

# ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ КОНФЕРЕНЦІЇ МОЛОДИХ УЧЕНИХ «АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ БІОХІМІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ – 2014»

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, 29–30 травня, 2014 р., Київ

*За результатами таємного голосування журі визначило переможців конференції:*

I місце

**Мазур Юлія Юріївна** за роботу: Селективний інгібітор  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани – калікс[4]арен С-90 – підвищує концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  в міоцитах матки та пригнічує релаксацію м'язового скорочення (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ).

II місце

**Поворознюк Ольга Олександрівна** за роботу: Надекспресія адаптерного протеїну Ruk<sub>1</sub>/CIN85 у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 супроводжується посиленням прояву властивостей ракових стовбурових клітин (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ).

**Євтушенко Марія Євгеніївна** за роботу: Зміни концентрації іонізованого кальцію в клітинах міометрія щурів за дії антагоністів кальмодуліну (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ).

III місце

**Чудіна Тетяна Олександрівна** за роботу: Ад'ювантні властивості наночастинок різного розміру та хімічної будови з іммобілізованим рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсину за імунізації *per os* (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ).

**Хоменко Анна Вікторівна** за роботу: Biochemical aspects of the development of glucocorticoid - induced osteoporosis (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ).

*За активну участь нагороджено грамотами:*

**Борщовецьку Надію Леонідівну** за роботу: The features of cysteine catabolism in rat hepatocytes under condition of protein deprivation and acute toxic hepatitis (Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича).

**Шканд Тетяну Віталіївну** за роботу: Динамика біодеградації альгінатних імплантатів в миокарде крыс (Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків).

УДК 543.424+577.27

## ФОРМУВАННЯ БІОСЕЛЕКТИВНОГО ЕЛЕМЕНТА ІМУНОСЕНСОРА ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ З ВИКОРИСТАННЯМ РЕКОМБІНАНТНОГО ПОВЕРХНЕВОГО ПРОТЕЇНУ А *Staphylococcus aureus*

*А. О. БАХМАЧУК<sup>1</sup>, М. О. УСЕНКО<sup>1</sup>, О. Б. ГОРБАТЮК<sup>2</sup>, О. Е. РАЧКОВ<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*КНУ імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»;  
e-mail: a.bakhtachuk@gmail.com;*

<sup>2</sup>*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ*

Нагальною проблемою сучасного світу є розробка підходів та засобів аналітичної біотехнології, оскільки її успішне вирішення дасть змогу істотно покращити якість життя за рахунок удосконалення методів діагностики хвороб, контролю стану довкілля, якості харчових продуктів тощо. Використання різноманітних імунокомпонентів є дуже привабливим в цьому напрямі досліджень. Однак у разі іммобілізації антитіл на поверхні біосенсорних перетворювачів їх антигензв'язувальна активність зазвичай значно знижується порівняно з активністю тих самих антитіл у вільному стані. Головними причинами цього вважають стеричні обмеження та випадкову орієнтацію антитіл на сенсорній поверхні. Щоб запобігти цьому, можна було б створити проміжний шар, який включав би в себе імуноглобулінзв'язувальні протеїни, наприклад, поверхневий протеїн А *Staphylococcus aureus*. Таким чином, метою роботи було дослідити можливість використання рекомбінантного протеїну А для іммобілізації компонентів біоселективного елемента імуносенсора.

Рекомбінантний поверхневий протеїн А *S. aureus* із додатково введеним на С-кінці залишком цистеїну (SPA-Cys) було одержано синтезом в *E. coli* та очищено методом металоафінної хроматографії. Біологічну активність імунокомпонентів, які було використано в дослідженні, перевіряли імуноензимним

аналізом. Міжмолекулярні взаємодії між імунокомпонентами вивчали за допомогою протокової вимірювальної комірки спектрометра поверхневого плазмонного резонансу «Плазмон-4м».

Таким чином, було сконструйовано генно-інженерний рекомбінантний протеїн SPA-Cys, який містить п'ять імуноглобулінзв'язувальних доменів протеїну А *S. aureus* (E, D, A, B, C), послідовність олігогістидину (6His-tag) для його хроматографічної очистки та С-кіцевий залишок цистеїну. Рекомбінантний SPA-Cys одержано біосинтезом в *E. coli* в розчинній формі. Він зберігав свої імуноглобулінзв'язувальні властивості. Введення розчину SPA-Cys у вимірювальну комірку спектрометра «Плазмон-4м» з попередньо очищеною сенсорною поверхнею викликало відгук, що відповідає іммобілізації протеїну рівню поверхневої густини іммобілізації 0,7 нг/мм<sup>2</sup>. Подальше блокування місць неспецифічної сорбції на сенсорній поверхні за допомогою протеїнів молока дозволило сформувати біоселективний елемент біосенсора, який перевіряли введенням у вимірювальну комірку різних протеїнів. Сформований біоселективний елемент імуносенсора поверхневого плазмонного резонансу виявляє досить високу специфічність, чутливість детектування, стабільність та відтворюваність результатів.

## ПРОТЕЇНкіНАЗА С-ЗАЛЕЖНА РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ГЛУТАМАТНИХ ТРАНСПОРТЕРІВ В УМОВАХ ЗНИЖЕННЯ ВМІСТУ ХОЛЕСТЕРОЛУ В НЕРВОВИХ ТЕРМІНАЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ

*О. О. ВОРОНОВА, Н. В. КРИСАНОВА, Т. О. БОРИСОВА*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: olgavoronova-93@yandex.ru*

Глутамат є основним збуджуючим медіатором у центральній нервовій системі ссавців. Надлишкові його концентрації є токсичними, оскільки надмірна активація глутаматних рецепторів може призвести до загибелі нейронів. Поглинання глутамату нервовими клітинами забезпечується роботою високоафінних натрійзалежних глутаматних транспортерів, які локалізовані у плазматичній мембрані нервових клітин. Нещодавно було показано, що протеїнкіназа С є одним із потужних регуляторів транспортерзалежного накопичення глутамату нервовими терміналями головного мозку. Холестерол є важливим ліпідним компонентом біомембран, який значною мірою визначає їхні фізико-хімічні властивості. Він істотно впливає на функціонування мембранних протеїнів, входить до складу мембранних ліпідних мікродоменів. Зміни концентрації мембранного холестеролу призводять до модуляції активності транспортерів та рецепторів нейромедіаторів.

Метою роботи було дослідити протеїнкіназу С-залежну регуляцію накопичення глутамату нервовими терміналями в нормі та в умовах зниження вмісту холестеролу. У роботі використовували ізольовані нервові терміналі головного мозку щурів (синаптосоми). Видалення холестеролу здійснювали акцептором метил- $\beta$ -циклодекстрином (МЦД). Показано, що інгібітор протеїнкінази С GF109 203X

(200 нМ) знижує початкову швидкість накопичення L-[ $^{14}$ C]глутамату синаптосомами з нормальним вмістом холестеролу на  $\sim 15\%$ , що становить  $2,5 \pm 0,2$  нмоль $\cdot$ хв $^{-1}$  $\cdot$ мг $^{-1}$  протеїну в контролі та  $2,17 \pm 0,1$  нмоль $\cdot$ хв $^{-1}$  $\cdot$ мг $^{-1}$  протеїну в умовах присутності інгібітору ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 8$ ,  $t$ -тест Стьюдента). В умовах зниження вмісту холестеролу (на 25%) із використанням 15 мМ МЦД (обробка синапсом впродовж 30 хв при 37 °С) в присутності GF109 203X (200 нМ) початкова швидкість накопичення L-[ $^{14}$ C]глутамату знижується з  $1,5 \pm 0,05$  нмоль $\cdot$ хв $^{-1}$  $\cdot$ мг $^{-1}$  протеїну до  $1,4 \pm 0,01$  нмоль $\cdot$ хв $^{-1}$  $\cdot$ мг $^{-1}$  протеїну. Акумуляція глутамату за 10 хв не змінюється за дії GF109 203X як у контрольних синаптосомах, так і в холестеролзбіднених. Початкова швидкість накопичення L-[ $^{14}$ C]глутамату синаптосомами зі зниженим вмістом холестеролу в присутності GF109 203X у середовищі інкубації в концентрації 200 нМ становить  $93,2 \pm 1,8\%$  від початкової швидкості без інгібітору, а в нормі цей показник дорівнює  $86,9 \pm 2,0\%$  ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ,  $t$ -тест Стьюдента порівняно з контролем, прийнятим за 100%). За використання «нейтрального» комплексу МЦД-холестерол (1 : 0,15) не зареєстровано істотних змін накопичення L-[ $^{14}$ C]глутамату порівняно з контролем. Можна дійти висновку, що дефіцит холестеролу в нервових терміналях призводить до порушення протеїнкіназу С-залежного механізму регуляції активності глутаматних транспортерів.

УДК 577.218+616-006

**НАДЕКСПРЕСІЯ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk/CIN85  
СУПРОВОДЖУЄТЬСЯ АКТИВАЦІЄЮ СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ,  
ЗАЛЕЖНИХ ВІД PI-3-КИНАЗИ ТА ТРАНСКРИПЦІЙНОГО  
ФАКТОРА NF-kB, У КЛІТИНАХ АДЕНОКАРЦИНОМИ  
МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ЛІНІЇ MCF-7**

*І. Р. ГОРАК<sup>1,2</sup>, Г. В. ПАСІЧНИК<sup>1</sup>, О. О. ПОВОРОЗНЮК<sup>1,3</sup>,  
А. А. САМОЙЛЕНКО<sup>1</sup>, Л. Б. ДРОБОТ<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

<sup>2</sup>Національний університет «Києво-Могилянська академія», Україна;

<sup>3</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

*e-mail: iryna.horak@gmail.com*

**М**олекулярною основою розвитку онкологічних захворювань є порушення функціонування окремих сигнальних шляхів, зокрема PI3K/Akt/mTOR та NF-kB, що супроводжується виникненням резистентності до хімотерапевтичних та гормональних препаратів, порушенням регуляції процесів апоптозу та диференціювання клітин, посиленням їхніх інвазивних властивостей. Раніше було показано, що клітини MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 характеризуються більшою стійкістю до аноїкісу, зростанням трансформувального потенціалу та резистентністю до лікарських засобів порівняно з клітинами дикого типу. Метою роботи було дослідити особливості функціонування залежних від PI3K та транскрипційного фактора NF-kB сигнальних шляхів у клітинах лінії MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85.

Особливості активації кіназ mTOR, ERK1/2, Akt, Src, IKK, інгібітору Ikb та субодиниці p65 транскрипційного фактора NF-kB у відповідь на короткотривалі стимуляції клітин MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 епідермальним фактором росту (EGF) досліджували Вестерн-блот аналізом. Активність NF-kB додатково

аналізували з використанням репортерної системи з геном люциферази.

Виявлено, що клітини MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються конститутивною активацією сигнальних шляхів PI3K/Akt/mTOR та NF-kB, але не ERK1/2. Використання PP2, інгібітору нерцепторної кінази Src, продемонструвало Src-залежне фосфорилювання кінази Akt. Стимуляція клітин EGF зумовлює зростання рівня фосфорилювання кіназ ERK1/2, Akt, mTOR, Src, IKK, інгібітору Ikb та субодиниці p65 транскрипційного фактора NFkB у клітинах із надекспресією Ruk/CIN85 порівняно з клітинами дикого типу. Відповідь таких клітин на стимуляцію досліджуваним фактором росту розвивається раніше та триває довше порівняно з контролем. Показано, що активність NF-kB, досліджена методом репортерної системи з геном люциферази, в клітинах дикого типу є вірогідно нижчою, ніж у сублінії з надекспресією Ruk/CIN85.

Одержані дані свідчать про те, що Ruk/CIN85 залучений до регулювання сигнальних шляхів PI3K/Akt/mTOR та NF-kB у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7.

## PARP-1 INHIBITORS ALLEVIATE REACTIVE GLIOSIS IN RETINA OF DIABETIC RATS

*M. GUZYK, A. TYKHOMYROV, G. DONCHENKO, T. KUCHMEROVSKA*

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

**D**iabetic retinopathy (DR) is a multifactorial disease, and persistent hyperglycemia is known to be major contributor to its development. Reactive gliosis is a general response to injury and inflammation in retina and can be observed in numerous forms of retinal degeneration. It is characterized by up-regulation of various molecules, the best known of which is glial fibrillary acidic protein (GFAP). The exact molecular mechanisms contributing to development of diabetes-induced retinas neuropathy are not completely understood. The study was aimed at assessing effects of Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors, 3-aminobenzamide (3-AB) and nicotinamide (NA<sub>m</sub>), at the extent of Poly(ADP-ribose)ylation and reactive gliosis in retina under diabetes.

All studies were performed after 10 weeks of diabetes (streptozotocin, 70 mg/kg of b.w., i. p.) in male Wistar rats treated for 2 weeks with or without 3-AB (30 mg/kg/day, i. p.) and NA<sub>m</sub> (100 mg/kg/day, i. p.). Protein expression was measured by Western blot and immunohistochemistry.

The levels of GFAP were significantly increased in retinas at diabetes as a result of glial reactivity. In addition, expression of immunoreactive products of GFAP degradation (M<sub>m</sub> 47-37 kDa), another representative indicator of reactive gliosis, was observed. Marked reduction of GFAP levels was seen in retinas of diabetic rats treated with 3-AB or NA<sub>m</sub>, though content of retinal GFAP did not reach the control level. On the other hand, 3-AB and NA<sub>m</sub>

administration completely prevented an increase in GFAP degradation. Increased GFAP immunoreactivity was observed in retina sections of diabetic rats as compared with control and supplementation of diabetic rats with PARP inhibitors counteracted glial activation in retinas. The latter is in parallel with data obtained by Western blot. The intensity of glial response appeared to be correlated directly with PARP-1 activation. Significant up-regulation of PARP-1 expression by about 1.5 in diabetic retinas compared to nondiabetic group was found. At the same time, PARP-1 fragmentation was exacerbated more than 2-fold in diabetic rats as compared to control. PARP-1 inhibitors administration to diabetic rats normalized PARP-1 expression in retinas. However, the effect of NA<sub>m</sub> was more profound than 3-AB not only on protein expression but also on protection of PARP-1 against its fragmentation due to antioxidant property and improving of pro-insulin biosynthesis through the increase of NAD. Poly(ADP-ribosyl)ated proteins (pADPs) were detected primarily in the range from 72 to 130 kDa, with several minor bands at 17 to 55 kDa. Both 72 to 130 kDa and 26 to 37 kDa pADPs expression was increased in diabetic rats as compared to control and was essentially prevented by 3-AB and NA<sub>m</sub>.

Thus, PARP-1 inhibitors can be potential drugs for treatment of DR through suppression of PARP-1 fragmentation, modulation of cytoskeletal protein expression and attenuation of glial reactivity.

УДК 616-006.213.3

## ЦИТОХРОМОКСИДАЗНА ТА СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РОСТУ ТА МЕТАСТАЗУВАННЯ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КАРЦИНОМИ ЛЕГЕНІ ЛЬЮЇС

*О. І. ДЖУС, А. В. БІЛЮК, Т. В. НІКОЛАЄНКО, В. В. НІКУЛІНА,  
Л. В. ГАРМАНЧУК, Л. І. СТЕПАНОВА*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»;  
e-mail: olena.dzhus@gmail.com*

**П**роліферація пухлинних клітин пов'язана з кисневим дефіцитом та локальною гіпоксією, що призводить до активації ензимів гліколізу, стимуляції експресії антиапоптичних протеїнів та проангіогенних факторів. За таких умов відбувається порушення функції мітохондріальних ензимів, сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази. Метою роботи було визначення активності цих ензимів в пухлинних клітинах на різних етапах росту та метастазування перещеплюваної карциноми легень Льюїс.

Використовували зразки пухлин на 14-, 19- та 24-у добу після перещеплення карциноми легень Льюїс у мишей лінії C57Black. Мітохондрії та внутрішні мембрани мітохондрій одержували згідно зі стандартними методиками після гомогенізації пухлин і фракціонування клітинних органел за різних коефіцієнтів седиментації. Сукцинатдегідрогеназну та ци-

тохромоксидазну активність визначали за стандартними методами.

Дослідження показало, що на різних етапах розвитку пухлини змінюється активність як цитохромоксидази, так і сукцинатдегідрогенази. На 14-у добу активність цитохромоксидази становить  $2,4 \pm 0,15$  мкмоль окисленого цитохрому с/хв·мг, тоді як на 19-у добу зменшується в 1,4 раза, а на 25-у добу майже в 7 разів порівняно з 14-ю добою відповідно. Сукцинатдегідрогеназна активність також зменшується на 19- та 25-у добу порівняно з 14-ю, однак не так істотно:  $36,6 \pm 3,4$ ;  $25,0 \pm 1,6$ ;  $21,7 \pm 2,3$   $K_3[Fe(CN)_6]$ /хв·мг, на 14-, 19- та 25-у добу відповідно.

Одержані дані стосовно стану активності ензимів, які є компонентами дихальних комплексів внутрішньої мітохондріальної мембрани, вказують на зниження сукцинатдегідрогеназної та цитохромоксидазної активності залежно від етапів пухлинного росту.

## ЕФЕКТ ЛЕВЕТИРАЦЕТАМУ НА ВИВІЛЬНЕННЯ ГАМК СИНАПСОСОМАМИ КОРИ, ГІПОКАМПА І ТАЛАМУСА ЩУРІВ, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ПЕРИНАТАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ

*М. В. ДУДАРЕНКО, Н. Г. ПОЗДНЯКОВА, Л. М. ЯЦЕНКО,  
Н. Г. ГИММЕЛЬРЕЙХ, Т. О. БОРИСОВА*

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

Одиничний гіпоксичний вплив у ранньому віці зумовлює стійкі зміни в роботі ГАМК-ергічної системи, наслідком чого, зокрема, є виникнення епілепсії. Леветир-ацетам – новий антиепілептичний препарат, мішенню якого є протеїн синаптичних везикул SV2A. Зв'язування з ним леветир-ацетаму сприяє реалізації комплексного модулюючого ефекту щодо нейромедіаторних систем, залучених у патогенез епілептичних нападів. Метою нашої роботи було дослідити вплив леветир-ацетаму на вивільнення  $[^3\text{H}]$ ГАМК із нервових терміналей кори, гіпокампа і таламуса протягом постнатального розвитку щурів, які зазнали перинатальної гіпоксії.

В досліді використано модель перинатальної гіпоксії у 10–12-денних щурят-самців.

У роботі було застосовано методи: препаративна біохімія, виділення синапсом головного мозку щурів за методом Котмана, вивчення вивільнення нейромедіатора за допомогою радіоізотопного методу із використанням міченої  $[^3\text{H}]$ ГАМК.

Експерименти проводили на синапсом корі, гіпокампа і таламуса щурів через 1, 2, 4 та 8 тижнів після гіпоксичного стресу та контрольних тварин такого самого віку.

Показано, що леветир-ацетам (100 мкМ) збільшує інтенсивність вивільнення ГАМК шляхом екзоцитозу синапсомами всіх

досліджуваних структур як контрольних, так і щурів, що зазнали гіпоксії. Так, у гіпокампі гіпоксичних щурів, КСІ-стимульоване вивільнення  $[^3\text{H}]$ ГАМК зростає на  $42 \pm 5,3\%$  (1-й тиждень) та на  $57 \pm 5,8\%$  (8-й тиждень), а в контрольних тварин – на  $27,2 \pm 3,6\%$  та  $33,7 \pm 4\%$  відповідно. Отже, протягом постнатального розвитку ефективність дії леветир-ацетаму в гіпокампі посилюється у тварин, які зазнали гіпоксичного впливу, а в контрольних істотно не змінюється. Леветир-ацетам також зумовлює підвищення вивільнення  $[^3\text{H}]$ ГАМК із синапсом корі і таламуса. Але, на відміну від гіпокампа, в корі та таламусі обох груп досліджуваних тварин протягом постнатального розвитку виявлено зниження ефективності дії леветир-ацетаму на вивільнення  $[^3\text{H}]$ ГАМК. Так, у контрольних тварин підвищення КСІ-стимульованого вивільнення  $[^3\text{H}]$ ГАМК із синапсом корі на першому тижні становить  $33,68 \pm 5,1\%$ , на восьмому –  $30,7 \pm 2,36\%$ , а в щурів, що зазнали гіпоксичного впливу –  $50,15 \pm 1,66\%$  і  $41,00 \pm 4,15\%$  відповідно.

Таким чином, леветир-ацетам активує процес вивільнення ГАМК шляхом екзоцитозу з нервових терміналей корі, гіпокампа і таламуса головного мозку щурів. Ефективність дії леветир-ацетаму значно вище в тварин, які зазнали впливу перинатальної гіпоксії.

УДК 543.555 + 543.635.22 + 543.635.24 + 577.152.1

## ВИКОРИСТАННЯ СИЛІКАЛІТУ ДЛЯ ПОКРАЩЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОНДУКТОМЕТРИЧНОЇ БІОСЕНСОРНОЇ СИСТЕМИ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ ТА САХАРОЗИ

*О. Є. ДУДЧЕНКО<sup>1,2</sup>, В. М. ПЕШКОВА<sup>2</sup>, О. О. СОЛДАТКІН<sup>1</sup>, Г. М. БАБУРОВА<sup>1</sup>,  
С. О. АНДРЕС<sup>3</sup>, С. В. ДЗЯДЕВИЧ<sup>1,2</sup>*

*<sup>1</sup>Інститут високих технологій Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка, Україна;*

*<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;*

*<sup>3</sup>Національний університет «Києво-Могилянська академія», Україна;  
e-mail: dc182@yandex.ru*

Глюкоза та сахароза є поширеними в природі речовинами, входять до раціону більшості населення Землі у складі продуктів харчування, використовуються в галузі виробництва ліків, а також у біотехнологічних процесах. Проте разом з цим існує низка обмежень до вживання цих речовин для пацієнтів із цукровим діабетом та деякими іншими порушеннями обміну речовин, яким також необхідно контролювати рівень глюкози в крові. Тому, на сьогодні, потреба в точних, експресних, недорогих та технологічно нескладних методах визначення вуглеводів існує як у промисловості, так і в медицині. Біосенсорні технології пропонують точні методи кількісного і напівкількісного визначення речовин, але дозволяють спростити та здешевити цю процедуру порівняно із сучасними високоточними аналітичними методами.

До складу кондуктометричного біосенсора, використаного в цій роботі, входив планарний фізичний перетворювач, який об'єднував дві пари зустрічно-гребінчастих електродів, одержаних методом вакуумного напилення золота на керамічну підкладку, а також дві мембрани: біологічно розпізнавальна (ензимна) та порівняльна. Ензиматична мембрана сахарозного біосенсора містить суміш інвертази, мутаротази та глюкозооксидази, а глюкозного біосенсора – лише глюкозооксидазу. Мембра-

на порівняння містить еквівалентну ензимам кількість бичачого сироваткового альбуміну. На частину датчиків попередньо наносять суспензію силікаліту та витримують при 180–200 °С. Кожна з мембран іммобілізується на активній поверхні відповідної пари електродів методом поперечного зшивання глутаровим альдегідом, а кондуктометричні вимірювання проводили в диференційному режимі при 10 мВ вхідної напруги та частоті 40 кГц.

Оптимальним буферним розчином для роботи біосенсорів обрано 5 мМ фосфатний буферний розчин ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$ ), рН 6,5. Лінійний діапазон визначення сахарози біосенсора, модифікованого силікалітом, становить від 0,01 до 4,5 мМ сахарози та від 0,005 до 1,75 мМ глюкози. Лінійний діапазон визначення глюкози біосенсора, модифікованого силікалітом, становить від 0,005 до 2 мМ.

Модифіковані силікалітом ензимні кондуктометричні біосенсори для визначення сахарози та глюкози характеризуються високою чутливістю, селективністю, відтворюваністю сигналу та дещо ширшим лінійним діапазоном визначення сахарози і глюкози порівняно з такими без використання силікаліту. Такі біосенсори в подальшому можуть бути застосовані в промисловій практиці з метою контролю рівня сахарози та глюкози.



## КОНЦЕНТРАЦІЯ ІОНІЗОВАНОГО КАЛЬЦІЮ В КЛІТИНАХ МІОМЕТРІЯ ЩУРІВ ЗА ДІЇ АНТАГОНІСТІВ КАЛЬМОДУЛІНУ

*М. Є. ЄВТУШЕНКО, С. Г. ШЛИКОВ*

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

**М**ітохондрії беруть участь у забезпеченні енергетичних потреб клітини, внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу, генерації та передачі електричних та кальцієвих сигналів, а також в індукції сигналу запрограмованої загибелі клітини. Величина мембранного потенціалу мітохондрій є суттєвим фактором регуляції акумуляції іонів Са в субклітинних структурах, що також позначається на концентрації цього катіона в клітині.

Попередні досліді з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM показали, що антагоністи кальмодуліну спричинюють деполяризацію мітохондріальної мембрани. У цій роботі ми визначали зміну концентрації іонізованого кальцію в матриці мітохондрій та в цитоплазмі клітин міометрія щурів за дії антагоністів кальмодуліну – кальмідазоліуму та трифлуоперазину. У роботі було використано дві експериментальні моделі: ізольовані мітохондрії та первинна культура клітин гладеньких м'язів матки щурів. Ефекти трифлуоперазину досліджували на фракції мітохондрій з використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонда Fluo-4 AM та методу флуоресцентної спектроскопії. Із використанням методу конфокальної лазерскануючої мікроскопії та  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонда Fluo-4 AM була визначена дія кальмідазоліуму на рівень  $\text{Ca}^{2+}$  в гладеньком'язових клітинах міометрія щурів.

На фракції мітохондрій показано, що вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у матриці мітохондрій становить 190 нМ. Введення 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  у середовище інкубації, що містить АТФ та  $\text{Mg}^{2+}$ , супроводжується зростанням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (300 нМ) в мітохондріях. За подальшого внесення 100 мкМ трифлуоперазину спостерігається значне підвищення інтенсивності флуоресценції  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонда Fluo-4 AM у мітохондріях, що свідчить про збільшення концентрації іонів Са всередині мітохондрій. Попередня інкубація мітохондрій з трифлуоперазином протягом 5 хв призводить до різкого зростання вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  в матриці мітохондрій. Подальше введення 100 мкМ  $\text{Ca}^{2+}$  в середовище інкубації супроводжується ще більшим підвищенням концентрації катіона в матриці. Досліді на первинній культурі клітин міометрія показали, що інкубація клітин з антагоністом кальмодуліну – кальмідазоліумом (10 мкМ), супроводжується збільшенням рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі клітин.

Враховуючи раніше одержані результати, дійшли висновку, що деполяризуючий вплив антагоністів кальмодуліну на мітохондрії міометрія супроводжується збільшенням рівня  $\text{Ca}^{2+}$  як у матриці мітохондрій, так і в цитоплазмі клітин.

Одержані дані свідчать про участь кальмодуліну в контролі потенціалзалежного трансмембранного обміну  $\text{Ca}^{2+}$  в мітохондріях міометрія щурів.

UDC 577.161.2:612.015.6

## NITROSATIVE STRESS EFFECT ON THE CONDITION OF ALIMENTARY OSTEOPOROSIS IN RATS

*O. V. ZAITSEVA, S. G. SHANDRENKO, M. M. VELIKY*

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: Zaitseva\_OV@ukr.net*

**E**ffect of induced nitrosative stress on the pathogenesis of alimentary osteoporosis is not fully established. Therefore the aim of the research was the investigation of nitrosative stress influence on the bone metabolism under alimentary osteoporosis development.

White female Wistar rats were used in the research. The experimental model of alimentary osteoporosis was performed by using the synthetic diet without vitamin D<sub>3</sub> combined with balanced content of calcium (1.2%) and phosphorus (0.7%). Rats were divided into 3 groups. The 1<sup>st</sup> group – control rats were kept on vitamin D<sub>3</sub> balanced diet, the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups were kept on vitamin D<sub>3</sub>-deficiency diet for 45 days, additionally animals of the 3<sup>rd</sup> group were injected intraperitoneally with 0.5 mg of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine for nitrosative stress development on the 30<sup>th</sup> day of the experiment. After decapitation in 45 days the level of NO with DAF-2DA was determined in blood samples by flow cytometry, as well as total calcium, inorganic phosphate and alkaline phosphatase. Also osteometric and X-ray analyses were performed.

Results: in rats with alimentary osteoporosis the level of NO in leukocytes was elevated by 17% as compared to control. The level of alkaline phosphatase was also increased more than 2-fold

(291 ± 50 U/l) vs. control (134 ± 22 U/l). Total calcium and inorganic phosphate level was decreased by 23% (2.3 ± 0.2 mmol/l, control 3.0 ± 0.3 mmol/l) and by 79% (0.4 ± 0.1 mmol/l, control 1.9 ± 0.2 mmol/l), respectively.

In animals of the 3<sup>rd</sup> group with nitrosative stress the level of NO in leukocytes was increased by 17% vs. the 2<sup>nd</sup> group. Normalization of the main mineral parameters was also observed. Thus, the level of total calcium and inorganic phosphate was increased by 22 and 25%, relatively, alkaline phosphatase level was decreased by 41% compared to the 2<sup>nd</sup> group – osteoporosis.

Results of osteometric investigation indicated to significant development of osteoporosis. The femur decreased in weight and shortened in length by 47 and 32%, the vertical femoral head diameter decreased by 14% compared to the control. The X-ray studies showed some significant changes in the structure of experimental animal's skeleton.

The obtained data indicate that vitamin D<sub>3</sub> deficiency diet caused osteoporosis development. The induced nitrosative stress has a significant effect on mineral metabolism and on the structure of rat's skeleton with alimentary osteoporosis. High levels of NO inhibit bone resorption and normalize investigated parameters.

## ЕЛЕКТРОГЕННИЙ $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ОБМІН У МІТОХОНДРІЯХ МІОЦИТІВ МАТКИ ТА ЙОГО МОДУЛЯЦІЯ КАЛІКС[4]АРЕНАМИ

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

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

Потенціал на внутрішній мітохондріальній мембрані, який генерується завдяки роботі електрон-транспортного ланцюга, є важливою фундаментальною характеристикою мітохондрій (МХ). Поляризація мембрани МХ контролює роботу локалізованих в них катіон-транспортувальних систем, у тому числі і тих, що забезпечують трансмембранний обмін іонів  $\text{Ca}$ , які відіграють центральну роль у регуляції активності МХ. В основі підтримання оптимальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в МХ є узгоджене функціонування систем енергозалежної акумуляції катіона та його вивільнення з матриксу в цитозоль. Остання система представлена в клітинах гладенького м'яза  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінником. Високоафінні низькомолекулярні ефектори  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінника МХ відсутні. Проте є підстави вважати, що такими сполуками можуть бути супрамолекулярні макроцикли калікс[4]арени.

Нами досліджено вплив калікс[4]аренів С-97 та С-99 на рівень поляризації мітохондріальної мембрани інтактних міоцитів матки шурів із використанням потенціал-чутливого флуоресцентного зонда  $\text{DiOC}_6(3)$ . Із застосуванням лазерної конфокальної мікроскопії та специфічного щодо МХ барвника MitoTrackerOrangeCM-H<sub>2</sub>TMRos (200 нМ) доведено, що  $\text{DiOC}_6(3)$  (100 нМ) взаємодіє із МХ. За допомогою методу протокової цитофлуориметрії та  $\text{DiOC}_6(3)$  показано, що в умовах штучної

деполяризації плазматичної мембрани убаїном (1 мМ) сполуки С-97 та С-99 у концентрації 100 нМ спричинюють транзйентне зростання мембранного потенціалу МХ, яке становить майже 40% від контрольного рівня і триває близько 5 хв. Одержані результати підтверджуються даними лазерної конфокальної мікроскопії, згідно з якими С-99 зумовлює істотне зростання флуоресценції навантажених  $\text{DiOC}_6(3)$  міоцитів, які були преінкубовані з убаїном (1 мМ).

За дослідження впливу С-97 та С-99 (100 нМ) на  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмін в ізольованих МХ міометрії за допомогою  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого флуоресцентного зонда Fluo-4 AM (2 мкМ) та методу спектрофлуориметрії показано, що С-97 та С-99 стимулюють досліджувану транспортувальну систему.

Проведені нами кінетичні розрахунки показали, що  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмін в МХ міометрії може здійснюватись зі стехіометрією 1:1, тобто мати електрогенну природу. Таким чином, його стимуляція дослідженими каліксаренами може лежати в основі зростання мітохондріального потенціалу.

Отже, калікс[4]арени С-97 та С-99 спричинюють транзйентне зростання мембранного потенціалу МХ, що може бути пов'язано зі стимуляцією ними  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обміну МХ.

*Автори висловлюють подяку чл.-кор., д.б.н., професору С. О. Костеріну за наукову дискусію.*

UDC 577.112.386:616.36-002-092.9

## THE FEATURES OF CYSTEINE CATABOLISM IN RAT HEPATOCYTES UNDER CONDITION OF PROTEIN DEPRIVATION AND ACUTE TOXIC HEPATITIS

G. P. KOPYLCHUK, N. L. BORSHCHOVETSKA, I. M. BUCHKOVSKA

*Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Institute of Biology, Chemistry and Biological Resources, Ukraine;  
e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru*

Sulfur-containing amino acids play an important role in maintaining the cellular systems integrity and redox potential, deactivation of free radicals, providing a pool of organic sulphates and methylation processes. Genetic and acquired defects of enzymes, regulating their metabolism, are associated with the disruption of liver metabolic processes and can provoke the development of hepatosteatosis, fibrosis, cirrhosis etc.

In order to study the features of cysteine catabolism under condition of protein deprivation, experimental animals were maintained on a low-protein semisynthetic diet for 28 days. Acute toxic hepatitis was modeled by *per os* paracetamol administration to rats in a dose of 1.25 g/kg (0.5 LD<sub>50</sub>) in the form of a suspension of 2% starch solution for 2 days.

The activity of key enzymes of cysteine metabolism in hepatocytes – cysteine dioxygenase (EC 1.13.11.20, CDO) and gamma-glutamylcysteine synthetase (EC 6.3.2.2, GCS) – was registered by the amount of cysteine and P<sub>i</sub>. Desulfurase way of cysteine catabolism was evaluated in terms of hydrogen sulphide level.

In hepatocytes of animals, maintained either on a low-protein diet or subjected to paracetamol administration, two-fold increase in CDO activity was determined compared to control values.

However, the maximum values of this parameter were observed in protein deficient animals with paracetamol-induced hepatitis. It is known that CDO plays a key role in regulating the intracellular concentration of cysteine and its increase leads to CDO upregulation with a subsequent elevated formation of taurine and sulphates. Moreover the accelerated cysteine utilization may be accompanied with homocysteine accumulation with further development of hyperhomocysteinemia.

The activity level of GCS, catalyzing the ATP-dependent stage of glutathione (GSH) synthesis, was observed to be lower than control values in all experimental groups with a subsequent reduction of GSH level.

At the same time H<sub>2</sub>S hyperproduction occurs in blood serum of all experimental groups, which is known to be a powerful vasodilator under the physiological conditions. However under its excessive formation it can react with protein SH-groups, modifying their activity, form nitrosothiols and be nonenzymatically oxidized with formation of sulfites and sulfates.

Thus, protein deprivation and toxic hepatitis are accompanied with alteration in specific metabolism of sulfur-containing amino acids, including cysteine with the activation of desulfurase catabolism pathway.

## ЗМІНА РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ TP53-ЗАЛЕЖНИХ ГЕНІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ В УМОВАХ ПРИГНІЧЕННЯ ФУНКЦІЇ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1

*І. В. КРИВДЮК, Д. О. МІНЧЕНКО, С. В. ДАНИЛОВСЬКИЙ, О. Г. МІНЧЕНКО*

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

**П**ригнічення ERN1 (від ендоплазматичного ретикулула до ядра 1), основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, призводить до зниження проліферації клітин гліоми і росту пухлин. Стрес ендоплазматичного ретикулула є важливим фактором росту злоякісних пухлин, оскільки сигнальний шлях ERN1 тісно пов'язаний із процесами проліферації, апоптозу та виживання клітин. Гліоми – найагресивніші злоякісні пухлини і ефективних підходів для їх лікування ще немає. Гіпоксія також сприяє посиленому росту гліом, індукуючи адаптивні механізми підвищення життєздатності пухлинних клітин.

Метою роботи було дослідження експресії TP53-залежних генів, зокрема, таких як *TOPORS* (topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase), *TP53BP1* (TP53 binding protein 1), *TP53BP2*, *SESNI* (sestrin 1 or TP53 regulated PA26 nuclear protein), *NME6* (non-metastatic cells 6, відомий ще як NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6), *RYBP* (RING1 and YY1-binding protein або DAD-associated factor) та *ZMAT3* (zinc finger, Matrin-type 3 або TP53 target zinc finger protein) у клітинах гліоми із пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 в умовах гіпоксії.

Дослідження рівня експресії TP53-залежних генів проведено на клітинах гліоми лінії U87, а також сублінії цих клітин із повним пригніченням функції сигнального ензиму ERN1 за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. В експериментах з гіпоксією клітини поміщали в камеру із сумішшю газів: 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> та 92% N<sub>2</sub>.

Встановлено, що повне блокування функції гена *ERN1* у клітинах гліоми лінії U87 збільшує рівень експресії генів *RYBP*, *TP53BP2*

та *SESNI*, але істотно знижує рівень експресії генів *TP53BP1*, *TOPORS*, *NME6* та *ZMAT3*. Ці дані повністю узгоджуються з пригніченням проліферації клітин гліоми в умовах блокування функції сигнального ензиму ERN1, оскільки зниження рівня експресії генів *TP53BP1*, *TOPORS*, *NME6* та *ZMAT3* сприяє посиленню апоптозу через стабілізацію p53 чи активацію його транскрипційної активності. У той самий час, збільшення рівня експресії генів *RYBP*, *TP53BP2* та *SESNI* призводить до стабілізації p53 шляхом інгібування його убіквітинації, а також посилення функції цього пухлинного супресора. Більше того, блокування функції сигнального ензиму ERN1 змінює характер гіпоксичної регуляції експресії цих генів. Так, гіпоксія істотно не впливає на рівень експресії генів *TP53BP1* та *SESNI* у контрольних клітинах гліоми, тоді як в умовах пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 рівень експресії цих генів збільшується. Крім того, величина індукованих гіпоксією змін у рівнях експресії генів *RYBP* та *TP53BP2* є геноспецифічною і виражена більшою мірою в гені *TP53BP2*. Щодо гена *TOPORS* було показано, що рівень його експресії знижується в обох типах клітин гліоми за гіпоксії, причому блокування сигнального ензиму ERN1 посилює ефект гіпоксії.

Таким чином, експресія TP53-залежних генів контролюється ERN1-опосередкованою сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулула як за норми, так і в гіпоксичних умовах, і, можливо, бере участь у пригніченні росту пухлин в умовах виключення функції ERN1. Розуміння залежності пухлинних клітин від гіпоксії та стресу ендоплазматичного ретикулула може сприяти пошуку нових терапевтичних стратегій, заснованих на блокуванні механізмів виживання клітин.

УДК 571.27:004.9

## ПРОГНОЗУВАННЯ Т-ЕПІТОПІВ АНТИГЕНІВ МІКОБАКТЕРІЙ *IN SILICO* ДЛЯ ОЦІНКИ МОЖЛИВОСТЕЙ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ У СКЛАДІ ВАКЦИН І ДІАГНОСТИЧНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

*О. І. КРИНІНА, Т. А. РЕДЧУК*

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

**Т**уберкульоз – інфекційне захворювання, значно поширене в усьому світі. Ефективний контроль захворюваності на туберкульоз вимагає вдосконалення існуючих засобів його діагностики. Перспективним також є створення новітніх вакцин для формування протективного імунітету в популяції на основі антигенів патогенних мікроорганізмів, які виявляють високу імуногенність та здатні зв'язуватись із різними молекулами генного комплексу HLA (англ. Human Leucocyte Antigens). Відбір протеїнових антигенів до складу діагностикумів та вакцин звичайно базується на біохімічних та імунологічних дослідженнях, що потребують великих фінансових затрат та часу. Наразі за допомогою різноманітних інтернет-ресурсів та інструментів для вивчення взаємодій пептид МНС (англ. Major Histocompatibility Complex) *in silico* стало можливим істотно скоротити кількість затраченого часу на пошук потенційно придатних антигенів для вакцин, зменшивши кількість необхідних експериментів *in vivo* та *in vitro*.

Мета роботи – зробити порівняльний аналіз декількох найдослідженіших антигенів *Mycobacterium tuberculosis* (MPT83, MPT63, ESAT-6, CFP10, SodA, leuD, panD, RD1 та HBHA) з метою визначення наявності Т-епітопів, здатних зв'язуватись із декількома найпоширенішими у східноєвропейській популяції алелями гена *HLA*.

Відбір алелей гена *HLA* здійснювався за допомогою інтернет-ресурсу «Allele frequency net database», який містить відомості про частоти генів імунної системи та алелей, що їм відповідають, для різних демографічних популяцій. Прогнозування зв'язування антигенів мікобактерії з молекулами МНС класу II проводили з використанням 4 онлайн-програм (Propred, RANKPEP, NetMHCIIpan та SMM-align).

Для аналізу зв'язування антигенів *M. tuberculosis* з Т лімфоцитами було відібрано 8 алелей гена HLA-DRB1, поширених на території Східної Європи. За допомогою 4 різних програмних засобів для кожного антигену було визначено сумарну кількість Т-епітопів, яка зв'язується з різними молекулами МНС класу II.

Згідно з одержаними *in silico* результатами можна зробити висновок, що найбільш імуногенними є протеїни SodA, MPT83 та leuD, для яких було знайдено найбільшу кількість Т-епітопів серед досліджуваних алелей. Відповідно ці антигени або комбінації їх є перспективними для створення новітніх вакцин та діагностикумів з метою формування протитуберкульозного імунітету серед широкого кола жителів східноєвропейського регіону та з метою визначення стану захищеності популяції.

**EFFECT OF N, N'-SUBSTITUENTS ON SENSITIVITY OF CYANINE DYES AS PROBES FOR AMYLOID FIBRILS DETECTION**

*M. V. KUPERMAN<sup>1</sup>, S. V. CHERNII<sup>1</sup>, V. B. KOVALSKA<sup>1</sup>, M. Yu. LOSYTSKYI<sup>1</sup>,  
D. V. KRYVOROTENKO<sup>1</sup>, Yu. L. SLOMINSKI<sup>2</sup>, S. M. YARMOLUK<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: mvkuperman@gmail.com;*

*<sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**F**luorescent probes identifying protein aggregates are of great interest, because the intracellular aggregate depositions are connected with pathogenesis of many devastating diseases, among them neurodegenerative disorders such as Parkinson and Alzheimer diseases. Despite of the wide use of fluorescence based assays for the study of amyloid formations, the very limited number of dyes (mainly Thioflavin T, Congo Red) are usually proposed for this aim. Earlier, we reported the mono- and trimethine cyanines as sensitive fluorescent probes for amyloid fibrils detection.

Here we present the study of fluorescent sensitivity of a series of benzothiazole trimethine cyanines modified with different N,N'-substituents containing alkyl, hydroxyl, quaternary amine and phenyl groups to amyloid formations of human insulin and chicken egg lysozyme. Spectral-luminescent properties of the eight cyanine dyes were characterized in free state and in the presence of monomeric and fibrillar proteins. For the most sensitive dyes, the linear range of fibrillar insulin detection was estimated.

All studied cyanine dyes demonstrated low intrinsic fluorescence. The fluorescent excitation maxi-

ma for these dyes were in the range of 547-560 nm, the fluorescent emission maxima were situated at 566-573 nm. These dyes were slightly sensitive to the presence of monomeric proteins, but increased their emission by 1.24-13 times in the presence of insulin amyloid fibrils and by 2.1-25.8 times in the presence of fibrillar lysozyme. Besides, the addition of fibrillar proteins results in bathochromic shifts of excitation and emission maxima of the dyes on 2-19 nm. It should be noted that dyes containing hydroxy groups in N-alkyl substituents are noticeably more sensitive to the presence of fibrillar lysozyme, while the dyes modified with quaternary amine groups demonstrate higher fluorescent response in the presence of fibrillar insulin. Meso-methyl substituted benzothiazole trimethine cyanine dyes allow quantification of fibrillar proteins in the wide detection range of 0.8-300 mg/ml for insulin and could be proposed for practical use as highly efficient amyloid-sensitive fluorescent probes.

Since the nature of N,N'-substituent could determine the sensitivity of the dye to the fibrils of certain protein, we suggest the important role of these substituents in the complex formation between the dye molecule and amyloid structures.

UDC 577.161.2+577.171.7

**VITAMIN D<sub>3</sub> PROTECTS AGAINST OXIDATIVE-NITROSATIVE STRESS-INDUCED INSULTS TO HEPATIC CELLS ASSOCIATED WITH PREDNISOLONE ACTION***O. LISAKOVSKA, I. SHYMANSKYI**Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: o.lisakovskaya@gmail.com*

**E**vidence for deleterious side effects on hepatic function induced by long-term use of synthetic glucocorticoids is emerging. The significance of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS)-induced liver cell injury by these hormones has not been fully explored. Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol, D<sub>3</sub>) was previously shown to be involved in the regulation of impaired oxidative metabolism and detoxifying function of liver, which are associated with the effects of hepatotoxicants. The study was therefore aimed at investigating the role of oxidative-nitrosative stress in prednisolone-induced damage of hepatocytes and estimating whether D<sub>3</sub> is able to counter the changes related to glucocorticoid action.

Female Wistar rats received prednisolone (5 mg per kg of b. w.) with or without 100 IU of D<sub>3</sub> (for 30 days). ROS and RNS production in isolated hepatocytes and cell viability were determined by flow cytometry with DCF-DA and propidium iodide respectively. The levels of poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1), poly-ADP-ribosylated and nitrated proteins were measured by Western-blot analysis. The content of 25OHD<sub>3</sub> in serum was measured by ELISA.

Prednisolone administration led to increased oxidative-nitrosative stress as is evident from enhanced ROS and RNS generation as well as accumu-

lation of carbonylated and nitrated proteins in liver tissue vs. control. These alterations are most likely responsible for DNA damage-mediated activation of PARP-1 since a marked 1.77-fold rise in the level of poly-ADP-ribosylated proteins was established. It was shown that prednisolone causes a 1.6-fold increase in the percentage of necrotic cells among isolated hepatocytes vs. control, which is in agreement with PARP-1 overactivation. Moreover, prednisolone administration also resulted in a more than 1.63-fold increase in the level of 89 kDa cleaved fragment of PARP-1, indicative of apoptosis occurring in parallel with necrotic death. Prednisolone-induced changes were accompanied by 70% decrease in serum level of 25OHD<sub>3</sub>, which reflects reliably D<sub>3</sub> deficiency. Restoration of D<sub>3</sub> bioavailability by cholecalciferol treatment counteracted prednisolone effects in the liver indicating that D<sub>3</sub> deficiency can trigger an oxidative-nitrosative stress-mediated cell death.

Prednisolone-induced liver failures are associated with the development of oxidative-nitrosative stress which contributes to the activation of protein poly-ADP-ribosylation and necrotic cell death. The simultaneous occurrence of apoptosis is also not excluded. These data support D<sub>3</sub> efficacy in affecting manifestations of oxidative-nitrosative stress and cell death related to chronic prednisolone action.



**THE INFLUENCE OF 7 DAYS INTRODUCTION OF MELATONIN  
ON THE CONTENT OF HYDROGEN SULFIDE AND ENZYMES  
ACTIVITY OF ITS SYNTHESIS IN THE LIVER OF ALLOXAN  
DIABETIC RATS**

*N. M. LUGINICH, I. V. GERUSH*

*Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine;  
e-mail: nlevytska@ukr.net*

A major risk factor for various pathological conditions, including diabetes mellitus, is a disorder of sulfur-containing amino acids metabolism. Hydrogen sulfide belongs to biologically important metabolites of these amino acids. It is known that the liver is an important organ that provides sulfur-containing amino acids splitting and hydrogen sulfide formation. In diabetes mellitus there is also activation free radical oxidation. Melatonin has established itself as one of the most effective antioxidants, which not only binds toxic radicals, but also increases the activity of antioxidant enzymes. Therefore, the aim of our research was to determine the influence of melatonin on blood glucose level, activity of cystathionin- $\beta$ -synthase (EC 4.2.1.22) and cystathionine- $\gamma$ -lyase (EC 4.4.1.1) activity and hydrogen sulfide content in the liver of rats.

The experiments were carried out on 50 sexually mature male albino rats with the body weight – 0.16-0.18 kg. Alloxan diabetes was evoked via single injecting the rats with 5% alloxan monohydrate solution in the dose of 150 mg/kg. The animals were divided into subgroups: 1) control rats; 2) evident alloxan diabetic rats (basal glycaemia

12.8-17.2 mmol/l); 3) animals with evident diabetes were introduced the melatonin intraperitoneally in the dose of 10 mg/kg at 8 a. m. daily during 7 days.

Alloxan diabetes contributes to changes of the investigated parameters. In the liver of alloxan diabetic rats the cystathionine- $\beta$ -synthase and cystathionine- $\gamma$ -lyase activity increased by 27 and 24%, respectively, and the content of hydrogen sulfide decreased by 22% compared with the control animals. The introduction of melatonin promoted the normalization of basal glycaemia level in diabetic animals compared with the control group of rats. In the liver of alloxan diabetic rats treated with melatonin the cystathionine- $\beta$ -synthase and cystathionine- $\gamma$ -lyase activity decreased by 55%, 13%, respectively, and the concentration of hydrogen sulfide increased by 8% compared with parameters of diabetes mellitus animals. In case of evident diabetes mellitus the introduction of exogenous melatonin normalize the hydrogen sulfide content and enzyme activity of its synthesis in the liver of rats possibly due to the activation of antioxidant enzymes protection, especially glutathione system that depends on sulfur-containing amino acids metabolism.

УДК 577.352.4

## СЕЛЕКТИВНИЙ ІНГІБІТОР $\text{Ca}^{2+}$ -ПОМПИ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ – КАЛІКС[4]АРЕН С-90 – ПІДВИЩУЄ КОНЦЕНТРАЦІЮ $\text{Ca}^{2+}$ В МІОЦИТАХ МАТКИ ТА ПРИГНІЧУЄ РЕЛАКСАЦІЮ М'ЯЗОВОГО СКОРОЧЕННЯ

Ю. Ю. МАЗУР<sup>1</sup>, Т. О. ВЕКЛІЧ<sup>1</sup>, О. А. ШКРАБАК<sup>1</sup>, О. В. ЦИМБАЛЮК<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: yuliya.vorona@gmail.com;

<sup>2</sup>Інститут високих технологій Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка, Україна;  
e-mail: otsymbal@bigmir.net

Із цитоплазми в позаклітинний простір  $\text{Ca}^{2+}$  транспортує  $\text{Mg}^{2+}$ , АТР-залежна  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани (ПМ). Вона контролює локальні  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали у внутрішньоклітинних мембранних мікродоменах. На сьогодні специфічний низькомолекулярний інгібітор  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази відсутній. Раніше нами було продемонстровано, що калікс[4]арен С-90 (5,11,17,23-тетра(трифтор)метил-(фенілсульфоніліміно)метіламіно-25,26,27,28-тетра-пропоксикалікс[4]арен) претендує на роль селективного інгібітору  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази ПМ ( $I_{0,5} = 20,2 \pm 0,5$  мкМ,  $n = 5$ ). Метою цієї роботи було дослідити закономірності дії калікс[4]арену С-90 на скоротливу активність гладеньком'язових клітин (ГМК) матки та на внутрішньоклітинний  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз у них.

Активність  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази вивчали з використанням препарату ПМ міометрія свині методом визначення  $P_i$ , утвореного внаслідок гідролізу АТР. Вплив калікс[4]арену на концентрацію цитоплазматичного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) встановлювали за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа LSM 510 META (зонд Fluor-4 AM). Ефективний гідродинамічний діаметр (ГДД) ГМК визначали із застосуванням лазерно-кореляційного спектрометра (ЛКС) «ZetaSizer-3».

Встановлено, що калікс[4]арен С-90 ( $\leq 50$  мкМ) практично не впливає на спорідненість ( $K_{\text{Ca}^{2+}}$ ) та на коефіцієнт Хілла ( $n_{\text{H}, \text{Ca}^{2+}}$ ) по  $\text{Ca}^{2+}$ . При цьому максимальна швидкість гідролізу АТР  $V_{\text{max}, \text{Ca}^{2+}}$  зменшується на 75% відносно контролю ( $[\text{С-90}] = 100$  мкМ). Досліджено вплив аналогів С-90, які відрізняються кількістю та розташуванням сульфоніламідинових груп на

верхньому вінці калікс[4]аренового макроциклу. За інгібіторним ефектом аналоги можна розташувати в ряд: С-90 (4 амідинові групи) –  $I_{0,5} = 20,2 \pm 0,5$  мкМ, С-716 (2 дистальні амідинові групи) –  $I_{0,5} = 53,4 \pm 3,5$  мкМ, С-772 (2 латеральні амідинові групи)  $I_{0,5} = 168,3 \pm 21,1$  мкМ ( $n = 5$ ). Отже, серед зазначених аналогів калікс[4]арен С-90 найефективніше інгібує активність транспортної АТРази ПМ.

За допомогою конфокальної мікроскопії продемонстровано, що аплікація С-90 (20 мкМ) до ГМК, фіксованих на полі-L-лізині, зумовлює зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , яке з часом знижується до базального рівня. С-90 (50 мкМ) подібно до утеротоніку окситоцину також призводить до зменшення ефективного ГДД ГМК до 74% відносно контролю. С-90 як інгібітор  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ПМ пригнічує релаксацію м'язового скорочення в режимі реєстрації спонтанної активності смужок міометрія: на 20% зменшується максимальна швидкість розслаблення, нормована на амплітуду скоротливої відповіді ( $V_{\text{max}}$ ).

Зменшення  $V_{\text{max}, \text{Ca}^{2+}}$   $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР за дії калікс[4]арену С-90 в поєднанні з відсутністю його впливу на  $K_{\text{Ca}^{2+}}$  свідчить про неконкурентний механізм інгібування ним ензиматичної активності. Інгібуючий ефект С-90 на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТРази пов'язаний з кооперативним впливом чотирьох трифторметилфенілсульфонілімінових груп, які односпрямовано орієнтовані на верхньому вінці калікс[4]аренового макроциклу. Зазначений інгібітор індукує збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  в міоцитах та скорочення ГМК, а також зменшує  $V_{\text{max}}$  релаксації м'язової напруги.

**PROAPOPTOTIC AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF [Pd(syn-A)Cl<sub>2</sub>] INHIBITOR ON CULTIVATED CELLS**

*V. V. NIKULINA<sup>1</sup>, O. O. ZHOLOB<sup>2</sup>, T. V. NIKOLAIENKO<sup>1</sup>, O. I. DZHUS<sup>1</sup>,  
S. I. ORYSYK<sup>2</sup>, L. V. GARMANCHUK<sup>1</sup>, O. V. SKACHKOVA<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC Institute of Biology, Ukraine;  
e-mail: viktorianikulina@ukr.net;*

*<sup>2</sup>V. I. Vernadskii Institute of General and Inorganic Chemistry,  
National Academy of Sciences of Ukraine;*

*<sup>3</sup>National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine*

**H**ypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is a master regulator of hypoxic/ischemic vascular responses, driving transcriptional activation of many genes encoding angiogenic cytokines and growth factors involved in vascular reactivity, angiogenesis, and the mobilization and homing of bone marrow-derived angiogenic cells. HIF-1 activity manipulation is the perspective therapeutic approach which might overcome the current limitations of pro- and antiangiogenic medicine.

Cell line HeLa (human cervix carcinoma) and MAEC (mouse endothelium) were used to determine the cytotoxic/cytostatic effects of [Pd(syn-A)Cl<sub>2</sub>] (where syn-A – (2Z)-2-(2-aminothiazole-4-yl)-2-hydroxyiminoacetic acid). Cells have been incubated with agent 6 for 24 hours under normal conditions in 96 well plates. Initial cell concentration was about 5×10<sup>4</sup> cells/ml in the sample volume of 100 μl. The number of living cells was determined using MTT-colorimetric test, cell counts were performed using a tripan blue. Apoptotic level and the distribution of cells in different phases of the cell cycle were assessed by flow cytometry.

Complexes of Pd(II) with syn-A induced apoptosis in both endothelial and tumor cells. However the percentage of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase was not changed in comparison with control, on the other hand cells redistribution has place in proliferative pool population: a decrease in G<sub>2</sub>/M and increase in S-phase in the main target of angiogenesis – endotheliocytes, compared to control. We have detected that IC<sub>50</sub> for HeLa cells was in concentration range of 5×10<sup>-6</sup>-4.0×10<sup>-5</sup> M after the influence of metal complex. The effect of the complex is revealed in the right cytotoxic and antiproliferative impact. The level of apoptotic cells grew two times in comparison with relevant control.

Thus, the mechanism of palladium complex [Pd(syn-A)Cl<sub>2</sub>], as HIF-1 inhibitor analog, is revealed in a significant proapoptotic effect that would be related with incomplete DNA replication in S-phase of cell cycle, because cells accumulation in S-phase and G<sub>2</sub>/M population decrease was observed.

UDC 616.2 + 546.174

## SENSOR DEVICE DEVELOPMENT FOR NON-INVASIVE EXHALED BREATH ANALYSIS IN ASTHMA DISORDER

*O. O. PARILOVA<sup>1</sup>, B. V. PYLYPCHAK<sup>2</sup>, S. G. SHANDRENKO<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: lenaparilov@yandex.ua;*

*<sup>2</sup>National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnic Institute»*

**B**reath analysis is a powerful non-invasive technique for the diagnosis and monitoring of respiratory diseases. Elevated nitric oxide (NO) profile in exhaled breath is thought to be a marker of pulmonary inflammation. Exhaled NO is also directly associated with the extent of untreated asthma, and research has shown that it decreases with corticosteroid treatment. Fractional exhaled NO levels were shown to correlate with sputum eosinophil count, airway hyperresponsiveness, bronchodilator response, serum IgE levels, allergen skin prick testing, asthma symptoms, and lung function. These observations have generated significant interest in the clinical use of exhaled NO as a noninvasive marker to diagnose and monitor the progression of inflammatory process in the lungs during asthma.

The objective of the present study is to create a sensitive sensor system with an appropriate measurement range for detection of a lung inflammation biochemical marker in the patients' exhaled air under asthma exacerbation.

NO has a short half-life (in aqueous solution – 1 sec and *in vivo* - about 5 sec) and one unpaired electron, making it a free radical. Thus, a substantial part of exhaled NO combines readily with oxygen to form nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>). We assert that this is the case, when measuring NO<sub>2</sub> reflects the endogenic NO concentration produced in the lungs.

The experimental model of the device consisting of electrochemical gas sensor type NO<sub>2</sub>/C-20 (Membrapor) and 32-bit microprocessor module Triton 6000U for control and data acquisition with measurement accuracy  $\pm 10E-6$  V was developed. The major activity of the designed sensor device is to transduce selective recognition of NO<sub>2</sub> molecules in the form of electronic output signal that is equal to  $-(1200 \pm 200)$  nA/ppm. The electrochemical cell with resolution 0.1 ppm is equipped with three electrodes: a measuring-, a counter-, and

a reference-electrode. The sensor has developed a reliable selective response on the model gas at the normal operating concentration (0-20) ppm, where the maximum linearity is found. The maximum exposure concentration of analyte is 200 ppm. T90 response time characteristic is defined as  $< 60$  sec.

A baseline chart of sensor output signal was recorded. A typical curve demonstrating changes in peak height of voltage as a function of NO<sub>2</sub> concentration was produced. This means that analyte altered the interfacial properties of the electronic element, thus enabling the readout of the reaction by monitoring the performance of the electronic unit in the range (4-20) mA and consequently being transformed by the microprocessor module proportionally in voltage value.

The NO<sub>2</sub> standards in the gaseous phase were prepared for measurement. The generation of NO<sub>2</sub> is based on the ferrous sulfate method for nitrite ions (brown ring test) with the excessive aeration of the reaction volume. A definite amount of 40% NaNO<sub>2</sub> solution was gradually added in the reaction mixture with equal volumes of 20% FeSO<sub>4</sub> solution and concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 : 1) to achieve an expected concentration of NO<sub>2</sub> in accordance with calculations, taking into account an aeration flow rate and a generated pressure in a gas cylinder. The obtained gas was passed through 10% NaOH solution to trap impurity of hydrogen sulfide. The dilution of the gas mixture was produced for up to 4 bar by piston air compressor Ceccato OL195/24 with pumping capacity 180 l/min. Simultaneously concentration of synthesized NO<sub>2</sub> was determined experimentally using Greiss technique adapted for gaseous state.

Thus, the experimental model of sensor device for NO<sub>2</sub> gas detection has been constructed and tested. The obtained data give an incentive for further studies.

## ВПЛИВ *IN VITRO* ХЛОРИСТОГО НАТРІЮ НА КАЛЮСОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО В КУЛЬТУРІ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ

*С. В. ПИКАЛО, С. І. ВОЛОЩУК*

*Миронівський інститут пшениці ім. В. М. Ремесла НААН України;  
e-mail: pykserg@ukr.net*

Сьогодні все більше уваги приділяють пошуку шляхів використання поновлюваної енергії, накопиченої рослинами завдяки фотосинтезу. Тритикале є перспективною біоенергетичною культурою, зокрема для виробництва біоетанолу. Погіршення екологічної ситуації спричинює необхідність поліпшення стійкості тритикале до абіотичних факторів, у тому числі до засолення ґрунтів. Селекція на солестійкість традиційними методами ускладнюється неможливістю створювати стресорні фактори в польових умовах. Біотехнологічні методи дають можливість одержати рослини з бажаними ознаками. Селекцію *in vitro* можна вести за ознаками, які виявляються на клітинному рівні, зокрема за підвищеною експресією певних генів – перемикачів метаболічних шляхів, які забезпечують толерантність до абіотичних факторів. Мета роботи – оцінити вплив хлористого натрію на калюсогенез та регенерацію рослин різних генотипів тритикале в культурі незрілих зародків.

Об'єктом дослідження слугували сорти тритикале озимого Обрій, АДМ 4 та гібрид F1 Обрій/АДМ 4. Незрілі зародки виділяли за встановленою методикою і поміщали в чашки Петрі з поживним середовищем Мурасіге–Скуга. Після 4 тижнів ініціації калюсів у темряві при температурі 25 °С проводили їх субкультивування на середовищі з додаванням різних

концентрацій NaCl (0, 50, 100, 150 і 200 мМ) протягом 2 пасажів по 4 тижні. Для регенерації одержані калюсні культури субкультивували на половинному середовищі Мурасіге–Скуга з фітогормонами за освітлення і температури 22 °С. Враховували такі параметри як ефективність калюсогенезу та регенерації.

Встановлено, що хлористий натрій в селективному середовищі виявляє депресивний вплив на індукцію калюсів і здатність їх до регенерації, причому тим більше, чим більше його концентрація. За параметрами калюсогенезу і регенерації порівняння середніх для кожної концентрації значень виявило такий їх вплив:  $0 \approx 50 > 100 > 150 > 200$  мМ NaCl. Слід зазначити, що за концентрації 200 мМ ефективність калюсогенезу становить 9,1–19,0% (залежно від генотипу), а регенерація не спостерігається взагалі. Для всіх концентрацій NaCl і параметрів вивчених генотипів встановлено, що середні значення їх перекриваються, однак для кожної концентрації порядок ранжування генотипів є таким: Обрій > F1 > АДМ 4, що є підставою вважати сорт Обрій толерантнішим до дії хлористого натрію.

Різна реакція генотипу на сольовий стрес у культурі незрілих зародків тритикале озимого виявляється в різній здатності до калюсогенезу та регенерації рослин за дії хлористого натрію як селективного чинника. Відібрані генотипи можуть бути використані як матеріал для подальшої селекції.

UDC 576.08

## LIPID REDISTRIBUTION IN THE OUTER PLASMA MEMBRANE LEAFLET DURING SUICIDAL DEATH OF ERYTHROCYTES AND HELA CELLS

*K. A. PYRSHEV, A. P. DEMCHENKO*

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

Programmed cell death (PCD) is a very complex cellular phenomenon, the importance of which could be compared with division and proliferation (Elmore 2007). In suicidal programmed cell death of erythrocytes or eryptosis this process develops in the absence of the central apoptosis machinery, and it is thought that plasma membrane plays the most important role in this process. In the absence of mitochondrial depolarization and condensation of nuclei, erythrocytes share 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 phosphatidylserine plasma membrane asymmetry and blebbing are observed (Lang and Qadri 2012). However, erythrocytes share higher sensitivity to the most of PCD triggers (Lang, Qadri et al. 2012).

The aim of this research was to compare the properties of plasma membranes of nucleated cells and erythrocytes in the course of PCD.

In the present work, cellular studies were performed to validate and characterize the lipid order changes induced by PCD in outer plasma membrane leaflet of erythrocytes in comparison with that of nucleated cells. NR12S probe (Kucherak, Oncul et al. 2010; Darwich, Klymchenko et al. 2012) appeared to be useful approach for lipid order detection that al-

lows avoiding the problem with haem (heme) group absorption at 405 nm. Experiments with HeLa cells showed the connection of NR12S response with caspase 3 activity and phospholipid exposure. In contrast, erythrocytes stained with NR12S did not display the difference in response between eryptotic and intact cells. However, cholesterol depletion in erythrocytes plasma membrane leads to the emission spectral shift of NR12S. This is at odds with other parameters characterizing erythrocytes' involvement in PCD. Moreover, the microscopy data showed the increase of NR12S fluorescence intensity in the regions of forming blebs, suggesting the presence of lipid disorder domains in local parts of outer plasma membrane leaflet. It was demonstrated, that NR12S response caused by the loss of lipid order on apoptosis is probably connected with sphingomyelin hydrolysis and lipid scrambling, leading to a flux of sphingomyelin/ceramide from the outer to the inner leaflet. Thus, the lipid redistribution during PCD of erythrocytes is much less pronounced than in nucleated cells. It could be the result of lower expression of scramblase on the erythrocytes' plasma membrane or of decreased scramblase-dependent flip-flop leading to retaining the lipid ordered structures and insignificant hydration dynamics in outer leaflet of plasma membrane.

## ГЕОМЕТРИЧНІ ТА ЕНЕРГЕТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОВНОГО СІМЕЙСТВА ПАР НУКЛЕОТИДНИХ ОСНОВ $m^9Ade \cdot m^1Cyt$ : КВАНТОВО-ХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ

*Д. П. ПЛОДНИК<sup>1</sup>, І. С. ВОЙТЕШЕНКО<sup>1</sup>, Д. М. ГОВОРУН<sup>1,2</sup>*

*<sup>1</sup>Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна;  
e-mail: dimkamystery@ukr.net;*

*<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ*

Дослідження фізико-хімічних та енергетичних характеристик компонентів нуклеїнових кислот є важливою проблемою сучасної біофізики та біології. У представленій роботі квантово-хімічними методами проаналізовано геометричні та енергетичні характеристики повного сімейства пар нуклеотидних основ  $m^9Ade \cdot m^1Cyt$ .

Об'єктами дослідження обрано метильовані пари основ  $m^9Ade \cdot m^1Cyt$ , в яких глікозидний атом гідрогену замінено метильною групою в 9-му та 1-му положенні відповідно. Предмет дослідження – вплив метилування на мутагенні властивості всіх можливих конформерів пар нуклеотидних основ.

Квантово-механічні розрахунки геометричної будови досліджуваних об'єктів проводили на рівні теорії DFTB3LYP/6-311++G(d,p) у вакуумному наближенні. Усі зоптимізовані структури перевірено на стійкість за відсутністю уявних частот у коливальних спектрах, розрахованих у гармонічному наближенні, на їх основі оцінено відносну енергію Гіббса. Всі обчислення виконані за допомогою програмного пакету Gaussian 03 для платформи Win 32 (Frisch M. J. et al., 2004). Міжмолекулярні Н-зв'язки ідентифікували та досліджували методом аналізу топології електронної густини за допомогою програмного пакету AIMALL, вико-

ристовуючи хвильові функції, отримані на рівні теорії B3LYP/6-311++G(d,p).

Вперше одержано повне конформаційне сімейство Н-зв'язаних пар основ  $m^9Ade \cdot m^1Cyt$  загальною кількістю 14 структур, у кожній з яких основи знаходяться в основній таутомерній формі. Виявлена множина пар знаходиться в енергетичних межах відносної енергії Гіббса від 0 до 10,90 ккал/моль. Енергетично найвигіднішою серед них є пара основ, стабілізована двома водневими зв'язками N6H...N3 та N4H...N1 з енергіями 6,37 і 6,94 ккал/моль відповідно.

Усі зафіксовані нами пари є полярними комплексами, дипольний момент яких лежить у межах від 3,9 до 11,0D. Серед них 3 структури – плоскосиметричні, решта 11 пар мають непланарну будову.

Також детально досліджено основні фізико-хімічні характеристики міжмолекулярних Н-зв'язків, що стабілізують пари. Загальна кількість Н-зв'язків складає 28, з-поміж них: NH...N – 9, NH...O – 2, CH...N – 11, CH...O – 6 зв'язків. При цьому енергія Н-зв'язків лежить у межах 0,60 – 6,94 ккал/моль. У всіх досліджених парах спостережено по два Н-зв'язки.

Одержані результати, на думку авторів, корисні для експериментальної інтерпретації неканонічних пар нуклеотидних основ у структурі РНК та ДНК.

УДК 577.218+616-006

## НАДЕКСПРЕСІЯ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk/CIN85 У КЛІТИНАХ АДЕНОКАРЦИНОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ЛІНІЇ MCF-7 СУПРОВОДЖУЄТЬСЯ ПОСИЛЕННЯМ ПРОЯВУ ВЛАСТИВОСТЕЙ РАКОВИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

*О. О. ПОВОРОЗНЮК<sup>1,2</sup>, Г. В. ПАСІЧНИК<sup>1</sup>, І. Р. ГОРАК<sup>1,3</sup>,  
Н. В. БИЦЬ<sup>1</sup>, Л. Б. ДРОБОТ<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;*

*<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;*

*<sup>3</sup>Національний університет «Кієво-Могилянська академія», Україна;*

*e-mail: povorozniukolha@gmail.com*

Виникнення та розвиток злоякісних пухлин пов'язані, зокрема, з функціонуванням ракових стовбурових клітин (CSCs). Проводиться великий об'єм робіт із дослідження молекулярних факторів, залучених до формування та підтримання фенотипу CSCs, проте вклад в цей процес окремих адаптерних протеїнів залишається нез'ясованим. Відомо, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 виконує важливу роль не тільки в підтриманні гомеостазу нормальних клітин, але також залучений до регуляції шляхів злоякісної трансформації клітин. Метою роботи було оцінити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у прояві таких ознак ракових стовбурових клітин, як зниження проліферативного потенціалу та адгезивних властивостей, здатність до формування сфероїдів та експресія окремих поверхневих маркерів.

Дослідження проводили на клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 дикого типу та зі стабільною надекспресією

адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Показано, що надекспресія повнорозмірної форми адаптерного протеїну Ruk/CIN85 веде до зниження інтенсивності росту клітин, підвищення їх життєздатності на пізніх етапах культивування, збільшення кількості живих неприкріплених клітин та посилення їх проліферації в неприкріпленому стані в напіврідкому агарі. Встановлено також, що клітини зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 ефективніше формують мамосфери порівняно з контрольними клітинами. Відомо, що ознакою ракових стовбурових клітин молочної залози є підвищена експресія поверхневого маркера CD44 та знижена – маркера CD24 на поверхні клітин. Методом протокової цитофлуориметрії виявлено вірогідне збільшення кількості CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> клітин для субліній з найвищим рівнем експресії досліджуваного протеїну.

Одержані дані свідчать про залучення адаптерного протеїну Ruk/CIN85 до прояву властивостей ракових стовбурових клітин.



## РОЛЬ ЕНДОГЕННИХ ПРОТЕЇНАЗ В УТВОРЕННІ ПЕПТИДІВ СЕЛЕЗІНКИ, СЕРЦЯ, ШКІРИ

*Л. А. РОГОЗА, І. Г. БЕСПАЛОВА, С. Є. ГАЛЬЧЕНКО, Б. П. САНДОМИРСЬКИЙ*

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

Одним із підходів до проблеми корекції порушень функцій організму є створення лікарських засобів на основі біологічно активних пептидів. Нами розроблено метод одержання таких пептидів, який включає в себе процес кріоконсервування фрагментів органів.

Метою роботи було встановити роль ендогенних протеїназ в утворенні біологічно активних пептидів під час інкубування фрагментів селезінки, серця, шкіри.

Фрагменти селезінки і серця свиней, а також шкіри і серця новонароджених поросят отримували подрібнюючи шматочки органів ножицями та додавали 20%-й розчин кріопротектора (гліцерол, ПЕО-400 або ПЕО-1500) у співвідношенні 1:1. Завись фрагментів заморожували зі швидкістю охолодження 1 °С/хв. Для одержання екстрактів фрагменти органів інкубували у фізіологічному розчині. Термолабільні протеїни видаляли. Концентрацію пептидів визначали за довжини хвилі 280 нм. Для пригнічення протеїназ використовували суміш інгібіторів Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, США). Молекулярно-масовий розподіл низькомолекулярних фракцій пептидної природи вивчали методом високоефективної геліпроникної хроматографії.

Після 60 хв інкубування фрагментів серця свиней та поросят, кріоконсервованих під захистом ПЕО-1500, концентрація пептидів

у супернатанті є статистично значимо більшою, ніж за інкубації контрольних та кріоконсервованих у присутності гліцеролу чи ПЕО-400. Вихід пептидів із фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят, кріоконсервованих у присутності ПЕО-1500, також є більшим, ніж із некріоконсервованих або кріоконсервованих під захистом гліцеролу. Але відмінностей із фрагментами, кріоконсервованими в присутності ПЕО-400, не спостерігається. Через 90 хв інкубування збільшення концентрації пептидів не відбувається ні в одному випадку порівняно з попереднім терміном інкубації для всіх досліджуваних фрагментів органів.

За інкубування фрагментів органів як контрольних, так і кріоконсервованих (кріопротектор ПЕО-1500) у присутності інгібіторів протеїназ (ІП), концентрація пептидів у супернатанті статистично значимо менша, ніж за інкубування без їх додавання. Під час дослідження вмісту пептидів у різних діапазонах молекулярних мас встановлено, що в разі додавання ІП зменшується кількість низькомолекулярних пептидів в екстрактах.

Таким чином, кріоконсервування фрагментів органів під захистом ПЕО-1500, а також ПЕО-400 для фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят дозволяє збільшити вихід пептидів у супернатант. Встановлено значну роль ендогенних протеїназ в утворенні пептидів під час інкубування фрагментів органів.

UDC 549.67+543.555+544.723+543.215.1

## INVESTIGATION OF THE AMMONIUM IONS ADSORPTION ON CLINOPTILOLITE FOR THE MATERIAL APPLICATION AS A SELECTIVE ELEMENT IN THE CONDUCTOMETRIC SENSORS

*O. Y. SAIAPINA<sup>1</sup>, A. WALCARIUS<sup>2</sup>, N. JAFFREZIC-RENAULT<sup>3</sup>, S. V. DZYADEVYCH<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: osayapina4@gmail.com;*

<sup>2</sup>*University Henri Poincare Nancy 1, Villers-les-Nancy, France;*

<sup>3</sup>*University Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France;*

<sup>4</sup>*Institute of High Technologies, Taras Shevchenko Kyiv National University*

Increase in the ammonium concentrations in the water systems causes a significant environmental and economic concern nowadays. It is often a result of the insufficient ammonium removal from the industrial wastewaters and the municipal sewages. Moreover, the ammonium inflow to the surface and ground waters can originate from other sources. These include but not limited to the land-applied manure and biosolids, the septic systems, the animal feedlot runoff, the land-applied fertilizers, the manure storage structures, the fertilizer facilities. Therefore, the necessity in the direct, highly sensitive and accurate, low-cost and fast methods of the ammonium determination in the aqueous systems is well-observed and the appropriate methods still need to be reviewed or developed. This work was aimed to study the ammonium-selective properties of the natural zeolite clinoptilolite (CLT) and its applicability for the conductometric determination of ammonium in a differential mode of measurements.

A powdered sample of CLT of the Romanian origin (ZN-C1BF-R zeolite from Mediterranean Society of Zeolites, France) was taken for investigation. Its unit cell formula was  $(\text{Na}_{0.10}\text{K}_{0.57})(\text{Ca}_{0.47}\text{Mg}_{0.15})(\text{Al}_{1.97}\text{Fe}_{0.12})(\text{Si}_{9.96}\text{Ti}_{0.02})\text{O}_{24}\times 7\text{H}_2\text{O}$ ; the average size of particles was 0.4  $\mu\text{m}$ ; the crystals had the monoclinic form with platelets of 10–20 nm thick.

The sensitivity of CLT to the ammonium ions was studied in the ultra-pure water (water resistivity was no less than 18.2  $\text{M}\Omega\times\text{cm}$ ) with  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Na}^+$  ions in the concentration range of 0.01–1 mM

of each; the aqueous solutions of  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$  ions (in concentration of 5 mM of each), the buffer solutions as well as the buffer solutions with the increasing concentrations of the above mentioned ions. Coefficients of selectivity were calculated by Fixed Interference Method. The sensitivity of a pair of electrodes which were not modified with CLT was studied in 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  solution, 5 mM Tris-HCl, and 5 mM HEPES-NaOH buffer solutions.

Sorption of ammonium by zeolite was found based on the comparison of conductivities of the CLT-containing phosphate buffer solution, the CLT-containing phosphate buffer solution with the increasing concentrations of ammonium and the phosphate buffer solution with the increasing concentrations of ammonium (in the absence of zeolite). The conductivity variations were compared for the aqueous solutions of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Na}^+$  ions and for the former solutions but in the presence of CLT. It was found that the conductivity growth for the CLT-containing solution at the ammonium concentrations of 0.01, 0.1, 0.5 and 1 mM was 4.6, 651.5, 195.9 and 146.9%, respectively.

The sufficient selectivity of CLT toward ammonium was shown which allows its further detection in the complex media using the conductometric sensors with the differential mode of measurements. The development and optimization of the clinoptilolite-based conductometric microsensor for ammonium determination is ahead.

## THE GLUTATHIONE CATABOLISM ENZYMES AND THE THIOREDOXIN REDUCTASE ACTIVITIES IN MUCOSA CELLS UNDER EXPERIMENTAL GASTRIC CARCINOGENESIS

*M. TYMOSHENKO, O. KRAVCHENKO, O. BERNYK, L. OSTAPCHENKO*

*Educational and Scientific Centre Institute of Biology  
Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;  
e-mail: maria.bulavka@gmail.com*

There are two thiol redox systems found in cells – the thioredoxin reductase (TrxR)/thioredoxin complex and the glutathione reductase (GR)/glutathione complex. The main provider of reducing equivalent - NADPH, for both these redox systems is the glucoso-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). TrxR in conjunction with thioredoxin is a ubiquitous oxidoreductase system with antioxidant and redox regulatory roles. The main enzyme of the glutathione conjugates catabolism is the  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT). The glutathione and thioredoxin systems play a key role in protection of cellular macromolecules from damage due to reactive oxygen species, which enhanced production appears to be an important factor in the induction of cancer.

Thus, the aim of the study was to determine the activities of TrxR, GR,  $\gamma$ -GT and G6PD in gastric mucosa cells during the process of rat gastric cancer development.

The gastric carcinogenesis was initiated in 49 white male rats by 10-week replacement of drinking water by 0.01% solution of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, at the same time they were re-defined on the diet containing 5% NaCl. After this period expiry the animals were fed with standard vivarium diet till the end of the 24<sup>th</sup> week. The gastric

mucosa cells were extracted at the end of the 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> week. The standard spectrophotometric methods were used to determine the activities of investigated enzymes.

The gastric mucosa cells were characterized by increased activity of TrxR for all research periods of carcinogenesis on the average 2.4 times over the control and the increased GR activity on the average 1.4 times fold of the 6<sup>th</sup> to 24<sup>th</sup> week, except for the 10<sup>th</sup> week, when the 1.5-fold decrease of GR activity was observed. Similarly, the activity of G6PD grew up at an average 2.1 times at the 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> week and reduced 1.5 times at the 10<sup>th</sup> week of gastric carcinogenesis compared to the control. Thus, the intensification of the antioxidant system functioning with the reducing processes prevalence was showed by the increased activities of TrxR, GR and their leading provider of renewable NADPH equivalents, – G6PD. At the stage of 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> weeks of the gastrocancerogenesis study there was a 1.4-fold increase of  $\gamma$ -GT activity on the average in comparison to reference values. The obtained results gave the reason to suppose the fundamental significance of the joint disorders of glutathione and thioredoxin redox homeostasis in the development of gastric mucosa malignancy.

UDC 616.438-008.931:577.152.-02

## THE DEVELOPMENT OF CARBONYL STRESS UNDER EXPERIMENTAL DIABETES AND RHABDOMYOLYSIS IN RATS

*K. O. TOKARCHUK, I. P. KRYSYUK, S. G. SHANDRENKO*

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: kate\_tokarchuk@ukr.net*

Lipid peroxidation and non-enzymatic protein glycosylation are two main ways of endogenous aldehydes formation. These carbonyl compounds form post synthetic modifications in proteins and nucleic acids that lead to disruption of their functions. The goal of this research was the investigation of carbonyl stress parameters formation under two rat's experimental models: streptozotocin-induced diabetes (STZD, model of hyperglycemia) and glycerol-stimulated rhabdomyolysis (RM, oxidative stress model) and the possibility of amino acid solution Corectin 2 (Cor2) using, designed in our laboratory for decreasing the carbonyl stress intensity. There were 4 groups of animals ( $n = 8$ ): gr. 1 – control; gr. 2 – STZD; gr. 3 – STZD+RM; gr. 4 – STZD+RM+Cor2. Groups 2-4 were intraperitoneally injected with 1 ml of incomplete Freund's adjuvant and after 24 hrs with streptozotocin (STZ, 25 mg/kg) weekly for three times for STZD induction. Groups 3-4 were injected with 50% glycerol solution (10 ml/kg) on the 7th day after the last STZ injection for RM induction. Cor2 (10% L-lysine, 8% L-glycine, 2.5% N-acethyl-cysteine) was given to the group 4 (10 ml/kg/day) per os for 2.5 month.

Total aldehydes (purpald assay), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein CO groups (ELISA), low weight SH groups, and carboxymethyllysine (CML, ELISA) were determined.

Blood glucose level ( $27 \pm 8$ ) mmol/l was accepted as diabetes vs. control ( $6.5 \pm 1.7$ ) mmol/l on the 7<sup>th</sup> day after the last STZ injection.

Carbonyl stress development was proved by increasing the aldehydes level in plasma by 21% and in the liver by 64%, TBARS about 4 times in plasma and in the liver, CO groups by 33% and CML by 67% in plasma under STZD. Low weight SH groups were decreased in the liver by 44%.

Under RM+STZD, the aldehydes level was decreased by 52% in the liver, TBARS by 11% in the liver, CO groups by 20% in plasma, CML by 11% in plasma vs. STZD. SH groups were increased by 20% in the liver. These changes indicated that additional stimulation of RM in animals with STZD had a significant influence on carbonyl stress development. We suggested that it can be associated with the antagonistic interaction between aldehydes formed during RM and STZD.

After Cor2 administration, the decreasing of aldehydes level by 50% in plasma and by 65 % in the liver were observed. These effects may be a result from overabundance of exogenous cysteine and lysine which form complexes with aldehydes and shield the biological targets. These changes led to a decrease of TBARS 2.5 times in the liver and 3 times in plasma, of CML 2 times in plasma vs. RM+STZD. SH-groups were increased by 23%.

Thus, amino acid solution Corectin 2 may be successfully used to decrease the carbonyl stress after-effects.

**BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE DEVELOPMENT  
OF GLUCOCORTICOID-INDUCED OSTEOPOROSIS***A. V. KHOMENKO, L. I. APUKHOVSKA**Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: annavic@ukr.net*

Osteoporosis is recognized as one of the most typical complications caused by glucocorticoids (GC). The mechanism of alterations in bones is not sufficiently revealed. Impairments of mineral metabolism and bone tissue structure associated with GC-therapy could be ascribed to direct influence of the drugs on bone or through inhibition of vitamin D<sub>3</sub> turnover. The study was designed to investigate the influence of synthetic GC prednisolone on bone tissue remodeling in relation to cholecalciferol metabolism in hepatocytes.

Female Wistar rats (100 ± 5 g) received prednisolone in a dose of 5 g/kg of body weight per os (daily for 30 days). The contents of 25OHD<sub>3</sub>, OPG, RANKL in serum were measured by ELISA. Vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase activity was assayed in vitro in isolated hepatocytes by the method of radio-competitive binding of [<sup>3</sup>H]-25OHD<sub>3</sub>. The levels of CYP27A and CYP2R1 in liver tissue were measured by Western blot. Expression of Bax and Bcl-2 in hepatocytes was assessed by immunocytochemistry. Cell viability was determined using flow cytometry with propidium iodide (PI). The levels of Ca, Pi, activity of alkaline phosphatase (ALP) and its bone isoenzyme in serum and bone tissue were determined by using the Biotest kits.

It was shown that prednisolone administration lowered the level of 25OHD<sub>3</sub> (by 70%) in serum and inhibited two times the total activity of vitamin D<sub>3</sub>

25-hydroxylase in hepatocytes vs. control. Prednisolone reduced the content of CYP27A1 and CYP2R1 isoforms of 25-hydroxylase by 78% and 27%, respectively. Administration of the GC led to disruption of the integrity of hepatocytes triggering destructive changes in these cells, thus reducing the number of functionally active hepatocytes. These cytological changes were further confirmed by a significant increase in the number of hepatocytes capable to accumulate PI that is associated with necrotic cell death. On the contrary, apoptotic index Bax/Bcl-2 was found to be markedly reduced suggesting proapoptotic signaling down-regulation. The decrease in 25OHD<sub>3</sub> biosynthesis led to hypocalcemia and hypophosphatemia that was accompanied by the elevation of the total activities of ALP and its bone isoenzyme in serum. Similar changes of mineral metabolism were also observed in bone tissue. Prednisolone reduced the level of OPG by 34% and increased the level of RANKL by 27% in serum that resulted in lowering of OPG/RANKL ratio 1.7 times. In conclusion, the data showed that GC administration inhibited remodeling and activated demineralization of bone tissue that correlated with hepatic dysfunction and alterations of vitamin D<sub>3</sub> turnover. Normalization of vitamin D<sub>3</sub> availability might be considered to be perspective in reducing the negative effects of GC on the bone tissue remodeling.

UDC 577.336+667.287.4

**PHTHALOCYANINES WITH OUT-OF-PLANE QUINOLINIUM STYRYL LIGAND AS INHIBITORS OF INSULIN AMYLOID FIBRILS FORMATION***S. V. CHERNII<sup>1</sup>, V. B. KOVALSKA<sup>1</sup>, M. Yu. LOSYTSKYI<sup>1</sup>, V. V. CHEREPANOV<sup>2</sup>,  
V. Ya. CHERNII<sup>3</sup>, I. M. TRETYAKOVA<sup>3</sup>, S. M. YARMOLUK<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: chernii.sv@gmail.com;**<sup>2</sup>Institute of Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;**<sup>3</sup>Institute of General and Inorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

The pathogenesis of many diseases, including neurodegeneration and amyloidoses is connected with formation by involved proteins of the  $\beta$ -folded stable insoluble aggregates called amyloid fibrils. A number of compounds that belong to different chemical classes are known as inhibitors of this process. Previously we have shown that zirconium and hafnium phthalocyanines with different out-of-plane substitutes demonstrated the high efficiency of inhibition of fibrils formation.

The goal of this work is to investigate the Hf and Zr phthalocyanines with axially-coordinated quinoline styryl dye as potential inhibitors of insulin fibril formation. Reactions of fibril formation were performed by incubating the insulin solution in a water bath at 65 °C for about 5 h (concentration of protein was 340  $\mu$ M, that of inhibitor was 100  $\mu$ M). Dose-dependent inhibition of insulin fibrils formation by Zr and Hf phthalocyanines was performed using 0, 0.1, 0.5, 2, 10 or 100  $\mu$ M concentration of inhibitors. The inhibition was monitored by fluorescence intensity changes of the amyloid-sensitive dye 7519. The inhibitory activity was calculated as  $(1 - I/I_0) \times 100\%$ , where  $I_0$  and  $I$  are 7519 fluorescence intensity values in control sample and in the presence of inhibitor, respectively.

Phthalocyanines with Zr and Hf as central metals demonstrated the same high inhibitory activity of about  $\approx 90\%$  and similar values of  $IC_{50}$  equal to  $0.16 \pm 0.08 \mu$ M and  $0.11 \pm 0.04 \mu$ M, respectively. The suppression of fibril formation induced by Hf phthalocyanine was confirmed by atomic force microscopy. It should be noted that previously we reported the ability of axially-coordinated phthalocyanines to redirect the insulin aggregation process toward the formation of oligomeric or amorphous aggregates, while in the presence of Hf phthalocyanine amyloid fibrils of characteristic diameter (about 6 nm) and proto-filamentous species of smaller diameter were detected as the main product of aggregation reaction.

Thus, we propose that the studied compounds are highly efficient inhibitors of protein amyloid fibril formation. We suppose that the nature of the central metal slightly affects the inhibitory properties of axially-coordinated phthalocyanines, while out-of-plane ligands could play an important role for anti-fibrillogenic activity of these macrocyclic complexes.

*This work was supported by STCU – NASU (grant 5972).*

**АД'ЮВАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОЧАСТИНОК РІЗНОГО РОЗМІРУ ТА ХІМІЧНОЇ БУДОВИ З ІММОБІЛІЗОВАНИМ РЕКОМБІНАНТНИМ ФРАГМЕНТОМ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ ЗА ІМУНІЗАЦІЇ *PER OS***

*Т. О. ЧУДИНА, О. І. КРИНІНА, К. Ю. МАНОЙЛОВ,  
Н. В. КОРОТКЕВИЧ, А. Ю. ЛАБИНЦЕВ*

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

**Б**ільшість бактеріальних патогенів потрапляють в організм крізь слизові оболонки, а, отже, імунна відповідь у них є визначальним захисним фактором. Поглиблення знань щодо особливостей розвитку імунної відповіді в слизових оболонках відкриває нові можливості для розробки пероральних вакцин, які матимуть в них локальний імуностимулюючий ефект. Під час розробки таких вакцин найважливішими проблемами є вибір способу доставки антигену, захист антигенного матеріалу від дії пошкоджуючих факторів внутрішнього середовища організму та вибір безпечних ад'ювантів для підсилення імунної відповіді в слизових оболонках. Головним фактором патогенності збудника дифтерії є дифтерійний токсин, який продукується бактерією в місцях колонізації на слизових оболонках дихальних шляхів. Отже, індукція потужного антитоксичного імунітету в них потенційно здатна захистити організм від інфекції.

Метою роботи було порівняння ад'ювантних властивостей наночастинок різної хімічної природи на основі фосфату кальцію (САР) розміром 37 нм, колоїдного золота (GoldI та GoldII) розмірами 9 та 16 нм і полілактоїдогліколіду (PLGA I та PLGA II) розмірами

35 та 100 нм відповідно, кон'югованих із рекомбінантним фрагментом дифтерійного токсину шляхом визначення концентрацій антитіл IgA та IgG у периферичній крові мишей.

Дослідження проводили на мишах-самках BALB/c однакового віку та маси, яких імунізували *per os* із розрахунку 250 мкг протеїну на 1 кг маси тіла три рази з періодичністю в два тижні. Сироватки для аналізу вмісту антитіл збирали через тиждень після кожної імунізації.

Показано, що концентрації антитіл IgA в крові порівняно з контролем помітно збільшуються вже після другої імунізації в груп мишей, які отримували антиген, кон'югований з носіями PLGA I та PLGA II, а також GoldII. У групі мишей, що отримували PLGA II, також відмічено збільшення концентрацій IgG у крові після третьої вакцинації.

З огляду на результати досліду можна зробити висновок, що наночастинки PLGA I, PLGA II та GoldII мають найкращу здатність стимулювати імунну відповідь на іммобілізований на них антиген за перорального введення. Це дозволяє розглядати їх як можливі носії для створення пероральної форми доставки вакцинних препаратів.

УДК 577.114.121.085.1

## ДИНАМИКА БИОДЕГРАДАЦИИ АЛЬГИНАТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ В МИОКАРДЕ КРЫС

*Т. В. ШКАНД<sup>1</sup>, А. Л. ТАТАРЕЦ<sup>2</sup>, Н. А. ЧИЖ<sup>1</sup>,  
И. В. СЛЕТА<sup>1</sup>, Б. П. САНДОМИРСКИЙ<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков,  
e-mail: cryo\_tatyana@mail.ru;*

*<sup>2</sup>ГНУ «НТК Институт монокристаллов НАН Украины», Харьков,  
e-mail: tatarets@isc.kharkov.com*

**В** последние годы значительно возрос интерес к биополимерам, применяемым в кардиологии. Полимерные имплантаты могут использоваться в качестве механической «заплатки», предотвращая развитие аневризмы сердца в постинфарктный период. Кроме того имплантаты могут быть носителями биологически активных веществ, применяемых с терапевтической целью в зоне повреждения сердечной мышцы.

Объектами наших исследований были имплантаты на основе гелей солей альгиновой кислоты. Ранее нами изучалась динамика экстракции из гелевых имплантатов биологически активных полипептидов, меченых нековалентно связанным флуорофором (патент UA № 86783, опубл.10.01.2014, Бюл.№1). Настоящая работа посвящена исследованию деструкции имплантатов в сердечной мышце.

Работа выполнена на 24 крысах-самцах массой 200–270 г. Гель альгината натрия ковалентно связывали с флуоресцентным красителем K8-3002 (SETA Biomedicals, LLC; Urbana, IL, США). Экспериментальным животным под масочным наркозом проводили торакотомию с последующим инъекционным введением в миокард со стороны перикарда флуоресцирующего

геля. Оценку динамики деградации имплантатов проводили методом контактной люминесцентной микроскопии с помощью микроскопа «Люмам К-1», снабженного средствами видеорегистрации, что позволяло качественно и количественно (с помощью программы BioVision 4.0) описать состояние имплантата. Исследования проводили через 20 мин, после введения геля, а также на 1, 3, 7, 14 и 21 сутки после операции.

Применяемая методика дала возможность наблюдать яркую флуоресценцию исследуемого геля на темном фоне сердечной мышцы. Фрагментация гелевого имплантата на несколько крупных вакуолей происходила на 3-и сутки, в последующие сроки наблюдения размеры вакуолей значительно уменьшались. На 21-е сутки в миокарде наблюдали точечное свечение остатков геля, напоминающее «звездное небо».

Таким образом, установлено, что с течением времени в сердечной мышце происходит постепенная фрагментация гелевого имплантата, его полная деградация наступает на 21-е сутки после введения в миокард. Введение и последующая деструкция гелевого имплантата не вызывает значительных изменений в архитектонике сердца крыс.



## АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ЗАРОДКІВ В'ЮНА ЗА ВПЛИВУ МІКРОХВИЛЬОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

*М. М. ЯРЕМЧУК, О. М. СЕМОЧКО, Д. І. САНАГУРСЬКИЙ*

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;  
e-mail: m.yaremchuk@i.ua*

Відомо, що радіочастотне електромагнітне випромінювання (РЧ ЕМВ) може призводити до порушення біохімічних процесів та нормального функціонування організму. Показано, що у відповідь на мікрохвильове випромінювання розвивається оксидативний стрес, збільшується кількість активних форм кисню та знижується активність антиоксидантних ензимів. Тому дослідження впливу мікрохвильового випромінювання на активність ензимів антиоксидантної системи (АОС) зародків в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) є актуальними.

В експериментах використовували зародки в'юна на різних стадіях розвитку – 2, 16, 64, 256 і 1024 бластомери. Ікру інкубували в розчині Гольфрета. Одержані зиготи опромінювали одноразово відразу після запліднення протягом 5 і 10 хв на частотах мобільного зв'язку (900 МГц, SAR – 1,1 Вт/кг) з відбором зародків на досліджуваних стадіях. Мобільний телефон перебував у режимі розмови та містився над досліджуваним об'єктом на відстані 3 см. Визначали активність ензимів АОС – супероксиддисмутази (СОД) за методом В. А. Костюка, каталази за методом М. А. Королюка та глутатіонпероксидази за методом В. М. Моїна.

Встановлено, що вплив мікрохвильового випромінювання призводить до підвищення активності СОД ( $P \geq 0,95$ ). Згідно з результатами наших досліджень на стадії двох бластомерів

активність СОД вища удвічі порівняно з контролем. На стадії 16 бластомерів активність ензиму зростає на 40–50%, на стадії 64 бластомерів – на 80–90%, а на стадії 8-го поділу – на 30–50%. Встановлено 1,5–2-разове зростання активності ензиму на стадії 10 бластомерів порівняно з контролем. На відміну від СОД, активність каталази в зародків в'юна, навпаки, знижується на стадіях 2, 16, 64 і 256 бластомерів за впливу ЕМВ порівняно з відповідними показниками контрольної групи. Винятком є стадія 10 поділу бластомерів, на якій відмічено дворазове зростання активності досліджуваного ензиму ( $P \geq 0,95$ ). Також встановлено, що активність глутатіонпероксидази знижується на всіх досліджуваних стадіях розвитку зародків за впливу мікрохвильового випромінювання. Найчутливішою до впливу ЕМВ виявляється стадія 64 бластомерів, на якій спостерігається зниження активності ензиму на 65% порівняно з контролем. Тенденція змін активності глутатіонпероксидази порівняно з активністю СОД і каталази протилежна за напрямом.

Отже, вплив мікрохвильового випромінювання призводить до порушення функціонування ензимів АОС. На всіх досліджуваних стадіях розвитку істотно зростає активність СОД та вірогідно знижується активність глутатіонпероксидази і каталази. Винятком є зростання активності каталази на стадії 10 поділу бластомерів ( $P \geq 0,95$ ).