using 64 males of Wistar rats weighing 300-320 g. Eight groups of 8 rats each were used. The first group represented intact control. We modelled hypomelatoninemia in the second group of animals: rats of this group were maintained for 24 h under artificial day-light of 1000-1500 lux during 10 days. The rats of the third group were subjected to stress by immobilization for 5 h. The fourth group was subjected to stress on the ninth day of hypomelatoninemia. The fifth group of animals represented an intact control group was maintained for 30 days. We modelled hypomelatoninemia in the sixth group of animals: the rats of this group were maintained for 24 h under day-light illumination of 1000-1500 lux during 30 days. The rats of the seventh group were subjected to the immobilization stress for 5 h. The eighth group was subjected to immobilization stress on the twenty-ninth day of hypomelatoninemia. We have determined pH of the gastric juice. In the gastric mucosa we counted the number of ulcers and the Pauls index. In the homogenate of the stomach tissue we determined the activity of antioxidant enzymes and products of free radical oxidation.

The research showed that due to the immobilization stress ulcerogenic effect of hypomelatoninemia intensified in the stomach of rats. During stress under long-term hypomelatoninemia the ulcerogenic effect exacerbates, increasing the level of peroxidation with the weakening of antioxidant protection in the stomach tissues. Changes in the activity of enzyme antioxidant protection in the stomach tissues differed under short-term and long-term hypomelatoninemia. A lower level of melatonin as a result of the constant light exposure of rats resulted in the imbalance of the prooxidant-antioxidant system in the stomach. Direction of the processes depended on the duration of hypomelatoninemia.

The 10-day exposure under constant light of rats when modelling the immobilization stress did not reveal significant signs of peroxidation processes strengthening on the background of a lower antioxidant protection with a decrease of the SOD activity by 14.95%, insignificant decrease of GP by 9.7% and catalase by 17% ($P < 0.01$). It was established that short-term hypomelatoninemia accompanied by morphological changes in the form of the growth of the average number of ulcers per animal was 1.6, and Pauls index increased by 57.4%. At the same time, pH decreased slightly, as the total proteolytic activity.

The changes of prooxidant-antioxidant system in immobilization stress on the background of prolonged hypomelatoninemia were more pronounced than in the short-term hypomelatoninemia: concentration of diene conjugates decreased by 12% ($P < 0.01$), the concentration of MDA increased by 2.52% ($P < 0.001$) and was maximal among all experimental groups; on the background of the pronounced changes in the antioxidant level: SOD activity increased by 53.65% ($P < 0.001$) in contrast to the decreased activity of this enzyme at the 10-day hypomelatoninemia period, the catalase activity significantly increased by 42.57% ($P < 0.01$), the activity of GP significantly decreased by 25.09% ($P < 0.001$).

It was established that the mean number of mucosal defects per animal increased 1.86 times and Pauls index increases by 86%. During prolonged decrease of the melatonin level pH decreased, indicating the increased acidity in the stomach. The total proteolytic activity under immobilization stress on the background of prolonged decrease of melatonin was much higher than under short-term hypomelatoninemia.

**ВПЛИВ МІКРОХВИЛЬОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ
ТА МОНОХРОМАТИЧНОГО ЧЕРВОНОГО СВІТЛА
НА ПРООКСИДАНТНО–АНТИОКСИДАНТНУ РІВНОВАГУ
В ТКАНИНАХ ЕМБРІОНІВ *Japanese quail***

ЦИБУЛІН О. С., ЯКИМЕНКО І. Л., СИДОРИК Є. П.

*Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ;
Білоцерківський національний аграрний університет, Україна;
e-mail: yakymenko@btsau.net.ua*

Оцінка біологічних ризиків від низькоінтенсивного мікрохвильового випромінювання систем мобільного зв'язку і бездротового Інтернету та розробка профілактичних заходів від таких ризиків є вкрай актуальними з огляду на глобальний розвиток бездротових технологій.

У модельних експериментах на ембріонах *Japanese quail in ovo* нами було досліджено комбіновану дію низькоінтенсивного мікрохвильового випромінювання стандарту GSM 900 МГц та монохроматичного червоного світла світлодіодів (довжина хвилі 630–650 нм).

Виявлено, що дія мікрохвильового випромінювання (900 МГц, 15 мкВт/см²) протягом 5 діб до інкубації та 38 год інкубації на перепелині ембріони призводить до вірогідної активації пероксидних процесів (на 37,5%, $P < 0,05$) та пригнічення каталазної активності (на 78,6%, $P < 0,01$) у тканинах ембріонів порівняно з контролем. На цьому фоні дія монохроматичного червоного світла (630–650 нм, 100 мкВт/см²) упродовж 1 хв щодобово приводить до вірогідного відновлення вищезазначених показників до рівня контролю.

Модельні дослідження з оцінки каталазної активності у гомогенатах ембріональних тканин *in vitro* виявили, що опромінення гомогенатів мікрохвильовим випромінюванням стандарту GSM (900 МГц, 15 мкВт/см², 10 хв) під час постановки реакції вірогідно зменшує каталазну активність у гомогенатах (на 22,3%, $P < 0,001$) порівняно з контролем. Одночасна дія монохроматичного червоного світла (630–650 нм, 100 мкВт/см²) на гомогенати (під час постановки реакції) на фоні дії мікрохвильового випромінювання вірогідно відновлює каталазну активність гомогенатів, повертаючи її до рівня контролю (різниця з контролем – 3,14%, $P = 0,67$).

Активність супероксиддисмутази в тканинах ембріонів також істотно змінюється за дії низькоінтенсивного мікрохвильового випромінювання (як в експериментах *in vivo*, так і *in vitro*), проте дія монохроматичного червоного світла не відновлює активність ензиму.

Таким чином, виявлено виражену прооксидантну дію низькоінтенсивного мікрохвильового випромінювання стандарту GSM 900 МГц та вірогідний антиоксидантний ефект монохроматичного червоного світла в тканинах ембріонів *Japanese quail* на ранніх стадіях розвитку.

**METALLOTHIONEINS OF RATS LIVER
POISONED WITH HEAVY METALS**

TSUDZEVICH B. A., KALININ I. V.

*Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: ikalin@rambler.ru*

Increased man-made pollution by heavy metals, which belong to the priority chemical pollutants in their toxicity and danger to humans and all living things deserves special attention. The question about how a living organism can withstand such increasing chemical load that the disruption of body's protective systems arise under the influence of unfavorable factors.

In response to the accumulation of heavy metals in the body cells synthesized protein – metallothionein (MT) composed of sulfur-containing amino acids with a high content of sulfhydryl groups.

The aim of our study was to investigate the content of metallothioneins in the rat liver under conditions of cadmium sulfate poisoning.

Experiments conducted on nonlinear white male rats of the same age, weighing 180-200 g, according to the Council of Europe Convention for the protection of vertebrate animals used for scientific purposes. Animals were divided into two groups: the first group included intact animals (control), the second one – animals orally administered solution of cadmium sulfate in doses of 1/30 of LD₅₀. Metallothionein was isolated by gel-chromatography fractions distribution solutions thermostable liver homogenate on Sephadex G-75 and on DEAE-cellulose in NaCl. Metallothionein was identified by spectral characteristics.

As a result they were identified as metallothionein molecular fraction of proteins with a molecular mass of about 7 kDa in two classes – MT-I and MT-II, which is a typical feature of metallothioneins in animals. Metallothioneins are characterized by their specific spectral features: the absorption band with a maximum around 254 nm and lack of absorption maximum around 280 nm. When exposed to cadmium the body undergoes significant changes in the elution profile of metallothioneins by ion-exchange chromatography. Volume ratio of MT-I to MT-II in the control is 0.7, whereas under the action of cadmium sulphate – 1.8. Change of the indicated ratios occurs as a result of reducing the volume fraction of MT-II. The calculations indicate that the contents of MT-II in the liver in the control group is three times higher than of MT-I. The effect of cadmium causes a two-fold reduction of MT-II in the experimental group and the content of the MT-I remains unchanged with respect to the group of intact animals.

Thus, the study of chromatographic characteristics of metallothioneins in the rat liver indicates that under metal binding function the changes in the composition of both classes of metallothioneins and loss of cluster structure when exposed to cadmium are observed.

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ АЕРОБНОГО ОКИСЛЕННЯ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ З РІЗНИМ РІВНЕМ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЕКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНІНУ

ЧАКА О. Г., ЯНКО Р. В., ЗАМОРСЬКА Т. М.

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ;
e-mail: lenchaka@ukr.net*

Гормон епіфіза мелатонін здійснює поліфункціональний вплив на організм. Він виявляє антиоксидантні, геропротекторні властивості, регулює сезонні та добові ритми, репаративні процеси, жировий та вуглеводний обмін, покращує дезінтоксикаційні функції печінки, прискорює процеси її регенерації. Проте дані про вплив мелатоніну на активність ензимів аеробного окислення неоднозначні. Мета роботи – порівняти вплив екзогенного мелатоніну на активність ензимів аеробного окислення (сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази) в печінці щурів із різним рівнем енергетичного метаболізму.

Дослідження проведено у весняний період (березень–квітень) на 20 щурах-самцях лінії Wistar віком 4 місяці. Дослідні щури щодня о 10 годині отримували перорально екзогенний мелатонін («Віта-мелатонін»), в дозі 5 мг/кг маси тіла. Тривалість експерименту становила 28 діб. Протягом експерименту тварини мали вільний доступ до їжі та води і знаходилися в умовах природного циклу освітлення. В останній день експерименту в контрольних та дослідних щурах визначали рівень енергетичного метаболізму методом непрямой калориметрії. За результатами вимірювань щурів розділили на тварин із високим та низьким рівнем метаболізму. Рівень споживання кисню у щурів з високоактивним метаболізмом в середньому становив 2912 мл·час/кг маси тіла, а з низькоактивним – 2288 мл·час/кг маси тіла. Щурів декапітували з дотриманням умов Європейської конвенції про захист лабораторних

тварин. З печінки методом диференційного центрифугування виділяли мітохондрії. Фотометрично в суспензії мітохондрій гепатоцитів визначали активність сукцинатдегідрогенази (СДГ), цитохромоксидази (ЦХО) та вміст загального протеїну.

У контрольних тварин із низьким рівнем метаболізму активність СДГ та ЦХО в суспензії мітохондрій гепатоцитів є більшою, ніж у щурів із високим рівнем метаболізму, на 14 та 43% відповідно. Після курсу введення мелатоніну активність СДГ, одного з ключових ензимів циклу Кребса, виявляє тенденцію до зниження в щурів із високим рівнем метаболізму на 12%, а в щурів із низьким рівнем – не змінюється. Активність ЦХО, яка входить до IV комплексу дихального ланцюга, після введення мелатоніну виявляє тенденцію до зростання на 25% у тварин із високим рівнем метаболізму, а в щурів із низьким рівнем метаболізму навпаки – тенденцію до зменшення на 8%. Одержані результати вказують, що екзогенний мелатонін активує кінцеву стадію дихального ланцюга мітохондрій, але мало впливає на активність ензимів циклу Кребса. Це підтверджується існуючими в літературі даними про те, що мелатонін завдяки своїм антиоксидантним властивостям здатен попереджувати зниження активності I та IV комплексу дихального ланцюга мітохондрій, спричиненого окислювальним стресом. Вміст протеїну в суспензії мітохондрій гепатоцитів у щурів із високим рівнем метаболізму, які отримували мелатонін, вірогідно збільшується на 53%, а в тварин із низьким рівнем метаболізму – виявляє тенденцію до збільшення на 22%. Це вказує на активацію протеїнсинтетичної активності в гепатоцитах після курсу введення мелатоніну як у щурів з високим, так і з низьким рівнем метаболізму. Одержані нами дані свідчать про те, що в щурів із високим рівнем енергетичного метаболізму, які отримували мелатонін у дозі 5 мг/кг маси тіла, активність ензимів окисного фосфорилування змінюється істотніше, порівняно з тваринами з низьким рівнем метаболізму.

IMPACT OF ARGINASE AND CANAVANINE TREATMENT ON NORMAL HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES *IN VITRO*

^{1,2}CHEN O., ¹KVALETS B., ¹BARSKA M., ¹LYNIV L.,
¹VOVK O., ²SYBIRNA N., ¹STASYK O.

¹*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;*

²*Ivan Franko Lviv National University, Ukraine;*

e-mail: oleh.chen@gmail.com

Pharmacological deprivation of arginine with the recombinant arginine-degrading enzymes is a novel potential approach for cancer treatment which is currently under clinical trials. Canavanine (Cav), a toxic arginine analogue of plant origin, is a promising candidate for augmenting the antineoplastic effects of arginine starvation. Most anticancer drugs are non-selective cytotoxic agents to normal cells as well. Therefore, the immunotoxicological evaluation of potential therapeutic agents is a critical component in the development of new therapies.

In this study we evaluated the action of combined recombinant arginase (rhARG) treatment with Cav on proliferative potential and functional state of human peripheral blood lymphocytes (PBL) *in vitro*. Two experimental models of normal PBL, the mitogen phytohemagglutinin (PHA)-activated and primary isolated resting cells, were used. We demonstrated that rhARG significantly inhibited proliferation of PHA-activated PBL but did not drastically decrease cell viability. Cav in 0.1 mM concentration alone had no significant effect on proliferative potential of normal activated PBL. Incubation of PHA-activated PBL with Cav in the presence of rhARG caused a decrease in cell viability. However, arginine restriction by rhARG had no effect on normal resting PBL viability. Also, there was no statistically significant difference observed in the amount of viable cells in resting PBL under the combined treatment. Cav was cytotoxic for proliferatively active normal

lymphocytes at very high concentration range from 1 to 10 mM, and above 10 mM for resting cells. Normal resting PBL were much more resistant to both drugs' action.

We next evaluated the effect of the combined rhARG and Cav treatment on functional activity and apoptosis of the tested immune cells. We showed that PBL lost reaction to mitogen stimulation in the absence of arginine *in vitro* culture medium. Cav alone in arginine-rich medium had no pronounced effect on functional activity of PBL under stimulation by PHA in reaction of blast-transformation. Combined action of rhARG with Cav was more immunotoxic than rhARG alone, blocking the proliferation of PBL after stimulation by PHA. Cav at 0.1 mM range concentration upon rhARG treatment induced only slight progression of apoptosis in PHA-activated PBL. Minimal signs of apoptosis in PHA-activated cells were observed after 72 h of culture with rhARG alone (17%). In resting PBL, only spontaneous cell death was detected.

Therefore, normal resting PBL were more resistant to the combined drugs' action. These results will be important to consider in the design of subsequent animal studies of the combined anticancer treatments based on arginine deprivation.

БИОРЕГУЛЯТОРИ СТОВБУРОВИХ ТА ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ЗДАТНІ ЕФЕКТИВНО ПІДТРИМУВАТИ ЕНЕРГЕТИЧНИЙ СТАН ІЗОЛЬОВАНОЇ ПЕЧІНКИ ЗА ХОЛОДОВОЇ ІШЕМІЇ ТА ТЕПЛОВОЇ РЕОКСИГЕНАЦІЇ

*ЧЕРКАШИНА Д. В., СОСІМЧИК І. О., СЕМЕНЧЕНКО О. А.,
СЕМЕНЧЕНКО О. Ю., ПЕТРЕНКО О. Ю.*

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків;
e-mail: daria_cherkashina@ukr.net*

На сьогодні доведено, що терапевтичний потенціал стовбурових та прогеніторних клітин, особливо мезенхімального походження, зумовлено їхньою здатністю до продукування широкого спектра так званих біорегуляторів стовбурових та прогеніторних клітин (БСПК). Незважаючи на значні успіхи щодо встановлення деяких учасників та механізмів реалізації біологічних ефектів, дотепер нез'ясовано низку біохімічних процесів, завдяки регуляції яких і спостерігаються ці ефекти. Раніше було показано, що БСПК значно підвищують здатність печінки до спротиву стресорному впливу, завдяки активації альтернативних шляхів утворення макроергів (Cherkashina D. et al., 2011). Модель довгострокової холодової ішемії (ХІ) з подальшою тепловою реоксигенацією (ТР) ізольованої печінки є яскравим прикладом стресорного впливу, що призводить до значних порушень енергетичного балансу клітин. Тому метою цієї роботи було вивчення впливу БСПК у складі середовища зберігання на енергетичний стан ізольованої печінки під час ХІ та подальшої ТР.

Як джерело БСПК використовували цитозоль фетальних тканин мезенхімально-мезодермального походження плодів щурів 15–16 днів гестації. Цитозоль отримували шляхом високошвидкісного центрифугування та стандартизували за загальним вмістом протеїну. Розчином зберігання слугував сахарозо-сольовий розчин (ССР), розроблений в нашому Інституті (250 мМ сахарози, 1 мМ MgSO₄, 0,5 мМ CaCl₂, 15 мМ Na₂HPO₄, 30 мМ KН₂PO₄, 1% ПЕГ-8000; рН 7,4). Ізольовану печінку щурів зберігали при 0–4 °С протягом 24 год за відсутності (ССР-група) або у присутності БСПК у дозі 20 мкг протеїну/мл розчину (БСПК-група). Після цього орган реперфузували бікарбонатним розчином Кребс-Рингера (рН 7,4) протягом 60 хв при T = 37 °С. У якості контролю використовували свіжоізольовану печінку. У гомогенатах печінки вивчали дихальну активність мітохондрій полярографічним методом, а вміст АТФ, АДФ та АМФ – методом хроматографії високого тиску.

Довгострокова ХІ та подальша ТР призводять до збільшення порівняно з контролем швидкості дихання у стані V₄ у 1,9 та 2,5 раза відповідно. Але на тлі незначного зменшення швидкості V₃ спостерігається значне падіння дихального контролю (ДК) мітохондрій у 2,1 та 2,7 раза відповідно після ХІ та ТР. Внесення БСПК до розчину зберігання запобігає підвищенню V₄ після ХІ, зберігаючи

тим самим ДК на контрольному рівні. Після ТР швидкість дихання у стані 4 також знижується за дії БСПК. Крім того, фосфорилуюча швидкість дихання на 30% є вищою, ніж у ССР-групі, внаслідок чого ДК зростає майже в 2 рази. Ішемія печінки та подальша реоксигенація спричинюють значне, а щодо АТР навіть катастрофічне падіння вмісту аденінових нуклеотидів. За присутності БСПК рівень АТР є вищим, ніж у ССР-групі, в 3,6 і 9 разів після ХІ і ТР відповідно, досягаючи контрольного рівня. Рівень АDP у 2,8 раза нижче, ніж у ССР-групі, а вміст АМР підвищується в 1,6 і майже в 10 разів після ГЗ і НР відповідно порівняно з ССР-групою.

Таким чином, одержані результати демонструють яскраво виражений захисний ефект біорегуляторів щодо мітохондрій. Особливий інтерес викликає збільшення вмісту АМР за впливу БСПК після реоксигенації, що може призводити до активації АМР-залежної протеїнкінази, яка відіграє важливу роль у регуляції енергетичного стану та різних метаболічних процесів у клітинах печінки. Крім того, зростання рівня цього нуклеотиду може відбуватися за рахунок його циклічної форми, яка як вторинний месенджер може брати активну участь у реалізації ефектів біорегуляторів стовбурових та прогеніторних клітин.

РОЛЬ МЕТАЛОВМІСНИХ ПРОТЕЇНІВ У ФОРМУВАННІ РЕЗИСТЕНТНОГО ФЕНОТИПУ КАРЦИНОСАРКОМИ УОКЕР-256

*ЧЕХУН В. Ф., ЛОЗОВСЬКА Ю. В., ШВЕЦЬ Ю. В., НАЛЄСКИНА Л. А.,
БУРЛАКА А. П., ТОДОР І. М., ГАНУСЕВІЧ І. І.,
ЛУК'ЯНОВА Н. Ю., ДЕМАШ Д. В.*

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. С. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: Lozovskaya.2012@mail.ru*

Резистентність до протипухлинної терапії є однією з найактуальніших проблем сучасної онкології. У першу чергу це пов'язано з відмінностями метаболічних процесів як у пухлинах із чутливим та резистентним фенотипом, так і в нетрансформованих тканинах організму. Відомо, що значна кількість фізіологічних функцій здійснюється за участю системи металовмісних протеїнів. Нещодавно одержано дані про роль феритину (Фр), трансферину (Тр), церулоплазміну (Цп) у формуванні неоплазій із резистентним фенотипом до цитостатиків.

Метою роботи було дослідити особливості змін окремих металовмісних протеїнів: Фр, Тр, Цп, матриксних металопротеїназ ММП-2 та ММП-9 у сироватці та пухлинній тканині, комплексів «вільного заліза» та SH-груп у пухлинному осередку щурів з карциносаркомою Уокер у динаміці розвитку резистентності до доксорубіцину.

У досліджах використано модель карциносаркоми Уокер-256 з індукованою резистентністю до доксорубіцину. Проведено 6 щоденних внутрішньочеревних ін'єкцій доксорубіцину в дозі 1,5 мг/кг. На II етапі формування резистентності гальмування росту пухлини становило 30%, на III – 9%, в той час як у вихідному штамі (I етап) – 65–75%. Вміст Фр у сироватці крові та пухлині визначали методом ІЕА (ELISA) за допомогою автоматичного аналізатора Chem Well 2990, активність Тр, Цп та комплексів «вільного заліза» в сироватці та пухлинній тканині – із застосуванням методу ЕПР. Дослідження генерації активних форм кисню (АФК) та вмісту SH-груп у пухлинній тканині проводили з використанням проточної цитофлуориметрії. Активність ММП-2 та ММП-9 визначали методом зимографії.

Доведено, що на всіх етапах набуття резистентності до доксорубіцину в пухлинній тканині тварин із карциносаркомою Уокер-256 відбувається істотне підвищення рівня протеїнів, що задіяні в транспортуванні та депонуванні заліза – феритину та трансферину, в той час як у сироватці крові вміст феритину знижується, а трансферину – зростає. У динаміці розвитку резистентності до доксорубіцину

в пухлинній тканині зростає рівень «вільного заліза», що корелює з підвищенням АФК. Поряд із цим поступово збільшується вміст SH-груп та активність ММП-2 і ММП-9 у пухлині, що разом із паралельно визначеним зростанням активності церулоплазміну в сироватці крові цих тварин є свідченням мобілізації систем детоксикації та антиоксидантного захисту.

Встановлено, що за формування резистентності карциносаркоми Уокер-256 до доксорубіцину відбувається дерегуляція експресії металовмісних протеїнів із різноспрямованими їх змінами: з одного боку, перерозподіл протеїнів на рівні пухлини та організму, що беруть участь у депонуванні та транспорті заліза, з другого, – поступове зростання рівня протеїнів, які становлять основу антиоксидантного захисту. Внаслідок проведеного дослідження окреслено коло та зміни профілю металовмісних протеїнів, які можуть слугувати мішенню для засобів корекції, спрямованих на подолання резистентності до доксорубіцину.

ДОЗОЗАЛЕЖНИЙ ЕФЕКТ ПРОТЕЇНУ HSP60 ТА АНТИТІЛ ДО HSP60 НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ НЕОНАТАЛЬНИХ КАРДІОМІОЦИТІВ ЩУРІВ

¹ЧОРНИЙ С. А., ²ДОСЕНКО Є. В., ²ДРЕВИЦЬКА Т. І., ¹ЯКОВЕНКО Л. Ф.,
¹СМАЛЮК Ю. В., ¹КАПУСТЯН Л. М., ¹СИДОРИК Л. Л.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: sch_1982@yahoo.com;

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

Відомо, що розвиток серцево-судинних патологій супроводжується стресом та дегенеративними змінами у серцево-судинній системі, зокрема в міокарді. Попереднє дослідження плазми крові хворих із серцево-судинними захворюваннями та здорових людей, зокрема донорів, свідчить про зміну кількості антитіл до антистресового протеїну Hsp60. Причини такої зміни досі нез'ясовано. Окрім того, не відомо, який вплив мають антитіла до Hsp60 на міокард.

Метою роботи було дослідити вплив антитіл до протеїнів Hsp60 та Hsp60 на життєздатність неонатальних кардіоміоцитів щурів.

Згідно з попередніми даними та окремими даними літератури ми досліджували вплив протеїну Hsp60 та антитіл до Hsp60 у концентраціях 100, 50, 20, 10, 5 та 1 мкг/мл. Як негативний контроль було взято цитохром P450. Рівень дегідрогеназної активності негативного контролю залишався на рівні контролю (необроблені клітини). За допомогою МТТ аналізу, було виявлено, що Hsp60, незалежно від концентрації, сприяє збільшенню дегідрогеназної активності приблизно у 4 рази порівняно з контролем. Позаклітинний Hsp60 не пригнічує життєздатність клітин, а, навпаки, стимулює її, хоча деякі дані літератури свідчать про апоптичну активність позаклітинного Hsp60 через TLR4, які, як відомо, присутні на мембранах кардіоміоцитів. Гіпотетично позаклітинний Hsp60 здатен утворювати комплекси з антитілами до Hsp60 і спричиняти апоптичний сигнал. У подальших дослідженнях ми також плануємо перевірити можливий вплив таких комплексів на життєздатність кардіоміоцитів. Антитіла до Hsp60, на відміну від протеїну Hsp60 виявляють дозозалежний ефект на життєздатність неонатальних кардіоміоцитів щурів. Антитіла до Hsp60 у концентрації 1 та 5 мкг/мл не впливають на неї; кількість клітин залишається на рівні з контролем. Встановлено, що найвища доза антитіл до Hsp60 (100 мкг/мл) здатна пригнічувати життєздатність кардіоміоцитів. Дози 10, 20 та 50 мкг/мл, навпаки, виявляють високу стимулювальну дію на рівень життєздатності кардіоміоцитів. Тенденція негативного впливу високих концентрацій антитіл до протеїну Hsp60 у клітинному середовищі співпадає з нашими попередніми дослідженнями плазми крові хворих із серцево-судинними захворюваннями. Подальші дослідження впливу антитіл до Hsp60 на серцево-судинну систему сприятимуть розумінню процесів та причин розвитку серцево-судинних патологій.

ЕНЗИМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ КРОВІ В ЩУРІВ ІЗ РЕЗИСТЕНТНОЮ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА ЗА ВВЕДЕННЯ СИСТЕМИ РЕНІЙ-ПЛАТИНА

*ШАМЕЛАШВИЛІ К. Л., ОРЛОВА М. В., ЛЕУС І. В.,
ГОРІЛА М. В., ШТЕМЕНКО Н. І.*

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна;
e-mail: shamelashvili@rambler.ru*

Процес розвитку звичайної карциноми Герена призводить до оксидативного стресу і змін показників антиоксидантної системи крові [Леус, 2012]. Резистентність пухлин до лікарських препаратів, у тому числі до цисплатину, є однією з актуальних проблем сучасної медицини. У роботах, присвячених дослідженню особливостей розвитку резистентної до цисплатину карциноми Герена [Кулик, 2009; Жиленко 2013] система антиоксидантного захисту не вивчалася. Отже, метою роботи є дослідження зміни активності антиоксидантної системи (АОС) крові щурів за розвитку резистентної до цисплатину карциноми Герена та за застосування цитостатиків.

Роботу виконано на моделі резистентної карциноми Герена (Т8р). Введення цисплатину та сполук ренію у наноліпосомних формах різними способами проводили за [Shtemenko, 2007]. У крові щурів досліджували такі параметри: активність супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонтрансферази (ГТ) за загальноприйнятими методами.

Виявлено, що при розвитку Т8р активність антиоксидантних ензимів у крові щурів підвищується (СОД у 5, КАТ у 1,3 та ГТ 1,5 у раза), а активність ГП зменшується у 1,6 раза порівняно з контрольною групою. Натомість, розвиток звичайної карциноми Герена (Т8) призводить до зниження активності СОД та ГП на 14% та 51% відповідно, активність КАТ не змінюється. Отже, ензиматична активність АОС крові щурів-пухлиноносіїв за розвитку Т8р і Т8 працює по-різному: в групах щурів з Т8 вона пригнічується, а у Т8р, навпаки, активується. Вірогідно, активація АОС робить певний внесок у феномен резистентності. Введення цисплатину і кластерних сполук ренію призводить здебільшого до однакових змін усіх вивчаємих ензимів АОС як за розвитку Т8р, так і Т8, за виключенням СОД. У разі використання цитостатиків, якими є цисплатин, кластерні сполуки ренію і система реній-платина [Shtemenko, 2007–2013], нами знайдено 10–14-кратне зростання активності цього ензиму в крові щурів із перещепленою Т8р порівняно з контролем, яке не спостерігалось раніше за вивчення параметрів оксидативного стресу в органах щурів-пухлиноносіїв [Леус, 2011]. Численні дослідження показали, що в резистентних ракових клітинах до дії різноманітних зазвичай ефективних протиракових чинників (інтерлейкіну-1, фактора некрозу пухлин, цисплатину, іонізуючої радіації та ін.) відбувається оверекспресія ізоформ СОД [Tanigushi, 1992; Hirose, 1993; Kanebe-Narada, 2001; Svens, 2004], а супероксид-аніона відводиться одна із провідних функцій у формуванні резистентності. Одержані нами дані підтверджують ці положення та підкреслюють важливість подальших досліджень у цьому напрямі.

Показано різний процес функціонування ензиматичної антиоксидантної системи захисту в крові щурів-пухлиноносіїв за розвитку звичайної і резистентної до цисплатину карциноми Герена та підтверджено провідну роль супероксид-аніона у формуванні хіміорезистентності ракових клітин.

ПЕРОКСИДРАСЩЕПЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФИДНЫХ ИЛОВ КУЯЛЬНИЦКОГО ЛИМАНА

¹ШИХАЛЕЕВА Г. Н., ^{1,2}БУДНЯК А. К.

¹Физико-химический институт защиты окружающей среды
и человека МОН Украины и НАН Украины, Одесса;

²Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: ekko@ukr.net

Куюльницкий лиман относится к лиманам Северо-Западного Причерноморья закрытого типа и является уникальным месторождением лечебных сульфидных илов, рапы и минеральной столовой воды (стоимость только его илов оценивается ~ 7,5 млрд. долл. США). Средняя мощность лечебных илов по акватории лимана составляет 0,2–0,3 м, максимальная: в случае черного ила – 0,4÷0,6, совместного залегания темно-серых и черных – 0,6÷1,0 м. Для лимана характерны широкая амплитуда колебаний уровня воды, минерализации и, соответственно, биоразнообразия и биопродуктивности, что в конечном итоге регулирует качество и биологическую активность лечебных илов (Шихалеева, 2013). В последнее десятилетие вследствие непомерно возросшей антропогенной нагрузки на акваторию и территорию водосбора куюльницкого лимана и существенного изменения климатических условий экосистема находится в кризисном состоянии и быстро утрачивает способность к возобновлению природного ресурсного потенциала (Шихалеева, 2011). В компонентах экосистемы неоднократно (по данным анализа 668 проб воды и 480 проб илов) фиксировались превышения санитарно-гигиенических нормативов по азоту аммонийному, нефтепродуктам, тяжелым металлам (Cd, Pb, V, Cr, Zn).

В этих условиях интегральным показателем состояния биологической активности сульфидных илов куюльницкого лимана, их качества и пригодности для медицинского использования, а также оценки экологического состояния лимана может служить энзиматическая активность илов. Однако, несмотря на более чем вековую историю исследований, детальное изучение биологической активности илов, указывающих на интенсивность окислительно-восстановительных процессов в экосистеме куюльницкого лимана, не проводилось.

Учитывая их терапевтическую ценность, нами впервые проведено подробное изучение пространственного и временного варьирования суммарной пероксидащепляющей активности (ОПРА) и ее составляющих – неэнзиматической активности (НА) и энзиматической, собственно активности каталазы (АК) в поверхностном слое илов в интервале колебаний минерализации воды в лимане от 82 до 340‰ (2006–2009 гг.), рассмотрены особенности сезонных изменений в поверхностном (0–15 см) слое по площади лимана и в вертикальном профиле 0–115 см с шагом 10–15 см.

Отбор проб илов осуществляли по сети 14 станций постоянного мониторинга, расположенных вдоль акватории лимана. Всего было отобрано и проанализировано >127 образцов проб.

В результате проведенных исследований обнаружена достаточно четкая обратная зависимость между соленостью воды в лимане и величинами энзиматической составляющей пероксидащепляющей активности. В межгодовой сезонной динамике не зафиксированы однозначные закономерности изменений исследуемых показателей, что вероятнее всего связано с множеством факторов климатического и антропогенного происхождения, а также вариабельности в составе и свойствах илов куюльницкого лимана (Эннан, 2012). При этом в большей части исследуемых проб наблюдается преобладание неэнзиматической составляющей над энзиматической, особенно при значениях солености воды, превышающих критическую для жизнедеятельности гидробионтов отметку (> 160‰).

ОСОБЛИВОСТІ СИГНАЛЬНОЇ МЕРЕЖІ В-ЛІМФОЦИТІВ ПРИ Х-ЗЧЕПЛЕНОМУ ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНОМУ СИНДРОМІ ПЕРШОГО ТИПУ

ШЛАПАЦЬКА Л. М., ГОРДІЄНКО І. М., КОВАЛЕВСЬКА Л. М., СИДОРЕНКО С. П.

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. С. Кавецького НАН України, Київ;
e-mail: hordiyenko24@mail.ru*

Мутації *SH2D1A/DSHP/SAP* гену, що кодує SLAM-асоційований протеїн (SAP), призводять до розвитку Х-зчепленого лімфопрولیферативного синдрому першого типу (XLP1). XLP1 характеризується низкою імунологічних порушень, зокрема збільшенням ризику виникнення В-клітинних лімфом у 200 разів. Деякі дослідження вказують на присутність внутрішніх порушень у В-лімфоцитах за XLP1, які здатні впливати на процеси диференціювання, проліферації, виживаності та апоптозу клітин і слугувати однією з причин лімфомагенезу. Метою роботи було встановлення особливостей сигнальної мережі В-лімфобластоїдних ліній клітин, одержаних за трансформації вірусом Епстайна-Барр В-лімфоцитів хворих на Х-зчеплене лімфопрولیферативне захворювання (XLP В-LCLs) порівняно з В-лімфобластоїдними лініями клітин (В-LCLs). Дослідження проводили на XLP В-LCLs IARC 739, XLP-D, XLP-8005, SC-XLP та RP-XLP; В-LCLs T5-1, 6.16, RPMI 1788 і MP-1 за допомогою МТТ-тесту, проточної цитофлуориметрії, кількісної ПЛР, Вестерн-блот-аналізу.

Всі досліджені лінії клітин характеризуються специфічним для В-лімфоцитів поверхневим фенотипом. Рівень експресії CD19, CD40, CD48, CD80, CD95, CD150 та IgM поверхневих рецепторів в XLP В-LCLs і В-LCLs є подібним. Однак рівень експресії CD20, CD38 та CD86 більший вдвічі в XLP В-LCLs порівняно з В-LCLs. Функціональний аналіз досліджуваних ліній клітин стосувався модуляції через поверхневі рецептори CD95-опосередкованого апоптозу та проліферації. Виявлено суттєві відмінності в модуляції CD95-опосередкованого апоптозу через рецептори CD150 та CD40 в XLP В-LCLs та В-LCLs. Так, лігація рецептора CD40 компенсувала індукцію CD95-опосередкованого апоптозу, що не спостерігається в XLP В-LCLs. Сигнали через CD150 не впливають на рівень CD95-опосередкованого апоптозу та на синергічний ефект CD40- і CD95-ініційованих сигнальних каскадів в XLP В-LCLs. В той самий час в В-LCLs сигнали через CD150-рецептор збільшують чутливість до CD95-індукованого апоптозу, а колігація CD40 та CD150 виявляє антагоністичний ефект. Ключовий внесок у проліферативну активність В-клітин належить CD40-опосередкованому сигнальному каскаду. В XLP В-LCL IARC 739 виявлено порушення проліферативної активності у відповідь на лігацію CD40-рецептора. В клітинних лініях MP-1, T5-1 та IARC 739 відбувається активація Akt- та ERK-сигнальних каскадів після лігації CD150, CD40 та IgM. CD150 при колігації з IgM відіграє домінуючу роль в активації Akt- та ERK-сигнальних каскадів в XLP В-LCL IARC 739. Відмічено дві хвили активації ERK1/2 після лігації CD150 в XLP В-LCL IARC 739. Спостерігаються відмінності в кінетиці та амплітуді активації Akt-сигнального каскаду в SAP- В-LCL T5-1 і SAP+ В-LCL MP-1. Аналіз рівня експресії ключових транскрипційних факторів, задіяних в розвитку зародкових центрів лімфоїдних фолікулів та диференціюванні В-лімфоцитів в плазматичні клітини, виявив, що зниження рівня експресії мРНК IRF4, IRF8 та PU.1 є основними особливостями XLP-В-LCLs.

Таким чином, одержані дані демонструють, що В-лімфобластоїдні лінії клітин, одержані від хворих на Х-зчеплене лімфопрولیферативне захворювання, характеризуються низкою особливостей в модуляції апоптозу, проліферації та кінетики активації Akt- та ERK-сигнальних каскадів, а зниження рівня експресії транскрипційних факторів IRF4, IRF8 та PU.1 вказує на порушення диференціювання В-лімфоцитів при XLP1.

КЛОНУВАННЯ ГЕНА *MDM 1* МИШЕЙ ТА ЙОГО ЕКСПРЕСІЯ У ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИНАХ

ШТАПЕНКО О. В.

Інститут біології тварин НААН, Львів, Україна;
e-mail: o_shtapenko@mail.ru

Ген *mdm 1* (murine double minute 1) вперше був ідентифікований в трансформованих клітинах мишей лінії 3Т3 разом із проонкогеном *mdm2*. Обидва гени *mdm 1* і *mdm 2* розміщені на дистальному кінці 10-ї хромосоми (СНР) мишей. Незважаючи на те, *mdm 2* є добре вивченим геном, дуже мало відомо про *mdm 1* (12,13). Цей ген ідентифіковано в різних тканинах мишей, зокрема експресію *mdm1* встановлено в сім'яниках, мозку, легенях, гіпокампі, підшлунковій залозі, шлунку, в різних лініях трансформованих клітин, однак за стресу його експресія посилюється.

Для гена *mdm 1* миші описані два транскрипти, довший, який містить 14 екзонів (GI: 27229284) та коротший, що містить тільки перших чотири екзони (GI: 6754669). Встановлено також декілька альтернативних сплайс-варіантів мРНК *mdm 1* мишей, які продукують різні форми протеїнів. Деякі з цих протеїнів локалізовано в ядрі та мембранах клітин, однак їхні функції досі мало вивчені.

Детальне дослідження функцій гена *mdm 1*, його різних транскриптів дозволить з'ясувати роль гена в процесах проліферації та апоптозу як за фізіологічних умов, так і за стресу.

Метою нашої роботи було клонування гена *mdm 1* миші, його експресія в клітинах *E. coli* та трансфікованих клітинах лінії РТ67.

Із геномної ДНК із використанням двох пар праймерів було ампліфіковано два фрагменти гена *mdm 1*. Кожен фрагмент після детекції на відповідність продуктів ампліфікації заданій довжині та екстракції з агарозного гелю клонували по сайтам *Xba* та *SalI* відповідно у вектор pCR II-Торо (Invitrogen). Після трансформації плазмідної ДНК в компетентні клітини *E. coli* та виділенням з одержаних клонів плазмідної ДНК, проводили скринінг кожної зі вставок після рестрикції ендонуклеазами. Обидва відібрані фрагменти після рестрикції *EcoRI* переклонували до плазмідного вектора рMEV-2НА, який попередньо розрізали за сайтами рестрикції *Xba* та *SalI*. Одержаною конструкцією трансформували хімічно-компетентні клітини *E. coli*. Розміри вставок кДНК-позитивних клонів визначали рестрикційним аналізом після електрофорезу одержаного ПЛР-продукту в 1%-му агарозному гелі.

Тимчасову трансфекцію пакуючої лінії клітин РТ67 проводили з використанням одержаної плазмідної ДНК та реагенту LipofectAMINE (Life Technologies, Inc.) згідно з рекомендаціями виробника. Експресію *mdm 1* вивчали методом вестерн-блот-аналізу. Детекцію протеїну Mdm1 здійснювали з використанням поліклональних анти-Mdm1 антитіл.

Результати наших досліджень показали, що протеїн з молекулярною масою близько 45 кДа, який відповідає розмірній формі досліджуваного протеїну, ефективно експресується в трансфікованих клітинах пакуючої лінії РТ67.

EXPRESSION OF MARKER PROTEINS OF THE EPITHELIAL STEM/PROGENITOR CELLS P63, CK5/14 IN ORAL MUCOSA FROM PATIENTS WITH PRECANCEROUS LESIONS AND RISK OF ORAL CANCER

*YURCHENKO N. P., KIRIEIEVA S. S., SIDORENKO M. V.,
PERSHKO N. Yu., PROTSYK V.*

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv;
e-mail: natalipershko@gmail.com*

Recent studies suggest that the proteins, of nuclear regular marker of the epithelial stem/progenitor cells p63 and marker of the stem cells cytokeratins Ck5/14 typically expressed by cells in the basal layer of normal stratified squamous epithelium that is also niche the epithelial stem/progenitor cells.

The p63 protein have epithelial stem-cell regulatory functions and play an important role in regulating epithelial proliferation, differentiation and apoptosis. Ck 5/14 cytokeratins associated with the proliferative potential of the epithelial stem cells. The aim of this study was estimated the expression markers of epithelial stem cells p63, Ck5/14 and their biology in epithelium of oral mucosa from patients with epidemiological risk of oral cancer and in precancerous lesions.

The study include biopsy specimens of oral mucosa from men that nonsmoking (control group, 10 cases, material forensic medical examination), with smoking habits (group of epidemiological risk; 13 cases, material forensic medical examination, of precancerous lesions (37 cases). The alteration of oral mucosa were classified according to the UICC criteria and expression of p53. The histopathological alterations and precancerous lesions in oral mucosa were: hyperplasia (5 cases), leucoplakia (5 cases), dysplasia low (5 cases), dysplasia mild (9 cases), dysplasia height (5 cases), *Ca in situ* (8 cases). Immunohistochemically were study the expression of proteins p63 and cytokeratins Ck5/14 in the epithelial layers of oral mucosa. The tissue sections were immunohistochemically stained using monoclonal antibodies: for p63 (clone 4A4, antibody to all isotype), for Ck5/14 (clone LL002), for p53 (clone DO-7, antibody to wild/mutant type), visualization EnVision "Daco Cytomation" and counted according to the epithelial layers as labeling index (LI, %).

Basal cells of normal epithelium of the oral mucosa strongly expressed marker proteins of epithelial stem cells p63 and Ck5/14 as the predominant (control group basal layer, p63, range LI (%) 34.6-63.0%; Ck5/14, range LI (%) 26.0-39.7%; suprabasal layers p63, range LI (%), 3.0-10.0%; Ck5/14, range LI (%), 1.0-5.0%). In the oral mucosa of individuals with risk revealed of the histopathological progression. There were: hyperplasia (2 cases), dysplasia low (2 cases) dysplasia mild (2 cases), dysplasia height (4 cases). In oral mucosa from individuals with smoking habits and in precancerous lesions showed anomaly distribution of cells that expressed markers p63 and Ck5/14 in suprabasal layers and areas transformed phenotype. The suprabasal immunoexpression and Labeling Index (LI, %) of p63 and CK5/14 were significantly higher in height -grade dysplasia and *Ca in situ* (LI (%) suprabasal layers, p63, Ck5/14, hyperplasia, 6.6, 5.2; dysplasia low, 7.5, 7.1; dysplasia mild, 24.9, 19.2; dysplasia height, 30.6, 29.8; *Ca in situ*, 48.8, 44.8, respectively) ($P < 0.005$).

Its to confirm the participation of cells that expressed of markers proteins of the epithelial stem/progenitor cells p63 and Ck5/14 in formation of transformed phenotype and biology of oral cancer. The architectural alteration of stem cells distribution in the layers of epithelial dysplasia may provide useful information to evaluate to the grading oral dysplasia. The immunohistochemical estimation of Labeling Index (LI %) of p63, Ck5/14 cells in suprabasal epithelial layers of oral mucosa represent high risk of development of cancer and can be used for differential diagnostic dysplasia and *Ca in situ*.

**ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ АНТИОКСИДНОГО ЗАХИСТУ
В ЩУРІВ ІЗ РІЗНИМ ЕМОЦІЙНИМ СТАТУСОМ
ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАБДОМІОЛІЗУ**

ЯКОВЕНКО М. Г., ОХРИМЕНКО С. М., КАЛІМАН П. А.

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, Україна;
e-mail: m.yakovenko@list.ru*

Реакція організму у відповідь на дію стресора залежить від індивідуальних особливостей нервової системи. Виходячи з цього, метаболізм в умовах стресу потрібно вивчати, беручи до уваги індивідуальні особливості, що часто виявляються в поведінкових реакціях організму. Однією з моделей оксидативного стресу, під час якого зміщується рівновага в системі прооксиданти – антиоксиданти в бік накопичення активних форм кисню та нітрогену, є експериментальний рабдоміоліз. Рабдоміоліз – руйнування міоцитів із виходом міоглобіну в кров, що спричинює накопичення великої кількості вільного гема в крові та його розповсюдження в органах та тканинах. Надлишок вільного гема посилює утворення активних форм кисню та нітрогену з подальшим окислювальним пошкодженням біомолекул. Важливими показниками системи антиоксидантного захисту в організмі є каталаза та непротеїнові тіоли. У зв'язку з цим метою роботи було дослідження активності каталази та вмісту непротеїнових SH-груп у тканинах щурів із різним емоційним статусом за експериментального рабдоміолізу.

У роботі використовували щурів-самців лінії Wistar з масою тіла 160–220 г, які утримувалися в стандартних умовах віварію. Тварин попередньо було протестовано за допомогою методу «відкритого поля», що дозволяє визначити емоційний стан організму за кількістю фізіологічних відправлень у разі поміщення тварин у незнайомі умови. За результатами тестування було сформовано 2 групи щурів: високоемоційні (1-ша група) та низькоемоційні (2-га група).

Рабдоміоліз моделювали введенням 50%-го водного розчину гліцеролу в дозі 1 мл на 100 г маси тіла щурів по 0,5 дози в кожній стегновій м'яз. Тварин брали в експеримент через 4 години після введення гліцеролу. Для оцінювання прооксидантної дії гліцеролу в гомогенатах печінки та серця визначали інтенсивність неензиматичного пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) за швидкістю накопичення малонового діальдегіду (МДА). У гомогенатах печінки та серця визначали активність каталази за утворенням забарвленого комплексу з молібдатом амонію, а за допомогою титриметричної фотометрії в гомогенатах печінки, нирок, серця та мозку – вміст непротеїнових SH-груп.

Встановлено, що введення гліцеролу спричинювало вірогідне підвищення інтенсивності ПОЛ в печінці та серці обох груп досліджуваних тварин, що свідчить про активацію окисних реакцій за цих умов. Активність каталази після введення гліцеролу підвищується у тканинах як високоемоційних, так і низькоемоційних щурів. Введення гліцеролу спричинює вірогідне зниження вмісту непротеїнових SH-груп у печінці та серці низькоемоційних тварин. Така дія гліцеролу на тіолові сполуки може бути пов'язана з окисленням SH-груп та утворенням дисульфідів в умовах оксидативного стресу. Таким чином, одержані дані свідчать про наявність різниці в неензиматичній ланці системи антиоксидантного захисту щурів залежно від їх емоційного статусу.

ЗАЛУЧЕННЯ РІЗНИХ ІЗОФОРМ ФОСФОЛІПАЗИ C У РЕГУЛЯЦІЮ РУХУ ПРОДИХІВ САЛІЦИЛОВОЮ КИСЛОТОЮ

ЯКОВЕНКО О. М., КАЛАЧОВА Т. А., ЧОРНОМОРЧЕНКО С. С., КРАВЕЦЬ В. С.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;

e-mail: yon@bpci.kiev.ua

Ензими ліпідного метаболізму є невід'ємною складовою сигнальних систем клітин, що забезпечують адаптивні реакції рослинного організму, зокрема закривання продихових щілин за дії стресасоційованих фітогормонів. Раніше нами було запропоновано індукований саліциловою кислотою (СК) каскад, що включає низку ензимів, зокрема фосфоліпази D та NADPH-оксидази RbohD (Kalachova, Iakovenko et al., 2013). Аналіз літературних даних свідчить про можливу участь також фосфатидил-інозитол специфічних фосфоліпаз C у регуляції руху продихів саліциловою кислотою.

Було досліджено вплив СК на регуляцію руху продихів рослин *Arabidopsis thaliana* дикого типу Columbia-1, також дефектних за різними ізоформами фосфоліпази C – *plc-1*, *plc-8* та *plc-9*. Листові пластинки переносили в темряву для індукції закривання продихів та через 2 год вимірювали продихову апертуру. Далі зразки повторно поміщали на світло та проводили вимірювання через різні часові проміжки (30, 60, 90, 120 хв). Для визначення впливу неоміцину та інгібітору фосфоліпази U73122 на продихову апертуру речовини вносили в середовище інкубації зразків та витримували 30 хв, після чого додавали СК та інкубували на світлі ще через 30 хв. Вимірювання продихової апертури проводили на абаксіальній поверхні сформованих розеткових листків. За 2 год утримання в темряві закриття продихів спостерігається як у рослин дикого типу, так і у всіх трансгенних ліній. Наступне перенесення на світло спричиняло повторне відкривання продихів у всіх рослин. Дослідження динаміки змін продихової апертури показали, що в мутантних рослин *plc-1* відкривання продихів відбувається повільніше. Так, через 60 хв перебування на світлі середнє значення ширини продихової апертури в цих рослин складало тільки 60% порівняно з диким типом. Надалі при збільшенні тривалості перебування в умовах освітлення до 120 хв показник зрівнювався в усіх варіантах.

Нами було досліджено також участь ФЛС у реакції продихового апарату рослин на дію СК. Введення саліцилової кислоти 1 мМ призводить до закривання продихів у рослин дикого типу, однак ефект в присутності специфічного інгібітору фосфоліпази C U73122 та хелатору іонів кальцію – неоміцину є пригніченим. Для вивчення участі окремих ізоформ ФЛС у відповіді на дію фітогормону нами було досліджено вплив СК на продихи рослин, мутантних за експресією різних ізоформ фосфоліпази C – *plc-1*, *plc-8* та *plc-9*. З'ясовано, що продихи рослин *plc-1* слабкіше реагують на вплив СК, ніж рослин *plc-8*, *plc-9* та дикого типу. Обробка рослин, дефектних за різними ізоформами ФЛС саліциловою кислотою показала головну роль *plc-1* у регуляції руху продихів цим фітогормоном. Так, амплітуда змін продихової апертури в рослин дикого типу, *plc-8* та *plc-9* становить близько 50%, в той час як у *plc-1* цей показник становить не більше 20%. Поєднання дії СК зі специфічним інгібітором ФЛС – U73122 призводить до пригнічення закриття продихів СК в усіх досліджених мутантних лініях та в рослин дикого типу. Внесення хелатору кальцію – неоміцину – також зменшує ефект СК. Цікаво, що у контрольному варіанті більшу ефективність виявляв U73122, а у дефектних за *plc-8* та *plc-9* рослин – неоміцин. Одержані дані вказують на особливу роль саме ФЛС-1 у швидких реакціях рослин на зміни навколишнього середовища.

Робота виконана за підтримки грантів НАН України 2.1.10.32 і № 8-14.

Алфавітний покажчик

- Абрат О. Б. 123
Авдєєва Л. В. 25, 34
Акопова О. В. 124
Александрова Е. В. 172
Алі С. Г. 184
Андрійчук Т. Р. 124
Андрущенко О. О. 136
Антоненко І. В. 20
Антонюк В. О. 42, 85
Антонюк Р. В. 42
Антропов С. М. 203
Атамнах Салах 125, 171
Афанасенко О. В. 70
Афанасьєва К. С. 36
Ахатова Ю. С. 99
Бабенко Н. А. 91, 216
Бабийчук Л. А. 54
Бабич Р. Ю. 196
Бабій С. О. 195, 203
Бабіч Л. Г. 92
Бабушкіна О. О. 166
Базалій А. В. 92
Башта Ю. М. 197
Бджола В. Г. 82, 179
Бєвза А. А. 62
Беланд Ф. А. 158
Беленичев И. Ф. 127, 128
Беленичева О. И. 172
Бельї А. Н. 216
Берегова Т. В. 164
Березницький Г. К. 67
Белінська І. В. 136
Била Ю. В. 128
Биць Н. В. 109
Білецька Л. П. 117
Білик Ж. І. 108
Білоус В. Л. 76
Бленер В. С. 120
Блюм Я. Б. 73
Богуцька К. І. 43
Божков А. И. 94
Бондарь В. В. 185
Борисова Т. О. 155
Бояршин К. С. 16
Броварська О. С. 44
Бучковська І. М. 165
Бобкова Л. С. 179
Бова Д. О. 93
Божкова Ю. О. 129
Бойко В. І. 92
Бондарчук Т. І. 117
Борецький А. Л. 83
Борисов А. А. 155
Борисова Н. М. 173
Братусь Л. Б. 140
Бродяк І. В. 215
Бугайцов С. Г. 138
Будняк А. К. 227
Букреєва Т. В. 17
Буланкина Н. И. 144
Булигіна Т. В. 44
Бурда В. А. 215
Бурдилюк Н. І. 130
Бурлака А. П. 189, 224
Бытлан А. Н. 214
Варбанець Л. Д. 44
Васильковська Р. А. 130
Векліч Т. О. 96, 174
Верьовка С. В. 18
Весельський С. П. 125, 171
Вівчарик М. М. 45
Вінніков А. І. 132
Вовк А. І. 5, 57, 83
Водоп'янова О. О., 184
Волинець Г. П. 82
Волкова Н. О. 198
Воронкова О. С. 132, 156, 206
Воронкова Ю. С. 133
Воротніков О. В. 92
Гавас А. А. 129
Гавенаускас Б. Л. 140
Гаврилюк Д. Я. 40
Гайда Г. З. 47
Галицький В. А. 97
Галкин Б. Н. 177
Ганусєвіч І. І. 224
Ганусова Г. В. 135
Гаркава К. Г. 44
Гарманчук Л. В. 136, 186
Гармаш Я. А. 137
Гарькавенко В. В. 208
Геращенко Г. В. 75
Геращенко Д. С. 109
Гиренко Л. С. 212

- Гільфанов А. Р. 138
Гірич М. С. 139
Гірін С. В. 20
Гладких А. И. 81
Гоженко С. С. 214
Голіченко О. А. 195
Гомза Б. В. 139
Гончаренко А. В. 141
Гончаренко М. С. 141
Гончар М. В. 47
Гончар О. О. 140
Горак І. Р. 109
Горбачёва С. В. 128
Горбач О. І. 80
Гордієнко І. М. 160, 228
Горницька О. В. 48
Горіла М. В. 158, 192, 226
Грабовська О. І. 143
Граніч В. М. 22
Гребіник Д. М. 164
Гриненко Т. В. 21, 72, 89
Гриценко М. А. 144
Грищенкова О. О. 198
Гром М. Ю. 22
Гронская Р. И. 181
Грязнова Т. А. 32
Гудзера О. Й. 29
Гудзь Є. А. 145
Гудкова О. О. 146
Гулевський О. К. 23, 99, 198
Гуль А. Л. 148
Гуменюк В. П. 50, 83
Данилович Г. В. 100, 163
Данилович Ю. В. 100, 163
Даніловський С. В. 147, 167
Данкевич Л. А. 63
Делеменчук Н. В. 189
Демаш Д. В. 224
Деміхов Ю. Н. 173
Денєга І. О. 51
Денисенко Н. В. 117
Дергай М. В. 24
Дергай О. В. 24
Дзюба В. Н. 185
Доброход А. С. 22
Донченко Г. В. 189, 191
Досенко Є. В. 225
Драган А. І. 68, 87
Драговоз І. В. 25, 63
Древицька Т. І. 225
Дробот Л. Б. 32, 92, 109
Дубей І. Я. 16, 60, 69
Дубовецький А. С. 67
Дудок К. П. 148
Дьомшина О. О. 169
Ельський В. Н. 149
Ерстенюк А. М. 158
Євтушенко М. Є. 120
Єгорова Д. Є. 150
Ємельяненко В. Ю. 151
Ємець А. І. 193
Єфіменко Н. В. 148
Жерносеков Д. Д. 21, 76
Жилєнков А. В. 57
Забирник А. 101
Заведєя Т. Л. 149
Засєць І. В. 180
Заморська Т. М. 221
Запорожченко О. В. 162
Зелєна Л. Б. 25, 34
Землянских Н. Г. 54
Зіменковський Б. С. 40
Золотарьова О. К. 79, 84
Зяблицев С. В. 149
Ильченко Н. Н. 16
Ильків І. І. 117
Ильченко О. О. 45
Іскра Р. Я. 152
Кавсан В. М. 17
Калачнюк Г. І. 153
Калачнюк Л. Г. 153
Калачова Т. А. 232
Каліман П. А. 184, 231
Кальченко В. І. 28, 83, 186
Кандаурова Н. В. 92
Капля О. А. 55
Капустян Л. М. 225
Капустяненко Л. Г. 56, 76
Карахім С. О. 120
Карбовський Л. Л. 93, 119, 138
Карпов П. А. 73
Карповець Т. П. 154, 164
Касаткіна Л. О. 155
Кельш Я. П. 179
Кибирев В. К. 28
Кизилова В. Ю. 157
Кирик В. М. 61
Кириченко К. С. 156
Кириченко С. В. 143
Кирошка В. В. 129
Кіндрат І. П. 158
Кленіна І. А. 158

-
- Климишин Н. І. 51
Климова Е. М. 94
Князева М. В. 159
Кобець Т. С. 158
Кобзар О. Л. 57
Ковалевська Л. М. 160, 228
Ковалевська О. В. 147
Коваленко Н. О. 108
Коваленко О. П. 16, 29
Ковельська А. В. 160
Ковзун О. І. 161
Ковтун Ю. П. 69
Козеко Л. Є. 102
Козлова Е. В. 185
Козлов О. В. 68
Кокошкіна О. О. 162
Колесникова И. Н. 67
Колесникова С. В. 149
Колибо Д. В. 7, 105
Коломієць О. В. 100, 163
Колчинская Л. И. 124
Комісаренко С. В. 7, 9, 33, 67, 92, 105
Компанець І. В. 164
Коновалова Е. О. 141
Конопельнюк В. В. 154, 180, 218
Копильчук Г. П. 165
Корнелюк О. І. 22, 30, 68, 69, 87
Корольова Д. С. 48, 59, 186
Короткевич Н. В. 105
Короткий О. Г. 164
Косик О. І. 166
Костарева А. 101
Костина Т. В. 196
Костіна В. Г. 60
Костерін С. О. 8
Кот Е. В. 31, 144
Кот Ю. Г. 31
Кошлякова Т. А. 173
Кравець В. С. 232
Кравчук І. О. 167
Красова Н. С. 81
Кривдюк І. В. 147, 167
Криклива В. О. 32
Крикливый И. А. 16
Крисанова Н. В. 155
Крисенко О. В. 206
Кропивко С. В. 32
Кубайчук К. І. 168
Кулиш А. С. 31
Кулініч О. С. 169
Кургузова Н. И. 94
Кургузова Н. І. 139
Кучер Т. В. 127
Кучма М. Д. 61
Кучмеровська Т. М. 205
Кшемінська Г. П. 47
Лахай Д. А. 170
Лабинцев А. Ю. 7, 105
Лабинцева Р. Д. 62
Латишко Н. В. 146
Левадянська Ю. А. 125, 171
Левицкий А. П. 175
Левич С. В. 172
Левченко С. М. 45
Леонова Н. О. 25, 63
Лесик Р. Б. 40
Леус І. В. 64, 192, 226
Липова Н. М. 107
Лисенко Н. А. 60
Литвиненко Е. С. 128
Литвиненко О. О. 138
Лісняк Ю. В. 65
Лобинцева Г. С. 61
Лобинцев Д. В. 61
Лозовська Ю. В. 113, 224
Луговської Е. В. 8, 33, 48, 61, 67, 186
Лукашеня О. С. 161
Лукаш Л. Л. 71
Лук'янова Н. Ю. 113, 224
Луцик О. Д. 42
Луцак О. В. 202, 208
Люта М. Я. 215
Лысенко О. Б. 173
Мазур С. П. 198
Мазур Ю. Ю. 96, 174
Маймистова А. Г. 143
Макаренко О. А. 175
Макогоненко Є. М. 33, 67
Макоед О. Б. 172
Максимюк Г. В. 176
Малашичева А. 101
Малеев В. А. 185
Малина А. Е. 68
Малишев А. Б. 139
Малярчик И. О. 177
Манойлов К. Ю. 105
Маньковская И. Н. 124, 140
Манько Н. О. 40
Матасова Я. В. 184
Марченко М. М. 120
Матишевська О. П. 106
Мельник Н. И. 196

-
- Мензянова Н. Г. 157
Мешкова Н. О. 179
Мигаль Л. Я. 204
Микоша О. С. 161
Микуляк В. В. 69
Михайлюк В. В. 60
Мінченко О. Г. 93, 107, 119, 137, 168, 197
Мінченко Д. О. 93, 107, 138, 147, 167
Міщенко О. В. 179
Моргасенко О. О. 179
Моргунцова С. А. 128
Морозова Е. С. 144
Мячинська М. 24
Нагірняк А. В. 180
Налескіна Л. А. 224
Науменко Н. В. 20
Негеля А. О. 33
Негруцька В. В. 60, 69
Нечипуренко О. О. 34
Никандров В. Н. 181, 182
Нипот Е. Е. 183
Ніженковська І. В. 70
Нікітаєв С. В. 204
Нікітченко І. В. 184
Нікітченко Ю. В. 184
Ніколаєнко Т. В. 186
Негруцький Б. С. 33
Никитченко И. В. 185
Никитченко Ю. В. 185
Нікуліна В. В. 136, 186
Нікуліна Г. Г. 204
Новохацька О. В. 24
Носар В. І. 140
Носарь В. И. 124
Овсянникова Т. Н. 81
Олейниченко Е. К. 31
Омельченко Е. 101
Омельченко Ю. О. 188
Орлова М. В. 226
Орлова Н. В. 183
Осадчук Т. В. 28
Осинский С. П. 10
Осінська Л. Ф. 70
Остапченко Л. І. 124
Охріменко С. М. 231
Палладіна Т. О. 108
Панасюк Н. Б. 117
Панчук Р. Р. 40
Паньківський С. В. 24
Пасічна Е. П. 189
Пасічник Г. В. 109
Перский Е. 101
Петренко О. Ю. 198, 223
Петренко Ю. О. 198
Петрусенко Г. П. 181
Петрушенко А. М. 192
Петрова Г. В. 191
Петров С. А. 110, 167, 214
Петухов Д. М. 92, 109
Пирогова Л. В. 67
Пирогов В. О. 204
Підгерська Л. О. 212
Підпала О. В. 71
Платонова А. А. 81
Платонова Т. М. 48, 59, 61
Плоховська С. Г. 193
Поворознюк О. О. 109
Погрібний І. П. 158
Поліщук В. В. 138
Полохіна К. В. 195
Пономаренко А. Н. 196
Пономарь А. А. 214
Попадюк В. В. 72
Порубльова Л. В. 33
Присс А. Е. 16
Пыжова Н. С. 182
Радченко Г. Д. 22
Раевский А. В. 16
Раєвський О. В. 73
Ракша Н. Г. 124
Ратушна О. О. 197
Ребрієв А. В. 25
Рейті Г. Е. 200
Реліна Л. І. 198
Репін М. В. 23
Решетнік С. М. 125, 171
Рибальченко В. К. 136
Рибачук В. М. 89
Рибенчук А. О. 75
Риндич А. В. 24, 32
Рогульська О. Ю. 198
Родик Р. В. 28
Рока-Моя Я. М. 76
Романюк С. І. 7
Росаловський В. П. 199
Ростока Л. М. 200
Сабадашка М. В. 201
Савінова І. В. 20
Савчук О. В. 72, 88
Савчук О. М. 154, 180, 218
Сагач В. Ф. 124
Салига Н. О. 152

-
- Салига Ю. Т. 199
Сальникова Н. В. 167
Самойленко А. А. 109
Самофалова Д. О. 73
Сварчевська О. З. 152
Свергун Н. М. 80
Скачкова О. В. 186
Семанюк У. В. 202
Семеніхін А. В. 79, 84
Семенов С. С. 203
Семенченко О. Ю. 223
Семенченко О. А. 223
Семерникова Л. І. 75
Семчишин Г. М. 112, 130, 139
Сербіна І. Є. 204
Сергійчук Ю. Т. 205
Серкіз Р. Я. 47
Сибірна Н. О. 51, 201
Сиволоб А. В. 36
Сидоренко С. П. 10, 160, 228
Сидорик Л. Л. 22, 225
Сидорик Є. П. 220
Сидоров В. І. 94, 185
Сидор Р. І. 80
Сидун М. С. 149
Сичевская Л. В. 81
Сівко Р. В. 155
Сідашенко О. І. 132
Сіренко Ю. М. 22
Сірокваша О. А. 132
Скачкова О. В. 80
Склярів О. Я. 117, 151
Склярів П. О. 117
Скляр Т. В. 206
Скок М. В. 11
Слівінська О. М. 152
Смалюк Ю. В. 225
Соколик В. В. 37
Сокур О. В. 188
Сосімчик І. О. 223
Старикович Л. С. 148
Старосила С. А. 82
Стасик О. Г. 51
Стасюк Н. Є. 47
Стойка Р. С. 40
Стороженко Г. В. 208
Стрільбицька О. М. 208
Танчук В. Ю. 57, 83
Тимофійчук О. А. 91
Тихомиров А. О. 21
Тихоненко Т. М. 205
Ткачук В. А. 92
Ткачук З. Ю. 38, 45, 75
Тодор І. М. 113, 224
Токарчук К. О. 146
Торбас О. О. 22
Третяк Д. В. 198
Трикаш І. 83
Трошин П. А. 57
Трутаєва І. А. 129
Труш В. В. 57, 83
Тугай А. В. 212, 213
Тугай Т. І. 212, 213
Тукало М. А. 16, 29
Туровська О. С. 167
Туряниця І. М. 200
Урвант Л. П. 67
Устьянская О. В. 214
Ференц І. В. 215
Филиппова Т. О. 177
Філоненко В. В. 13
Фоменко І. С. 117
Французова С. Б. 140
Хархота М. А. 34
Харченко В. С. 216
Харченко Р. С. 149
Харченко С. Г. 83
Харькова А. П. 107, 119, 137
Хлус К. М. 217
Хоменко І. М. 166
Хомочкін А. П. 84
Храновська Н. М. 80, 136
Цап П. Ю. 67
Царенко Т. М. 218
Циба Л. О. 32
Цибулін О. С. 220
Цивінська М. В. 85
Цимбалюк О. В. 43, 86
Чака О. Г. 221
Черепанов В. В. 183
Черкашина Д. В. 198, 223
Чернишенко В. О. 48, 59, 61, 186
Чернишенко Т. М. 59, 61
Чехун В. Ф. 113, 224
Чиста С. В. 87
Чопей М. І. 36
Чорний С. А. 225
Чорноморченко С. С. 232
Чумак В. В. 40
Чумаченко І. М. 146
Шабельник М. Ю. 160
Шаблій В. А. 61

-
- Шамелашвілі К. Л. 226
Шандренко С. Г. 146
Шандура М. П. 69
Шапкина О. А. 183
Шаталін Д. Б. 206
Швец В. Н. 170
Швець Ю. В. 113, 224
Шеремет А. А. 185
Шихалеева Г. Н. 227
Шкода А. С. 172
Шкрабак О. А. 96, 174
Шлапацька Л. М. 160, 228
Шликов С. Г. 120
Шмараков І. О. 120
Шпакова Н. М. 183
Штапенко О. В. 229
Штеменко Н. І. 64, 121, 133, 143, 150
Штеменко О. В. 121, 150, 195
Щенявський І. Й. 23
Юркевич І. С. 202, 208
Юсова О. І. 21, 88
Якименко І. Л. 220
Яковенко Л. Ф. 22, 225
Яковенко М. Г. 231
Яковенко О. М. 232
Яковенко Т. Г. 75
Якубовський В. П. 69
Янко Р. В. 221
Янчук П. І. 125, 171
Яремчук А. Д. 16
Ярмолюк С. М. 82
Яценко Т. А. 89
Ageshkov P. O. 15
Avdieiev S. S. 15
Barannik T. V. 15, 78
Barska M. 222
Baumeister W. 4
Bayliak M. 126
Beldiman C. 19
Blume Ya. B. 4, 65
Bobak Ya. 115
Bondarenko V. 52
Boretsky Y. 115
Borisova T. 134
Borysov A. 134
Burdyniuk M. I. 49
Chen O. 222
Cherenok S. O. 55
Csucs G. 111
Deligeorgiev T. 46, 53
Demchenko A. P. 111
Derevyanchuk M. V. 148
Dmitrenko V. 26
Dragan A. I. 25
Dragushchenko O. 52
Drobotko T. 190
Drobot L. 6
Dzhus O. I. 187
El'skaya A. 19, 35
Falfushynska H. 98, 116
Fedorovych D. 115
Fedoruk O. 98, 116
Fedyna V. D. 65
Filipek A. 35
Filipova T. O. 134
Filonenko V. 37
Frolova A. 118
Galkin M. B. 134
Garmanchuk L. V. 187
Gnatyshyna L. 98, 116
Goral A. 35
Gorbenko G. P. 46, 53
Gospodaryov D. V. 142
Gout I. 37
Gralievska N. 19
Groisman I. 19
Gryaznova T. A. 49
Grysiuk A. 98
Gubar O. S. 49
Harel-Bellan A. 19
Himmelreich N. 209
Horiunova I. I. 49
Hovorun D. M. 27
Hryshuk H. 126
Iershov A. 26
Ivanina A. 98
Jarzab B. 104
Jurewicz E. 35
Kalchenko O. I. 55
Kalchenko V. I. 55
Kalinin I. V. 220
Kamyshny A. M. 211
Kavalets B. 222
Kharchenko S. G. 55
Khripach V. A. 148
Kinnunen P. K. J. 46, 53
Kirieieva S. S. 230
Kolomiets I. N. 27
Kopanytsya L. 98
Kornelyuk A. I. 66, 77
Kornieieva K. 58, 112
Kovalenko I. F. 178
Kovalenko O. P. 74
Kovzun O. 114

-
- Kravchenko O. 210
Kravets V. S. 103, 148
Krisanova N. 134
Kropyvko S. V. 49
Kroupskaya I. V. 77
Krupko O. 209
Kuklin A. 104, 194
Laricheva E. N. 219
Likhovid A. 26
Litvinovskaya R. P. 148
Lozhko D. M. 66
Lushchak O. V. 142
Lushchak V. I. 105, 126, 142
Lutsenko D. G. 178
Lyniv L. 222
Lytvyn D. I. 65
Makogon N. 104
Marchenko L. N. 178
Marchenko V. S. 178
Marchyk V. 116
Markelova E. Yu. 77
Mekler A. 26
Mely Y. 55
Mikosha A. 114
Mukhlis Abedalabas 134
Negrutskii B. 19, 35
Nikolaienko T. V. 187
Nikulina V. V. 187
Novosylna O. 35
Obolenskaya M. Yu. 52, 58, 104, 112, 194
Olkhovych O. P. 207
Ostrovska L. 108
Patalakh I. 190
Persheko N. Yu. 230
Petruk N. A. 187
Poliezhaieva T. A. 194
Porto E. 19
Potyahaylo A. L. 27
Prokopiv T. 115
Protsyk V. 230
Pydiura N. 35
Pynylo N. 116
Pyrshchak K. A. 111
Ralchenko S. 58
Revka O. 190
Rodik R. V. 55
Rodriguez R. 58, 112
Rovenko B. M. 142
Royuk M. V. 77
Rusetskaya N. 131
Ryabov S. 134
Rybak M. Yu. 74
Rynditch A. V. 49
Sapozhnikova V. O. 78
Sarayeva I. V. 187
Sauchuk A. 148
Savytskyi O. V. 77
Shalak V. F. 39
Sibirny A. 115
Sidorenko M. V. 230
Sidorik L. L. 77
Sivko R. 134
Skorokhod O. 37
Sokolova I. 98
Stasyk O. 222
Stepanov S. S. 207
Stetsyuk P. 26
Stoika R. 12
Stoliar O. 98, 116
Storandt R. 207
Stravska M. 116
Sybirna N. 222
Tarasenko A. 209
Tokovenko B. 52, 104
Topol I. A. 211
Tronko M. 114
Trosiuk T. V. 39
Trusova V. M. 46, 53
Tsudzevich B. A. 220
Tsvyakh O. A. 219
Tsyba L. O. 49
Tukalo M. A. 74
Tulkki J. 53
Tymoshenko M. 210
Vadzyuk O. B. 95
Vakylenko A. 58
Vasilev A. 46, 53
Vatlitsov D. 131
Vislovukh A. 19
Voronova O. 134
Vovk O. 222
Vus K. O. 46
Waldeck P. 207
Wilczynski B. 118
Yemets A. I. 49, 65
Yurchak I. 98
Yurchenko N. P. 230
Yurkevych I. S. 142
Zarudnaya M. I. 27
Zhukov I. Yu. 66
Zhytniakivska O. A. 53
Zolotareva E. 207