

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ КОНФЕРЕНЦІЇ МОЛОДИХ УЧЕНИХ «АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ БІОХІМІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ – 2010», ПРИСВЯЧЕНОЇ 125-РІЧЧЮ ВІД ДНЯ НАРОДЖЕННЯ АКАДЕМІКА ОЛЕКСАНДРА ВОЛОДИМИРОВИЧА ПАЛЛАДІНА

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, травень, 2010 р., Київ

За результатами таємного голосування журі визначило переможців конференції молодих учених:

I місце

Дворніков Дмитро Сергійович за роботу: Tks4 – new Ruk/CIN85 interaction partner (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України)

II місце

Чернишенко Володимир Олександрович за роботу: Дослідження експонованості B β N-домену при переході фібриногену в фібрин (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

Короткевич Наталія Валеріївна за роботу: Отримання рекомбінантної розчинної форми HB-EGF людини та його флуоресцентних похідних і перспективи їхнього застосування (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

III місце

Крупко Ольга Олександрівна за роботу: Стимуляція нейросекреторного процесу за активації пресинаптичних глутаматних рецепторів (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

Касаткіна Людмила Олександрівна за роботу: Direct and reversed function of Na⁺-dependent glutamate transporters in blood platelets (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України/Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

Лабинцев Андрій Юрійович за роботу: Роль T-домену у внутрішньоклітинному трафіку рекомбінантних фрагментів дифтерійного токсину (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

Цапенко Марина Вікторівна за роботу: Генно-інженерні імунокон'югати на основі одноланцюгових антитіл (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України).

Журі призначило також заохочувальні премії:

Фальфушинська Галина Іванівна за роботу: Вплив сполук металів на активність молекулярних детоксикаційних систем у карася *Carassius auratus gibelio* на тлі хронічної дії несприятливих чинників (Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка).

Панасюк Наталія Богданівна за роботу: Посилення цитопротективних механізмів за поєднаного застосування амарантової олії та блокаторів ЦОГ-2 при експериментальному коліті (Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького).

Бучковська Іванна Михайлівна за роботу: 5'-нуклеотидазна активність у гепатоцитах щурів із карциномою Герена, трансплантованою на фоні малих доз опромінення (Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича).

МЕХАНІЗМИ ГАЛЬМУВАННЯ ФІБРИНОЛІЗУ В ЗОНІ ЗАПАЛЕННЯ

К. С. АНДРІАНОВА, О. Ю. СЛОМІНСЬКИЙ, С. І. АНДРІАНОВ, А. В. ПЕТИК

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

Характерною ознакою синдрому запалення є локальне утворення фібринових депозитів на стінках судин. Передумовою їхнього утворення є зростання рівня фібриногену, зміна фенотипу ендотелію та активація системи зсідання крові моноцитами та ендотеліальними клітинами. Проте потужність плазміноген–плазмінової системи організму надзвичайно велика та значно перевищує сумарну інгібіторну активність плазми крові. Враховуючи наявність у зоні запалення високого рівня активності еластази, у динамічній системі було вивчено вплив на швидкість гідролізу згустка продуктів еластолізу молекули плазміногену.

Встановлено, що продукти еластолізу молекули плазміногену зтягають час напівлізису згустка без зміни його структури. Характер інгібування та ефективність впливу кринглових структур і мініплазміногену значно різняться. Гальмування фібринолізу крингловими структурами зафіксовано лише за досягнення порогового рівня з досить швидким виходом на плато насичення. Натомість залежність швидкості гідролізу згустка від концентрації міні-

плазміногену є лінійною. Такий ефект мініплазміногену був дещо несподіваним, з огляду на те, що у стаціонарній системі мініплазміноген прискорює гідроліз згустка. Найімовірнішим поясненням розбіжностей результатів динамічної та стаціонарної систем є вимивання в умовах реального потоку мініплазміногену та тканинного активатора плазміногену зі згустка.

У разі поєднання кринглових структур та мініплазміногену зафіксовано арифметичну суму сили ефекту. Ймовірно таку різницю обумовлено розбіжністю механізмів гальмування: кринглові структури конкурують із плазмін(оген)ом за місця зв'язування на фібрині, тоді як мініплазміноген – за тканинний активатор.

Отже, накопичення продуктів еластолізу молекули плазміногену в зоні запалення призводить до істотного гальмування гідролізу фібрину та фіксації фібринових депозитів на стінках судин. Така фіксація є виправданою з огляду на фізіологічну роль фібрину в регуляції статусу судин, перебігу запального процесу та забезпеченні регенерації uszkodженої ділянки.

УДК 577.152.3

**ВЗАЄМОДІЯ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-99 ІЗ МІОЗИНОМ
ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА***А. А. БЕВЗА, О. М. БОБРОВСЬКА, О. В. БЕВЗА, Р. Д. ЛАБИНЦЕВА**Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: linnika@ukr.net*

Міозин є Mg^{2+} -залежною АТР-азою. Катиони Mg^{2+} відіграють істотну роль у каталізі гідролізу АТР міозином, в утворенні та стабільності комплексу міозинового S-1 з нуклеозидфосфатами. Раніше нами був показаний інгібуючий вплив каліксарену С-99 на АТР-азу субфрагмента-1 (голівки, S1) міозину міометрія. З метою вивчення механізму гальмівної дії каліксарену на АТР-азу S1 міозину досліджували вплив цієї сполуки на кінетичні параметри АТР-гідролізу реакції за Mg^{2+} (K_{Mg} та V_{Mg}). У разі дослідження залежності активності субфрагмента-1 міозину від концентрації іонів магнію (0,5–5 мМ) встановлено, що за 100 мкМ каліксарену С-99 максимальне значення ензиматичної активності, як і в контролі, спостерігається за 4 мМ Mg^{2+} , але за наявності каліксарену його рівень зменшується на 40% порівняно з контролем. Каліксарен С-99 знижує уявну максимальну швидкість реакції гідролізу АТР голівкою міозину за Mg^{2+} , зменшуючи спорідненість ензиму до катіону Mg. Отже, у цьому разі має місце змішаний тип інгібування каліксареном С-99 гідролізу АТР, що каталізується субфрагментом-1.

Внаслідок дослідження взаємодії каліксарену С-99 з гладеньком'язовим міозином методом конфокальної мікроскопії з використанням моноклональних антитіл проти міозину

на клітинах первинної культури гладеньких міоцитів виявлено відмінності у структурі розподілу міозину в міоцитах у контролі та у присутності каліксарену С-99, що може бути обумовлено конформаційними перебудовами у структурі міозину в разі його взаємодії з каліксареном С-99.

Дослідження взаємодії калікс[4]арену С-99 із субфрагментом-1 міозину гладенького м'яза у присутності Mg^{2+} методом комп'ютерного моделювання показало, що присутність катіонів Mg, як кофактор в лігандзв'язуючому центрі (ЛЗЦ) S1 міозину, змінює просторову орієнтацію комплексів каліксарен-АТР та окремо молекули АТР у просторі ЛЗЦ голівки міозину, що корелює з експериментальними даними щодо впливу каліксарену на Mg^{2+} -залежність АТР-ази S1 міозину. Під час проведення докінгу каліксарену С-99 в ЛЗЦ за наявності та відсутності іонів магнію визначені амінокислоти, які беруть участь у зв'язуванні каліксарену та АТР із ділянками ЛЗЦ, а також одержані значення вільної енергії зв'язування каліксарену С-99 та АТР із субфрагментом-1 міозину міометрія гладенького м'яза.

Автори вдячні члену-кор. НАН України В. І. Кальченку та його колегам (ІОХ НАН України) за надання каліксарену С-99 та обговорення результатів дослідження.

НОВІ ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ СПОНТАННИХ ТА ІНДУКОВАНИХ АНАЛОГАМИ ОСНОВ ТРАНЗИЦІЙ

О. О. БРОВАРЕЦЬ^{1,2}, Д. М. ГОВОРУН^{2,3}¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: brovarets@list.ru;²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;³Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна

Як відомо, точність реплікації ДНК є ключовим фактором стабільності геному. Хоча широко поширена думка, що мутації *in vivo* трапляються під час утворення неправильних пар впродовж реплікації ДНК, проте природа утворення цих пар залишається нез'ясованою.

2-Амінопурин (2AmPur) є одним із класичних низькомолекулярних мутагенів, який належить до класу похідних нуклеотидних основ. 2AmPur, як відомо, є високоенергетичним ізомером ($\Delta G = G_{2AmPur} - G_{Ade} = 4,09$ ккал/моль) канонічної пуринової основи ДНК аденіну (Ade). Незважаючи на те, що молекулярні механізми точкового мутагенезу, спричиненого 2AmPur, вивчаються як експериментально, так і теоретично понад 50 років, прикінцеву крапку в цьому біологічно важливому питанні так до цього часу і не поставлено.

Метою роботи є з'ясування на основі якісно нових модельних уявлень елементарних молекулярних механізмів мутагенної дії 2AmPur, які ґрунтуються на нещодавно відкритому нами новому фізико-хімічному механізмі спонтанних транзицій. Водночас нами встановлено на квантово-хімічному рівні, що гіпотетичний іонізаційний механізм мутагенної дії 2AmPur є неадекватним.

Об'єктом дослідження є 2AmPur, пари за його участі з тиміном (Thy) і цитозином (Cyt)

та фізико-хімічні параметри їхнього взаємоперетворення у пари за участю мутагенних таутомерів, квазіізоморфні уотсон-кріківським. Предмет дослідження – елементарні молекулярні механізми мутагенної дії на ДНК 2AmPur.

При дослідженні були застосовані методи неемпіричної квантової хімії на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//DFT B3LYP/6-311++G(d,p), фізико-хімічної кінетики, аналіз топології електронної густини за Бейдером.

Вперше на рівні теорії MP2/6-311++G(2df,pd)//B3LYP/6-311++G(d,p) показано, що помилки реплікації, зумовлені 2AmPur, здійснюються за механізмом $2AmPur \cdot Thy \rightarrow 2AmPur \cdot Thy^*$, при цьому заселеність станів $2AmPur \cdot Thy^*$ за стандартних умов перевищує заселеність станів $Ade \cdot Thy^*$, які визначають спонтанний мутагенез, у ~1390 разів. Доведено, що частота помилок реплікації, індукованих 2AmPur, на декілька порядків перевищує частоту помилок включення, які реалізуються за механізмом $2AmPur \cdot Cyt \rightarrow 2AmPur \cdot Cyt^*$. Вперше встановлено, що гіпотетичний іонізаційний механізм мутагенної дії 2AmPur не є адекватним.

Одержані теоретичні результати дозволяють непротиречиво пояснити існуючі експериментальні результати.

УДК 577.322

**IN SILICO ДИЗАЙН ТА БІОХІМІЧНЕ ТЕСТУВАННЯ
НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ ASK1*****Г. П. ВОЛИНЕЦЬ, В. Г. БДЖОЛА, О. П. КУХАРЕНКО, С. М. ЯРМОЛЮК****Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: galina.volinetc@gmail.com*

Протеїнкіназа ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) відіграє важливу роль у процесах диференціювання, старіння і апоптозу клітин. Підвищена активність ASK1 пов'язана з розвитком багатьох патологій. Інгібітори ASK1 можуть бути терапевтичними засобами для лікування низки нейродегенеративних, серцево-судинних хвороб та фіброзної гістіоцитомі. Однак дотепер офіційно не опубліковано жодних результатів про успіхи пошуків синтетичних інгібіторів, які б мали високу активність та специфічність стосовно ASK1.

Робота присвячена пошуку інгібіторів ASK1 за допомогою методів комп'ютерного моделювання та біохімічного тестування.

На початковому етапі дизайну інгібіторів ASK1 здійснено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, яка налічувала 164 840 хімічних сполук. На основі показників енергії утворення комплексів низькомолекулярних сполук з ензимом, що були розраховані за допомогою пакету програм DOCK 4.0 та внаслідок оцінки формування водневих зв'язків із амінокислотними залишками АТР-зв'язувального сайту протеїнкінази ASK1 для тестування *in vitro* відібрано 197 сполук різних

класів. Серед них виявлено три активні сполуки – похідні 2-тіоксо-тіазолідин-4-ону. Найактивніша сполука мала IC_{50} 2 мкМ. Потім було проведено віртуальний скринінг бібліотеки похідних 2-тіоксо-тіазолідин-4-ону, яка нараховувала 8425 сполук. Для біохімічного тестування було відібрано 20 сполук. Найактивніша сполука мала K_i 250 нМ і виявляла АТР-конкурентний тип інгібування. Селективність цієї сполуки перевірено *in vitro* на кіназах FGFR1, CK2, JNK3, c-Met, Aurora A, ROCK та Tie2.

За допомогою аналізу взаємодії сполук із амінокислотними залишками протеїнкінази ASK1 методами комп'ютерного моделювання встановлено, що сполуки досліджуваного класу виявляють хорошу стеричну комплементарність із АТР-зв'язувальною кишенею ензиму. Перевагою типу зв'язування найактивнішої сполуки порівняно з іншими 19 тестованими є одночасна взаємодія із шарнірною ділянкою протеїнкінази, що з'єднує субдомени каталітичної субодиниці ASK1, та фосфатзв'язувальним регіоном АТР-акцепторного сайту ASK1.

Одержані результати можуть бути використані для подальшої оптимізації інгібіторів з метою покращення активності та селективності інгібування протеїнкінази ASK1.

ОДЕРЖАННЯ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНОГО ЗЛИТОГО ПРОТЕЇНУ SPA-CBD₂ ТА ВСТАНОВЛЕННЯ ЙОГО ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ХАРАКТЕРИСТИК

О. Б. ГОРБАТЮК¹, М. В. ЦАПЕНКО², М. В. ПАВЛОВА²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
²Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України, Київ;
e-mail: gorbatiuk@ukr.net

Сучасний рівень технологій рекомбінантних ДНК дозволяє клонувати цільові гени і забезпечувати їхню експресію в бактеріях *Escherichia coli*. На сьогодні широко використовуються одержані в бактеріях протеїни або пептиди, які здатні селективно зв'язувати константні домени (Fc-домени) молекул імуноглобулінів. Серед них найвживанішим є стафілококовий протеїн А (SPA), який входить до складу клітинної стінки *Staphylococcus aureus*. SPA складається з 5 високотомологічних доменів, кожен з яких здатний до специфічного зв'язування з Fc-доменами імуноглобулінів різних видів ссавців.

У разі створення афінних сорбентів для очищення імуноглобулінів на основі SPA його іммобілізацію здійснюють хімічним способом на BgCN-активованій матриці. Така іммобілізація є неспецифічною і вимагає суттєвих затрат на реагенти, відповідно собівартість таких сорбентів є високою. Генно-інженерне злиття ДНК-послідовності SPA з послідовністю целюлозо-зв'язувального домену (CBD), виділеного із целюлозолітичного комплексу *Clostridium thermocellum*, забезпечує біоафінне зв'язування злитого протеїну з вуглеводневим остовом целюлози через домен CBD, орієнтовану іммобілізацію молекули протеїну на матриці та

експонування центрів зв'язування SPA в положення, оптимальне для взаємодії з Fc-доменами імуноглобулінів.

Метою роботи було створення генно-інженерного злитого протеїну на основі SPA та двох целюлозо-зв'язувальних доменів (SPA-CBD₂) та встановлення його функціональних характеристик.

У роботі використовували наступні методи: конструювання рекомбінантних ДНК, полімеразну ланцюгову реакцію, електрофорез ДНК, секвенування ДНК, культивування і трансформацію бактерій, експресію протеїнів, електрофорез протеїнів, виділення протеїнів, афінну хроматографію.

Проведено інтерактивний дизайн молекули рекомбінантного протеїну SPA-CBD₂ та створено плазмідний вектор для його експресії у бактеріях *E. coli*. Визначено умови, які забезпечують суперпродукцію SPA-CBD₂ в *E. coli* в розчинному стані. Показано функціональну активність протеїнів-партнерів злитого протеїну SPA-CBD₂ та його стабільність в умовах тривалого зберігання. Встановлено перспективність використання одержаного гібридного протеїну для створення хроматографічного біоафінного сорбенту для очищення імуноглобулінів деяких видів ссавців.

УДК 577.218+581.141

ВИЯВЛЕНІ ЗМІНИ ПРОТЕОМУ ЗРІЛОГО НАСІННЯ ДОЗВОЛЯЮТЬ ПРИПУСТИТИ АДАПТАЦІЮ РОСЛИН ДО ЧОРНОБИЛЬСЬКОГО СЕРЕДОВИЩА

М. ДАНЧЕНКО^{1,2}, К. КЛУБІЦОВА², Н. РАШИДОВ¹, М. ХАЙДУХ²

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ;

²Інститут генетики та біотехнології рослин Словацької академії наук, Нітра;
e-mail: danchenko@nas.gov.ua

Вибух на Чорнобильській атомній електростанції спричинив найстрашнішу ядерну катастрофу в історії людства. Після аварії минуло вже 24 роки, але прилеглі території залишаються істотно забрудненими довгоживучими радіоізотопами. Незважаючи на складні умови середовища, представники локальних екосистем змогли вижити і успішно відтворюватись протягом багатьох поколінь. Метою нашого дослідження стало з'ясування механізмів адаптації рослин до постійно підвищеного фону іонізуючої радіації за допомогою високоефективного протеомного підходу. Таким чином, ми намагаємося створити системний огляд метаболічних шляхів, потенційно критичних для виживання у шкідливих мутагенних умовах.

У роботі використовували сою (*Glycine max* (L.) Merr. var. *Soniachna*) і льон (*Linum usitatissimum* L. var. *Kyivskiy*), вирощені на контрольних та забруднених (містять у 163 рази та 244 разів більше ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr відповідно) ділянках поблизу Чорнобиля. Протеїни зрілого насіння екстрагували фенолом із наступною преципітацією ацетатом амонію. Потім одержані екстракти розділили двовимірним електрофорезом у поліакриламідному гелі. Після сканування гелі кількісно аналізували програмними засобами. Усі виявлені протеїнові точки, котрі експресуються по-різному, досліджували за допомогою тандемної мас-спектрометрії. Для ідентифікації отримані спектри фрагментації аналізували програмою Protein

Lynx Global Server v. 2.0 проти бази рослинних протеїнових послідовностей, отриманої із Uniprot.

Загалом 9,2% із 698 виявлених та кількісно оцінених протеїнових точок показали різний рівень експресії у сої і лише 4,9% із 720 у льону. У разі дослідження сої найбільше ідентифікованих протеїнів представляли функціональні класи запасних та захисних протеїнів. Зокрема варто виділити підвищену в дослідних рослин кількість бетаїн альдегід-дегідрогенази, цистеїнсинтази та кількох ізоформ дегідринів, але знижену кількість ліпоксигенази і кальретикуліну. У свою чергу для льону найбільше протеїнів зміненої експресії містили функціональні категорії, асоційовані із сигналінгом та транскрипцією.

Базуючись на ідентифікованих протеїнах, що експресувались по-різному, ми пропонуємо робочу модель адаптації рослин сої, яка включає наступні блоки: 1) неспецифічну адаптацію, подібну до реакції на дію важких металів; 2) специфічний захист від радіаційного ураження; 3) мобілізацію запасних протеїнів насіння. У разі з льоном ми припускаємо, що насіння сформоване в умовах забрудненого радіонуклідами середовища захищається від хронічного опромінення завдяки: 1) змінам кількості протеїнів багатьох сигнальних каскадів; 2) загальним зниженням метаболічного потоку через секреторний шлях. Отже, нам вдалося виявити переважно видоспецифічні захисні реакції.

УДК 577.112.7:576.32/36:616-006

TKS4 – NEW RUK/CIN85 INTERACTION PARTNER

D. DVORNIKOV^{1,2}, L. DROBOT², M. J. REDOWICZ¹, S. HAVRYLOV¹

¹*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences;
e-mail: danreks@gmail.com*

Tks4 is a phospho-homology (PX) and Src homology 3 (SH3) domain-containing adaptor protein and a Src kinase substrate. In Src-transformed fibroblasts Tks4 supports formation of podosomes (Buschman et al., 2009) - actin-rich membrane protrusions that share many features with invadopodia of aggressive cancer cells. Proteolytic activities of either invadopodia or podosomes allow cells to degrade extracellular matrix and infiltrate surrounding tissues.

Now we have identified Tks4 as a novel interaction partner of Ruk/CIN85. Tks4 protein contains several potential consensus sequences for SH3 domains of Ruk/CIN85 and is effectively recruited by each of the three SH3 domains of this

adaptor *in vitro*. Initial structure-function analysis indicates that the region of Tks4 responsible for interaction with Ruk/CIN85 is located between third SH3 domain and proline-rich region of this protein. In addition, partial colocalization between Tks4 and Ruk/CIN85 is revealed in HeLa cells.

By further experiments we plan to confirm biological significance of detected interaction between two studied proteins *in vivo*. Because Ruk/CIN85 is a crucial component of invadopodia (Nam et al., 2007) we speculate that Ruk/CIN85-Tks4 complex may function as a molecular platform required for biogenesis of these invasive structures and hence may serve an attractive target for anti-metastatic therapy.

УДК 57.084.1, 57.088.1

ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ПРОТЕИНОВЫХ ФРАКЦИЙ У ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ СЫВОРОТКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

О. В. ЗВЯГИНЦЕВА¹, Е. М. КЛИМОВА²

¹Национальный технический университет «ХПИ», Харьков, Украина;

²ГУ «Институт общей и неотложной хирургии АМН Украины», Харьков;
e-mail: o_zvyagintseva@mail.ru

Иммунизация экспериментальных животных наряду с антителообразованием может приводить к синтезу низкомолекулярных стрессовых протеинов. Также в результате регуляции иммунофизиологических процессов в организме экспериментальных животных может происходить частичный катаболизм, синтезируемых иммуноглобулиновых антител, с последующим образованием и синтезом *de novo* стрессовых, адапторных протеинов и протеинов острой фазы, которые имеют определенную диагностическую значимость. Целью данной работы было исследование изменения соотношения протеиновых фракций и показателей гуморального иммунитета в сыворотке крови крыс, иммунизированных миастогенной сывороткой, полученной от больных с аутоиммунной миастенией.

Материалом служили лабораторные крысы-самцы породы Вистар в возрасте 1,5 месяца: 1 группа – контрольная группа интактных животных; 2 группа – животные, иммунизированные сывороткой крови больных, содержащей цитотоксические факторы. Исследование циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) проводили на спектрофотометре СФ-46. Процентное соотношение протеиновых фракций сыворотки экспериментальных животных определяли с помощью электрофореза на ацетат-целлюлозной мембране и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Обнаружено достоверное увеличение ЦИК в обеих группах

иммунизированных животных по сравнению с соответствующими контрольными группами.

С помощью электрофореза на ацетат-целлюлозной мембране показано, что соотношения протеиновых фракций у животных после иммунизации изменяется. Установлено достоверное уменьшение альбуминовой и увеличение γ -глобулиновой фракции у иммунизированных животных по сравнению с контрольными группами, что свидетельствует об усилении иммунных процессов. Количество протеинов острой фазы, α 1-глобулинов достоверно уменьшается, а α 2-глобулино достоверно увеличивается по сравнению с контрольной группой.

Электрофорез в ПААГ позволил более дискретно разделить протеины (до 10 фракций). На электрофореграмме протеинов сыворотки крови в ПААГ отмечены дополнительные фракции низкомолекулярных протеинов. У иммунизированных животных достоверно увеличились две низкомолекулярные фракции протеинов (М 30 и 20 кДа по сравнению с эталонным маркером).

Таким образом, во-первых, иммунизация животных миастогенной сывороткой приводит к изменению показателей гуморального иммунитета и соотношения протеиновых фракций. Во-вторых, после иммунизации в крови увеличивается содержание низкомолекулярных фракций, которые могут представлять группу стрессовых протеинов.

УДК 616.72-018.3:615361.018.5.013.8:57.043

НОРМАЛИЗАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КРОВИ ПОСЛЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ ХРЯЩА У КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ КОРДОВОЙ КРОВИ

Е. Г. ИВАНОВ, А. К. ГУЛЕВСКИЙ

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

На основании биохимических исследований хрящевой ткани ранее нами было показано положительное действие низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции кордовой крови (ФКК) коров на репаративный процесс в суставном хряще. Однако, актуальной задачей биологии и медицины является также стабилизация метаболизма на уровне организма. Учитывая структурно-функциональные особенности травмированного хряща, одну из ключевых ролей в состоянии организма играет: 1) динамика воспалительного процесса; 2) интенсивность мембранного транспорта основных ионов — Na^+ , K^+ и Ca^{2+} ; 3) содержание гормонов, ответственных за синтез компонентов хрящевой ткани, а также содержание эндотелина в крови. Таким образом, целью настоящей работы являлось изучение нормализации биохимического состава крови у крыс после механической травмы суставного хряща под влиянием ФКК.

ФКК получали методом ультрафильтрации. Механическое повреждение хряща осуществляли наконечником бормашины. Содержание электролитов, гормонов, эндотелина, с-реактивного протеина и хондроитинсульфатов в крови определяли биохимическими методами и с помощью анализатора электролитов АЭК-01.

Воспалительный процесс, о котором можно судить по содержанию с-реактивного белка и хондроитинсульфатов в крови крыс, получавших инъекции ФКК, отсутствовал на протяжении всего наблюдения в отличие от животных, не получавших лечения.

Концентрация ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} в крови животных, получавших инъекции ФКК на протяжении всего наблюдения, выше (в 1,37 раза), чем у животных, не получавших лечения и к концу наблюдения идентична обмену электролитов у здоровых животных.

Показано, что к 28-м суткам наблюдения концентрация кортизола и трийодтиронина (действие которого, как показывают данные, синергично с соматотропным гормоном) в крови крыс, получавших инъекции ФКК, выше, чем у не получавших лечения в 2,4 и в 1,53 раза соответственно и в то же время идентично таковому у здоровых животных. Содержание паратиреоидного гормона в крови животных, получавших лечение к концу наблюдения идентично содержанию такового у здоровых животных. Установлено также, что концентрация эндотелина в крови животных, получавших ФКК, в 1,28 раза выше к 28-м суткам регенерации хряща, чем у здоровых животных, чего не наблюдается у животных, не получавших лечения.

Таким образом, курс инъекций ФКК обеспечивает высокий уровень репаративной регенерации хряща тем, что полностью нивелирует уровень воспаления, стабилизирует электролитный обмен, стимулирует синтез эндотелина — маркера синтеза коллагена, а также положительно корректирует гуморальную составляющую репаративного процесса в хрящевой ткани.

DIRECT AND REVERSED FUNCTION OF Na⁺-DEPENDENT GLUTAMATE TRANSPORTERS IN BLOOD PLATELETS*L. A. KASATKINA^{1,2}, T. A. BORISOVA¹*¹*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*²*Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;**e-mail: ludmilka.kasatkina@gmail.com*

Blood platelets contain Na⁺-dependent glutamate transporters similar to those located in the plasma membrane of neurons. The aim of the research was to analyze comparatively direct and reversed transport of glutamate in rabbit blood platelets and rat brain nerve terminals (synaptosomes). K_m value of the Na⁺-dependent L-[¹⁴C]glutamate uptake consisted of $36 \pm 8 \mu\text{M}$ for platelets and $11 \pm 2 \mu\text{M}$ for nerve terminals. V_{max} was three orders lower for platelets ($5.2 \pm 1.3 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of proteins) as compared with synaptosomes ($12.5 \pm 3.2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ of proteins).

Applying the drug 4-aminopyridine (4-AP), which blocks voltage-dependent potassium conductance, and high-KCl, we have demonstrated dose-dependent depolarization of the plasma membrane of platelets that was registered as an increase in the fluorescence of the potential-sensitive fluorescent dye rhodamine 6G.

The initial velocity of L-[¹⁴C]glutamate uptake ($10 \mu\text{M}$) in platelets was decreased by 14% during 2 mM 4-AP- and by 20% during 35 mM KCl-evoked depolarization and was equal to $1.2 \pm 0.09 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein in control, $1.02 \pm 0.08 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein in the presence of 4-AP and $0.96 \pm 0.08 \text{ pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein in the presence of high-KCl. Confocal laser scanning microscopy and flow cytometry revealed that these changes in glutamate uptake were not a result of platelet aggregation/activation.

Depolarization of the synaptosomal plasma membrane with 4-AP and 35 mM KCl decreased the initial velocity of $10 \mu\text{M}$ L-[¹⁴C]glutamate uptake by 16% and 50%, respectively, that consisted of $3.0 \pm 0.3 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein in control, $2.53 \pm 0.2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ for 4-AP and $1.52 \pm 0.2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein for high-KCl.

Glutamate transporter reversal during depolarization of the plasma membrane was also assessed comparatively in platelets and synaptosomes using glutamate dehydrogenase assay or applying L-[¹⁴C]glutamate. It was shown that in contrast to nerve terminals where Ca²⁺-independent L-[¹⁴C]glutamate release was equal to $14 \pm 2\%$ of total label, it was not registered in platelets.

Thus, depolarization of the plasma membrane of platelets resulted in a decrease in direct transport of glutamate but did not cause reverse of glutamate transporters. Weak glutamate uptake during depolarization of the plasma membrane might have considerable consequences for platelets *per se* (and thus for haemostatic system) and glutamate homeostasis in the CNS. This malfunction of glutamate transporters has to take place under: (1) the conditions of pseudohyperkalemia or hyperkalemia, i.e. activation and clotting of platelets, haemolysis, leucocytosis, acute renal failure, hypofunction of adrenal cortex, lack of aldosterone, stroke, trauma; (2) depolarization of the plasma membrane of platelets during their activation by ADP, thrombin, platelet-activating factor.

5'-НУКЛЕОТИДАЗНА АКТИВНІСТЬ У ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ ІЗ КАРЦИНОМОЮ ГЕРЕНА, ТРАНСПЛАНТОВАНОЮ НА ФОНІ МАЛИХ ДОЗ ОПРОМІНЕННЯ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. БУЧКОВСЬКА

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
e-mail: ivannabuchkovska@mail.ru*

Опромінення малими дозами іонізуючої радіації не приводить до загибелі організму, проте здатне модифікувати різні клітинно-тканинні процеси, збільшуючи вірогідність онкологічного ризику у віддалені строки. На особливу увагу заслуговує вивчення росту неоплазми та впливу злоякісно трансформованих клітин на органи пухлиноносія в умовах попереднього фракціонованого опромінення організму малими дозами. Функціональний стан печінки, як основного гомеостатичного органа, до певної міри відображає стан організму пухлиноносія за цих умов. Одним із критеріїв оцінки функціонального стану печінки вважається активність 5'-нуклеотидази.

Мета роботи – дослідити 5'-нуклеотидазну активність у гепатоцитах щурів із карциномою Герена, трансплантованою на фоні попереднього фракціонованого рентгенівського опромінення малими дозами радіації.

Для виділення гепатоцитів проводили двоетапну перфузію печінки через нижню порожнисту вену спочатку безкальцієвим розчином Хенкса, після чого перфузію продовжували 0,05%-ю колагеназою в розчині Хенкса з 5 мМ CaCl₂ (рН 7,4; 37 °С). Кількість клітин підраховували під мікроскопом у камері Горяєва з використанням 0,4%-го розчину трипанового синього. Життєздатність клітин становила 96 ± 2%.

5'-Нуклеотидазну активність розраховували як різницю між кількістю P_i, одержаними під час гідролізу АМР та інкубації з β-гліцери-

фосфатом для усунення похибки через неспецифічний гідроліз АМР лужною фосфатазою.

Результати досліджень показали, що попереднє опромінення організму на латентній стадії пухлинного росту призводить до вірогідного підвищення 5'-нуклеотидазної активності, яке нівелюється на термінальних етапах канцерогенезу. Дані літератури свідчать про чутливість 5'-нуклеотидази до дії активних кисневих метаболітів та можливість інактивації ензиму за їхньою участю. Це дає змогу припустити, що однією з можливих причин пригнічення досліджуваної ензиматичної активності є продукування активних форм кисню та розвиток у клітинах оксидативного стресу, який, як відомо, має місце за дії іонізуючої радіації. Оскільки 5'-нуклеотидаза (екто-5'-нуклеотидаза) є ліпідозалежним мембранним ензимом, то збільшення мікрів'язкості і зміна ліпідного складу мембран в умовах росту неоплазми, також можуть бути причиною пригнічення її активності. Метаболічні перебудови, зумовлені дією випромінювання, пов'язані, насамперед, із посиленням використання енергетичних ресурсів клітин для забезпечення репарації та розвитку енергозалежних апоптичних процесів.

Отже, попереднє фракціоноване рентгенівське опромінення малими дозами радіації призводить до зниження 5'-нуклеотидазної активності в період інтенсивного росту карциноми Герена та на термінальних етапах онкогенезу.

УДК 577(112+354.9)+57(085.2+086.164)+ 616-006.6

ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНОЇ РОЗЧИННОЇ ФОРМИ НВ-EGF ЛЮДИНИ ТА ЙОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ПОХІДНИХ І ПЕРСПЕКТИВИ ЇХНЬОГО ЗАСТОСУВАННЯ

Н. В. КОРОТКЕВИЧ, А. М. ГОНЧАРЕНКО, А. Ю. ЛАБИНЦЕВ

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

Гепаринзв'язувальний EGF-подібний фактор росту – НВ-EGF (Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor) є представником родини епідермальних факторів росту, який синтезується у вигляді мембранозаякореного попередника про-НВ-EGF, здатного утворювати розчинну форму фактора (sНВ-EGF) за дії на нього металопротеїназ типу ADAM. Рецепторами для sНВ-EGF є гомодимери рецепторів родини епідермальних факторів росту першого (HER-1, Human Epidermal growth factor Receptor) та четвертого типу (HER-4), а також їхні гетеродимери із HER-2 та HER-3. Зв'язування sНВ-EGF з рецептором приводить до активації сигнальних шляхів MAPK та PI-3K, які відіграють вирішальну роль у регулюванні проліферації клітин та інгібуванні апоптозу, що є особливо важливим за злоякісної трансформації.

Високий рівень експресії рецепторів родини HER було виявлено на клітинах багатьох типів пухлин епітеліального походження, що може свідчити про їхню важливу роль у патогенезі пухлин цього типу. Тому оцінка експресії рецепторів родини HER на клітинах може виявитись важливою для діагностики злоякісної трансформації їх та вибору оптимального шляху протиракової терапії.

Метою цієї роботи було одержати рекомбінантний sНВ-EGF та флуоресцентні похідні на основі його повнорозмірної та вкороченої форми (без гепаринзв'язувальної ділянки) і посиленого зеленого флуоресцентного протеїну (EGFP), а також перевірити можливість використання одержаних похідних для оцінки експресії рецепторів родини HER (а саме HER-1 та HER-4) на різних типах клітин.

Внаслідок проведеної роботи одержано рекомбінантний sНВ-EGF людини та його флуоресцентні похідні, а також оптимізовано умови їхнього виділення та очистки. Попередні дослідження біологічної активності рекомбінантного sНВ-EGF підтвердили його здатність стимулювати проліферацію та міграцію фібробластів. За допомогою методів конфокальної мікроскопії та проточної цитофлуориметрії підтверджено здатність одержаних флуоресцентних похідних взаємодіяти з поверхнею клітин.

Отже, одержаний рекомбінантний протеїн sНВ-EGF та його флуоресцентні похідні можуть бути використані для дослідження механізмів реалізації біологічної активності НВ-EGF, його участі у процесах диференціації та міграції, а також для оцінки експресії рецепторів HER на клітинах з метою виявлення злоякісної трансформації їх.

СТИМУЛЯЦІЯ НЕЙРОСЕКРЕТОРНОГО ПРОЦЕСУ ЗА АКТИВАЦІЇ ПРЕСІНАПТИЧНИХ ГЛУТАМАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ*О. О. КРУПКО, А. С. ТАРАСЕНКО**Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: olya_krupko@mail.ru*

Активація пресинаптичних рецепторів впливає на ефективність синаптичної передачі, забезпечуючи сталу модифікацію міжнейронних взаємодій. Такі зміни відіграють ключову роль у формуванні короткотривалої і довготривалої синаптичної пластичності. Модуляція вивільнення нейромедіатора відбувається за рахунок впливу на потенціал пресинаптичної мембрани та/або активації G-протеїнзалежних шляхів сигнальної трансдукції.

Наша робота присвячена дослідженню механізмів, що лежать в основі впливу пресинаптичних глутаматних рецепторів на нейротрансмісію. В ізольованих нервових терміналях досліджували процеси, індуковані глутаматом, каїнатом та НМДА (агоністами глутаматних рецепторів), аналізуючи наступні параметри: вивільнення гама-аміномасляної кислоти (ГАМК) за допомогою міченої [³H]-ГАМК та рівень протонного градієнта синаптичних везикул методом рН-чутливого флуоресцентного зонда акридину оранжевого. Тестування цих процесів дозволяє оцінити залучення синаптичних везикул до процесу вивільнення нейротрансмітера та здатність везикул акумулювати його.

Проведені дослідження показали, що активація глутаматних рецепторів на ГАМК-ергічних терміналях приводить до стимуляції секреторного процесу – вивільнення ГАМК. Рівень стимуляції залежить від концентрації глутамату. Такий саме дозозалежний ефект

спостерігається у разі використання агоністу каїнатного/АМПА типу глутаматних рецепторів – каїнату. Вивільнення медіатора може відбуватись із везикулярного пулу за рахунок екзоцитозу та із цитозольного внаслідок реверсної роботи транспортерів ГАМК. Визначення механізму вивільнення медіатора було досягнуто в експериментах із тестування секреторної відповіді у присутності NO 711, блокатора транспортерів ГАМК. Відсутність впливу блокатора транспортерів на секреторну відповідь підтверджує припущення щодо екзоцитозної природи ефекту.

Висновок щодо залучення синаптичних везикул у процес секреції підтверджується експериментами з вивчення змін протонного градієнта синаптичних везикул під час активації пресинаптичних глутаматних рецепторів. Встановлено, що у відповідь на аплікацію глутамату розвивається складний двофазний процес, кожна фаза якого виявляє різну залежність від позаклітинного Ca²⁺ та Na⁺. Досліджувався також вплив позаклітинного Ca²⁺ та Na⁺ на розвиток відповіді у разі додавання специфічних агоністів (каїнату і НМДА). Показано, що джерелом надходження йонів натрію є, головним чином, канали іонотропних глутаматних рецепторів, оскільки додавання специфічних інгібіторів потенціалзалежних Na⁺-каналів та глутаматних транспортерів, ТТХ (тетродотоксину) і ТВОА (p-threo-benzyl-aspartate) відповідно не перешкоджає розвитку відповіді.

УДК 577(112+352.46+354.9)+57(085.2+086.164)+616.931

РОЛЬ Т-ДОМЕНУ У ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОМУ ТРАФІКУ РЕКОМБІНАНТНИХ ФРАГМЕНТІВ ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНУ***А. Ю. ЛАБИНЦЕВ, Л. С. БАБИЦЬКА, Н. В. КОРОТКЕВИЧ, А. А. КАБЕРНЮК****Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: lab.andrey@gmail.com*

Дифтерійний токсин (ДТ) є основним фактором патогенності *Corynebacterium diphtheriae* та класичним представником протеїнових бактеріальних екзотоксинів групи АВ. ДТ являє собою дві субодниниці А (SbA) та В (SbB), причому, SbB складається з двох доменів: рецепторзв'язувального (R-домену) та транспортувального (Т-домену). R-домен ДТ взаємодіє з рецептором proHB-EGF на поверхні клітини та зумовлює інтерналізацію комплексу ДТ–proHB-EGF шляхом клатринопосередкованого ендоцитозу. Т-домен у разі зниження рН середовища в ендосомі поступово починає входити в мембрану та опосередковує транспорт SbA до цитозолу клітини. SbA каталізує специфічну реакцію ADP-рибозилування фактора елонгації трансляції 2 евкаріот, що призводить до його інактивації та подальшої зупинки біосинтезу протеїну і загибелі клітини.

Незважаючи на те, що механізм дії ДТ є добре відомим, окремі його етапи досі залишаються мало вивченими. У першу чергу це стосується механізму реалізації транспортної функції Т-домену ДТ. Тому метою цієї роботи було дослідити роль Т-домену у внутрішньоклітинному трафіку ДТ за допомогою рекомбінантних флуоресцентних похідних фрагментів ДТ, а саме R-домену (R-eGFP) та SbB (R-домен разом з Т-доменом) (mCherry-SbB) в експериментах на лінії клітин *Vero* із застосуванням методів проточної цитофлуориметрії та конфокальної мікроскопії.

Результати проточної цитофлуориметрії підтвердили, що обидва флуоресцентних похідних фрагмента ДТ (R-eGFP та mCherry-SbB) специфічно взаємодіють з рецепторами на поверхні клітин лінії *Vero*. Однак, кінетичні криві, що описують цю взаємодію, свідчать про знижену спорідненість R-домену порівняно з SbB до рецепторів на поверхні клітин. Результати конфокальної мікроскопії підтвердили проникнення обох протеїнів всередину клітини. Передінкубація клітин *Vero* з R-eGFP та mCherry-SbB протягом різних проміжків часу дозволила спостерігати поетапно за входженням обох протеїнів всередину клітини та їхнім транспортуванням в певні клітинні компартменти. Загальна схема транспортування R-eGFP та mCherry-SbB виявилась подібною, але транспортування R-eGFP відбувається значно швидше порівняно з mCherry-SbB (45 хв для R-eGFP, тоді як для mCherry-SbB 60–75 хв).

Ми припускаємо, що запізнення у транспортуванні mCherry-SbB порівняно з R-eGFP може бути обумовлене наявністю у складі mCherry-SbB Т-домену, який під час входження в мембрану ендосоми утворює канал і, таким чином, гальмує дозрівання ендосоми. Ймовірно, що затримка дозрівання ендосом є ще однією функцією Т-домену ДТ, яка забезпечує ефективну транслокацію SbA до цитозолу клітини.

БИОИНДИКАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ СЫВОРОТОЧНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНОГО БИОСЕНСОРА

Е. В. ЛАВИНСКАЯ¹, Е. М. КЛИМОВА²

¹Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Украина;

²ГУ «Институт общей и неотложной хирургии АМН», Харьков, Украина;

e-mail: lavinskaya_5@mail.ru

В настоящее время необходима разработка методов селективного определения различных по размеру и функциям органических соединений в биологических жидкостях, например в крови.

Биоиндикационные методы определения цитотоксичности основаны на формировании специфической ответной реакции биологически чувствительной системой, усилением этого сигнала и простой системой регистрации. Учитывая способность биосенсорной системы давать различные ответные реакции, можно предположить, что с ее помощью возможно определение суммарных цитотоксических факторов различной природы в биологических жидкостях. Таким образом, биоиндикация как инструмент скрининг-диагностики является перспективным исследовательским направлением, а биосенсоры могут рассматриваться как универсальные регистраторы цитотоксических соединений различной природы.

Целью работы является проведение биоиндикации суммарной цитотоксичности в сыворотке крови с использованием клеточного биосенсора *Dunaliella viridis* и последующее построение паттернов, характеризующих различные патологические состояния.

Материалом исследования служила биологическая жидкость (сыворотка крови, взятая у доноров с различными патологическими состояниями). В качестве биосенсорной системы использовали синхронизированную культуру одноклеточной водоросли *D. viridis* в возрасте 18–21 день, с концентрацией клеток 15 млн./мл (Божков и др., 2002 г.).

Для оценки цитотоксичности исследуемой сыворотки в лунки планшета вносили в равных объемах биосенсорную тест-систему и исследуемую биологическую жидкость (Климова и др., 2006 г.). После 30-минутной инкубации производили подсчет клеток с изменен-

ными морфо-функциональными свойствами и сравнивали с контролем.

О степени цитотоксичности исследуемой сыворотки судили по изменению морфологических (изменение формы клеток) и функциональных свойств (утрата подвижности) клеточного биосенсора. В результате проведенных исследований выявлены различные соотношения количества измененных клеток в зависимости от патологии.

В качестве сравнения использовали две контрольные группы. Первая контрольная группа включала биосенсорную систему с буфером. Вторая группа контроля – биосенсорная система и сыворотка доноров без патологий.

Наиболее существенные изменения клеток выявлены при внесении сыворотки крови больных циррозом – округлых форм было $73,0 \pm 2,5\%$, а неподвижных клеток – $63,1 \pm 1,7\%$ по сравнению с контролем, где округлых форм было $3,0 \pm 0,5\%$, а неподвижных – $6,0 \pm 0,9\%$.

Наименьшее влияние на биосенсорную систему оказывает сыворотка крови больных с сосудистыми заболеваниями: процент округлых форм здесь составляет $20,8 \pm 2,1\%$, а неподвижных клеток – $33,4 \pm 2,0\%$.

Полученные данные воспроизводились с высокой достоверностью, что позволило расценивать результаты как закономерность. Высокая частота встречаемости некоторых соотношений морфологических и функциональных изменений клеточного биосенсора, специфических для каждого вида патологии, позволила рассчитать определенные паттерны изменения клеток в ответ на цитотоксический сигнал в системе координат. В дальнейшем это позволит использовать свойства представленной биосенсорной системы как скрининговый метод оценки патологического состояния.

УДК: 582.751.42: 621.78

СТІЙКІСТЬ ЛЕКТИНІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО ДО ТЕРМІЧНОЇ ОБРОБКИ

Г. М. ЛЕВЧУК, О. М. ВОЙТОВИЧ

*Запорізький національний університет, Україна;
e-mail: annalevchuck@bigmir.net*

Дослідження структурно-функціональних перебудов клітин рослин під час зміни абіотичних факторів навколишнього середовища у зв'язку із проблемою адаптації рослин до несприятливих зовнішніх умов є достатньо актуальним. Важливу роль в адаптації рослин до різних екологічних факторів відводять лектинам (від латинського *lectus* – зв'язувати).

Відомо, що лектини (не зважаючи на те, що це протеїни) є дуже стійкими до впливу різних хімічних та фізичних чинників, що зумовлює їхню захисну дію в рослинах.

У роботі одержували екстракти лектинів окремих клітинних фракцій (мембран органел, клітинних стінок та цитозолю) 7-добових проростків льону олійного сортів Ціан, Астрал та Золотистий. На екстракти діяли підвищеною (автоклаували при 1 атм протягом 30 хв) та зниженою температурою (заморожували на 24 год при температурі -21°C). Активність лектинів визначали за реакцією гемаглютинації з 2%-им розчином трипсинизованих еритроцитів кролика. Вуглеводну специфічність визначали методом пригнічення вуглеводами реакції гемаглютинації.

Внаслідок досліджень було встановлено, що за термічної обробки лектини, які екстрагували, не тільки не втрачають своєї біологічної активності, а й значно її підвищують. Рівень цього підвищення залежить як від

вихідної активності лектину (сорт льону), так і від клітинної локалізації: чим вище вихідна активність, тим більше її підвищення за дії термічної обробки. Так, після автоклаування спостерігається підвищення у 8–65 000 разів. За низької температури найбільше підвищення активності спостерігається в лектинів клітинних стінок – у 16 000 разів, а найменше – у розчинних лектинів – у 30 разів.

Після термічної обробки у лектинів зберігається основна вуглеводна специфічність, але також з'являється здатність розпізнавати та зв'язувати деякі інші вуглеводи: за дії підвищеної температури – глюкозу (сорт Астрал та Ціан) або мальтозу (сорт Золотистий), а за дії зниженої – глюкозамін.

Значне підвищення активності лектинів під впливом термічної обробки можна пояснити зміною конформації молекули. Ймовірно, що подібні зміни проходять і у природних умовах за дії стресорних факторів, що приводить до підвищення активності лектинів та, як наслідок, до певної перебудови метаболізму.

Встановлено, що за дії жорсткої термічної обробки лектини льону олійного значно підвищують свою активність. При цьому майже не змінюється їхня вуглеводна специфічність. Це може свідчити на користь протекторної дії лектинів під час формування стійкості рослин льону олійного до дії екстремальних температур.

**КАЛІКСАРЕНИ ЯК СПЕЦИФІЧНІ ІНГІБІТОРИ
ПОЛІМЕРИЗАЦІЇ ФІБРИНУ**

*Е. В. ЛУГОВСЬКОЇ¹, Т. А. КОШЕЛЬ¹, П. Г. ГРИЦЕНКО¹, В. І. КАЛЬЧЕНКО²,
С. О. ЧЕРЕНОК², Е. О. КОЛЕСНИК², С. В. КОМІСАРЕНКО¹*

¹*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;*

²*Інститут органічної хімії НАН України, Київ;*

e-mail: Tanya_kow@list.ru

Під час активації системи зсідання крові утворюється ензим тромбін, який перетворює фібриноген у фібрин дезАА, здатний до спонтанної полімеризації за рахунок міжмолекулярного зв'язування комплементарних сайтів «А» з «а». Надалі відбувається утворення протофібрил, перетворення їх у фібрили та в кінцевому рахунку формується тривимірна сітка фібрину – каркас будь-якого тромбу. В останні роки підвищився інтерес до вивчення впливу каліксаренів на біохімічні процеси, оскільки вони здатні впливати на їхній перебіг.

Метою нашої роботи було дослідити вплив каліксаренів, здатних утворювати супрамолекулярні комплекси з амінокислотами та пептидами, на полімеризацію фібрину, а також на зсідання плазми крові людини.

Було показано, що каліксарен С-192, який містить чотири залишки метиленбісфосфонові кислоти та його натрієва сіль – С-145, за даними турбідиметричного аналізу специфічно гальмують полімеризацію фібрину з IC_{50} $0,5 \cdot 10^{-6}$ та $2,5 \cdot 10^{-6}$ М відповідно. Молярне співвідношення каліксарену С-192 до фібрину в середовищі полімеризації при цьому становить 1,7 до 1.

Для виключення можливої інгібуючої дії каліксарену на тромбін чи на сайт зв'язування тромбіну з фібриногеном, досліджено вплив каліксарену С-192 на полімеризацію мономерного фібрину дезААВВ. Дослід показав, що значення IC_{50} у цьому разі складає $1,0 \cdot 10^{-6}$ М, це практично збігається зі значенням IC_{50} для

каліксарену в системі фібриноген–тромбін. Отже, інгібуюча дія каліксарену С-192 здійснюється саме за рахунок його взаємодії з фібрином.

За допомогою трансмісійного електронного мікроскопу встановлено, що каліксарен С-192 інгібує першу стадію полімеризації фібрину – побудову протофібрил з мономерних молекул. За допомогою HPLC показали утворення комплексу С-192 із синтетичним пептидом Gly-Pro-Arg-Pro, який імітує центр полімеризації фібрину «А» (A α 17-19), що залучається у процес формування протофібрил. Отже, інгібуючий ефект С-192 відбувається за рахунок блокування вищезгаданого центру.

Для з'ясування можливості використання каліксаренів як антитромботичних препаратів досліджено інгібуючу дію каліксарену С-192 на зсідання плазми крові людини. З досліду отримано, що С-192 вдвічі знижує протромбінний індекс та вдвічі підвищує частково активований тромбoplastиновий час у нормальній плазмі крові людини при концентрації С-192 $7,0 \cdot 10^{-5}$ та $1,7 \cdot 10^{-5}$ М відповідно.

Попередні дослідження, проведені на здорових статевозрілих мишах, свідчать, що каліксарен С-192 є сполукою середньої токсичності.

Таким чином, вперше показано, що каліксарен С-192 та його натрієва сіль С-145 є специфічними інгібіторами полімеризації фібрину та зсідання плазми крові. Ці сполуки можуть бути використані як основа для розробки нового класу антитромботичних препаратів.

УДК 616.348-002.44-092:(612.015.11+612.015.33)

ПОСИЛЕННЯ ЦИТОПРОТЕКТОРНИХ МЕХАНІЗМІВ ЗА ПОЄДНАНОГО ЗАСТОСУВАННЯ АМАРАНТОВОЇ ОЛІЇ ТА БЛОКАТОРІВ ЦОГ-2 ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ КОЛІТІ

Н. Б. ПАНАСЮК

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна;
e-mail: sklyarov@meduniv.lviv.ua

Відомо, що в умовах виразкового коліту підсилюються процеси ліпопероксидації, зростає активність ензимів NO-синтазної системи і вміст оксиду азоту, а також прозапальних цитокінів у слизовій оболонці товстої кишки (СОТК). Для лікування виразкового коліту застосовують блокатори iNOS, циклооксигенази-2 та 5-ліпооксигенази та різні олії, що містять ω -3, ω -6 та ω -9 ненасичені жирні кислоти.

Метою роботи було дослідити вплив олії амаранту на тлі блокування ЦОГ-2 целекоксибом на цитопротекторні та метаболічні процеси за експериментального ульцерогенного коліту.

Виразковий коліт у щурів ($n = 50$) моделювали введенням 4%-го розчину оцтової кислоти. У гомогенатах СОТК визначали: вміст ТБК-активних продуктів та нітрит-аніону, активність СОД, каталази, cNOS, iNOS та концентрацію L-аргініну у плазмі крові.

Введення 4%-ї оцтової кислоти спричинює розвиток деструктивних ушкоджень СОТК у вигляді виразок, ерозій, масивних крововиливів загальною площею $77,2 \pm 25,1$ мм². Вміст ТБК-активних продуктів зростає у 2,2 раза ($P < 0,001$), активність СОД – на 71% ($P < 0,05$), каталази – на 54% ($P < 0,05$), загальної NOS – в 2,5 раза ($P < 0,001$), cNOS – на 21%, iNOS – у 6,9 раза, вміст NO в СОТК зростає на 64% ($P < 0,05$). Концентрація L-аргініну у плазмі крові знижується на 51% ($P < 0,001$).

За блокування ЦОГ-2 целекоксибом площа структурно-геморагічних ушкоджень

зменшується до $64,2 \pm 19,2$ мм². Активність загальної NOS знижується на 43% ($P < 0,01$), iNOS – на 46% ($P < 0,05$). Вміст ТБК-активних продуктів зменшується на 20% ($P < 0,05$), активність каталази підвищується на 15% порівняно з інтактними тваринами.

Введення олії амаранту спричинює зменшення площі СГУ до $45,4 \pm 20,8$ мм². Активність загальної NOS знижується на 52% ($P < 0,01$), iNOS – на 69% ($P < 0,001$), вміст NO – на 29%; зростає концентрація L-аргініну у плазмі крові на 23%. Вміст ТБК-активних продуктів знижується на 35%, активність каталази – на 27%.

За дії олії амаранту на тлі блокування ЦОГ-2 площа ушкоджень СОТК значно зменшується і становить $37,5 \pm 25,5$ мм² ($P < 0,01$), активність NOS знижується до показників норми, активність iNOS – на 74% ($P < 0,001$). Вміст ТБК-активних продуктів та активність каталази дорівнюють таким показникам в інтактних тварин.

Отже, поєднане застосування олії амаранту та целекоксибу справляє виражений цитопротекторний та протизапальний ефект в щурів з експериментальним виразковим колітом, що супроводжується зниженням активності NO-синтаз та показників оксидативного стресу. Одержані результати дозволяють рекомендувати застосування олії амаранту, що містить високу концентрацію ненасичених жирних кислот, та селективний блокатор ЦОГ-2 целекоксиб для лікування виразкового коліту.

РОЛЬ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk1/CIN85 У РЕАЛІЗАЦІЇ КЛІТИННИХ ЕФЕКТІВ 5 α -ДИГІДРОТЕСТОСТЕРОНУ У КЛІТИНАХ АДЕНОКАРЦИНОМИ МАТКИ ЛЮДИНИ ЛІНІЇ HELA

Г. В. ПАСІЧНИК, О. І. БАСАРАБА, Н. В. КОЗЛОВА, Л. Б. ДРОБОТ

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

Дослідженнями останніх років встановлено, що однією з причин розвитку онкологічних захворювань є порушення функціонування численних сигнальних мереж клітин. Важливими компонентами сигнальних шляхів є адаптерні протеїни, до яких належить SH3-вмісний адаптерний протеїн Ruk/CIN85. Ruk/CIN85 має мультидоменну структуру і через зв'язування з низкою протеїнів-партнерів формує мультимерні комплекси, залучені до таких клітинних відповідей як апоптоз, проліферація, регуляція функціонального стану актинового цитоскелета, інвазія та ін.

Результатами попередніх досліджень, що проводились у лабораторії сигнальних механізмів клітини, виявлено підвищення експресії Ruk/CIN85 у карциномах тіла та шийки матки людини.

Беручи до уваги важливу роль стероїдів у фізіології матки, зокрема андрогенів, було вирішено перевірити їхній вплив на рівень експресії Ruk/CIN85 у клітинах шийки матки людини лінії HeLa.

Для досягнення поставленої мети клітини культивували за стандартних умов за наявності чи відсутності 5 α -дигідротестостерону (ДГТ), лізували і отримували тритон X-100-розчинну фракцію. Потім проводили електрофорез у ПААГ за денатуруючих умов з наступним Вестерн-блот аналізом. Субклітинну локалізацію Ruk1/CIN85 досліджували за допомогою конфокальної мікроскопії.

У ході наших досліджень встановлено, що андрогеновий рецептор (АР) експресується у клітинах лінії HeLa, хоча і на значно нижчому рівні порівняно з таким у клітинах простати лінії LNCaP.

Нам не вдалося виявити зміни у рівні експресії Ruk1/CIN85 за тривалої стимуляції (1, 2, 3 доби) ДГТ. Водночас короткотривала стимуляція (2, 10 і 30 хв) приводила до значного

зростання вмісту Ruk1/CIN85 у тритон X-100-розчинних лізатах клітин, оброблених низькими концентраціями ДГТ (0,1 та 0,01 нМ). Оскільки досліджувані лізати клітин не містять протеїнів, жорстко асоційованих із цитоскелетом і ядерним матриксом, то підвищення вмісту Ruk1/CIN85 внаслідок дії ДГТ можна пояснити перерозподілом цього протеїну у клітині.

Для підтвердження нашого припущення про зміну субклітинної локалізації повнорозмірної форми Ruk1/CIN85 проведено конфокальну мікроскопію. За результатами аналізу нестимульованих клітин виявлено часткову співлокалізацію між повнорозмірною формою Ruk/CIN85 і актином у нестимульованих клітинах лінії HeLa. Після стимуляції ДГТ спостерігається зміна патерну співлокалізації Ruk1/CIN85 і актину з тенденцією до посилення співлокалізації у спеціалізованих зонах у примембранній області і, в деяких випадках, у перинуклеарній зоні.

Дослідження субклітинної локалізації Ruk1/CIN85 і АР показали, що у клітинах, стимульованих ДГТ, збільшується співлокалізація досліджуваних протеїнів порівняно з нестимульованими клітинами.

Методом імунопреципітації показано, що ДГТ індукує утворення сигнальних комплексів, складовими яких є Ruk1/CIN85, АР, p85 α -регуляторна субодиниця PI3-кінази, FAK і клатрин, залежно від часу дії та концентрації гормону.

На основі одержаних результатів щодо впливу ДГТ на субклітинну локалізацію Ruk1/CIN85 та утворення комплексів між Ruk1/CIN85 та АР, p85 α -регуляторною субодиницею PI3-кінази, FAK і клатрином можна припустити, що Ruk1/CIN85 залучений до регулювання швидких ефектів ДГТ у клітинах-мішенях.

УДК 557.152.1+53.087.9:543.553

ЗАСТОСУВАННЯ БАГАТОШАРОВИХ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ АМПЕРОМЕТРИЧНИХ ЕНЗИМОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ОКСИДОРЕДУКТАЗ

Н. С. РОГАЛЬОВА, Т. В. КОВАЛЬЧУК, О. А. БІЛОІВАН, Я. І. КОРПАН

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
e-mail: n_rogaleva@mail.ru*

Вуглецеві нанотрубки (ВНТ) відкрили новий напрям у створенні біосенсорів завдяки своїм унікальним властивостям, а саме надмалими розмірами, стабільній структурі, добрій електропровідності. Можливість модифікації ВНТ активними групами дає змогу іммобілізувати ензими на їхню поверхню, що забезпечує пряме перенесення електрону від активного центру ензиму до електрода. Крім того, у разі використання ВНТ склад амперометричних біосенсорів на основі оксидоредуктаз стає можливим низькопотенціальне визначення пероксиду водню, що дозволяє виключити вплив інтерферентів на відгук сенсора (J. Wang, 2005).

Мета роботи: 1) розробка нових амперометричних біосенсорів на основі триелектродних транзисторів, виготовлених методом трафаретного друку, С220АТ («золоті електроди») (DropSens, Іспанія) та іммобілізованих оксидоредуктаз, а саме, глюкозооксидази (ГОД) (ЕС 1.1.3.4) та холіноксидази (ХОД) (ЕС 1.1.3.17) для визначення глюкози або холіну; 2) дослідження впливу багатошарових вуглецевих нанотрубок (БВНТ) у складі біоселективних мембран на аналітичні характеристики біосенсорів; 3) оптимізація складу біоселективних мембран, аналітичних характеристик біосенсорів та умов проведення вимірювань кожного із субстратів.

Для іммобілізації ензимів використовували методи: а) включення в протеїновий

гель у випарах глутарового альдегіду (ГА), б) карбодіімідний метод, в) електрополімеризація у полі(3,4-етилendioкситіофен)і. Вивчення вольтамперних характеристик електродів та вимірювання амперометричного сигналу здійснювали за допомогою приладу μ Stat 200 (DropSens, Іспанія).

Розроблено та оптимізовано метод іммобілізації ГОД та ХОД разом з БВНТ, модифікованими аміногрупами, на поверхню золотих електродів. БВНТ-NH₂ (2 мг/мл) суспендовані за допомогою ультразвукового оброблення (30 хв) у водному розчині полівінілпіролідону (100 мг/мл). Для іммобілізації 1,7 мкл мембранної суміші (0,05% ензиму, 6% БСА, 2% БВНТ-NH₂ та 5% гліцеролу у 25 мМ фосфатному буфері, рН 7,0) наносили на поверхню робочого електрода та інкубували у випарах ГА протягом 40 хв. Проведено порівняльний аналіз характеристик біосенсорів на основі ГОД та ХОД, іммобілізованих різними методами. Визначені оптимальні умови роботи біосенсорів.

Включення БВНТ-NH₂ до складу біоселективної мембрани поліпшує аналітичні характеристики біосенсорів: збільшує величину сигналу, розширює лінійний діапазон визначення субстрату, а також дає можливість проведення вимірювань у широкому діапазоні робочих потенціалів.

**ВПЛИВ СПОЛУК МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ МОЛЕКУЛЯРНИХ
ДЕТОКСИКАЦІЙНИХ СИСТЕМ У КАРАСЯ *Carassius auratus gibelio* НА ТЛІ
ХРОНІЧНОЇ ДІЇ НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ**

Г. І. ФАЛЬФУШИНСЬКА¹, Л. Л. ГНАТИШИНА¹, О. Б. СТОЛЯР¹, Й. К. НАМ²

¹Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка, Україна;

²Національний університет Пукійонгу, Бусан, Корея
e-mail: halynka.f@gmail.com

Прогнозується, що подальше посилення антропогенного тиску на живі системи призведе до перевищення адаптивної здатності біологічних систем. Розробка методологічних прийомів виявлення меж та механізмів забезпечення цієї здатності необхідна для оцінки ступеня біобезпеки в умовах новітніх екологічних ризиків. Оскільки карась (*Carassius auratus gibelio*) належить до найвитриваліших видів хребетних тварин, метою нашого дослідження було визначити межі та молекулярні механізми толерантності у представників цього виду, адаптованих до різних умов існування, до дії підпорогових концентрацій іонів важких металів.

Карася (самців) із двох місцевостей, умовно чистої (К) та забрудненої (Б), піддавали впливу солей міді (0,005 і 0,05 мг/л Cu^{2+}) та марганцю (0,17 і 1,7 мг/л Mn^{2+}) протягом 14 діб. Оцінювали вміст та металдепонуючу функцію металотіонеїнів (МТ), показники оксидативного стресу (Mn-, Cu- та Zn-супероксиддисмутази і каталази активність, редокс-індекс глутатіону (GSH), інтенсивність пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) та утворення супероксид-аніону), активність біотрансформації (етоксирезорифін-О-діетилази (ЕРОД) та глутатіон-S-трансферази), холінестерази у печінці, а також рівень вітелогенінподібних протеїнів у плазмі крові.

У риб групи Б порівняно з групою К виявлено ознаки перебування у токсичному середовищі: підвищений вміст МТ, знижений редокс-індекс GSH та, особливо, активність

форм СОД (утричі), та інтенсивніше ПОЛ, а також пригнічення холінестеразної активності. Іони металів у риб обох груп спричинюють посилення утворення супероксиданіону, активності ЕРОД та зменшення вмісту GSH без зміни його ступеня окислення. Проте лише у групі К спостерігається значне (у 4–6 разів) зростання вмісту МТ та депонуючої функції їх щодо міді. Відзначено також зменшення пригнічення активності системи антиоксидантного захисту за дії металів, що свідчить про адекватні компенсаторні процеси, спрямовані на детоксикацію їх. У риб групи Б відзначено пригнічення функції МТ та оксидативний стрес, а за дії міді і активізацію вітелогенезу (ендокринні розлади), узгоджено із зростанням у печінці вмісту міді і цинку в недепонованій формі. У разі дії марганцю в риб зафіксовано його нейротоксичність, що свідчить про вичерпання детоксикаційних можливостей МТ.

Отже, оцінка ефективності металдепонуючої функції МТ карася в умовах додаткового навантаження іонами металів у підпорогових концентраціях дозволяє оцінити ступінь хронічного навантаження на організм у природних умовах існування та прогнозувати здатність до адаптації у разі дії несприятливих чинників.

Робота виконана за підтримки МОН України в межах НДР № М/256-2008, № М/567-2009 та Західноукраїнського біомедичного центру.

УДК 579.69 + 577.112

**ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ІМУНОКОН'ЮГАТИ НА ОСНОВІ
ОДНОЛАНЦЮГОВИХ АНТИТІЛ***М. В. ЦАПЕНКО¹, А. І. ФЛЯК², О. Б. ГОРБАТЮК², М. В. ПАВЛОВА³**¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;**²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;**³Інститут генетичної та регенеративної медицини АМН України, Київ;
e-mail: mtsapenko@ukr.net*

Антитіла, кон'юговані з ензимами або флуоресцентними маркерами, широко використовують у різних видах імуноаналізу в медичній та науковій практиці. Попит на них постійно зростає, оскільки імунологічні методи є незамінними для детекції багатьох видів біологічно активних сполук. Кон'югацію антитіл з маркерами традиційно здійснюють шляхом їхнього хімічного об'єднання. Але це є тривалим та високозатратним процесом, тому такі кон'югати мають дуже високу вартість.

У той же час генно-інженерні технології дозволяють клонувати гени евкаріотів, проводити їхню химеризацію з іншими протеїнами-партнерами на рівні послідовностей ДНК та забезпечувати високоефективну експресію їх в бактеріях *E. coli*. Зважаючи на це, привабливою альтернативою існуючому способу одержання імунореагентів є створення генно-інженерних кон'югатів шляхом химеризації рекомбінантних фрагментів антитіл з маркерними протеїнами.

Метою роботи було створення генно-інженерних імунокон'югатів на основі одержаних нами раніше scFv і таких маркерних протеїнів, як червоний флуоресцентний протеїн mCherry і бактеріальна лужна фосфатаза (ВАР), а також дослідження можливості їхнього використання для імунодетекції.

У роботі використано наступні методи: конструювання рекомбінантних ДНК, ПЛР,

електрофорез ДНК і протеїнів, секвенування ДНК, ELISA, імуноблотинг, виділення і хроматографічне очищення протеїнів, флуоресцентна мікроскопія.

Як флуоресцентний протеїн-партнер ми обрали червоний флуоресцентний протеїн mCherry. Проведено інтерактивний дизайн молекул рекомбінантних протеїнів та створено плазмідні вектори для експресії ScFv-mCherry в бактеріях *E. coli*. Оптимізовано умови експресії цього протеїну і показано, що його вихід становить більше 500 мг/л культури. Запропоновано спосіб суперпродукції ScFv-mCherry в *E. coli* та виділення їх в очищеному та розчинному стані. Імунохімічними та імунофлуоресцентними методами показано збереження функціональної активності обох протеїнів-партнерів та перспективність їхнього використання для імунофлуоресцентного аналізу.

Таким чином, проведено спрямований мутагенез ВАР для одержання ензиму з підвищеною каталітичною активністю. Створено рекомбінантні плазмідні вектори для експресії химерного протеїну ScFv-ВАРmut в *E. coli*. Цей протеїн продукувався в бактеріях і накопичувався в периплазмі та культуральній рідині. Показано функціональну активність обох доменів ScFv-ВАРmut. Продемонстровано можливість застосування імунокон'югатів ScFv-ВАРmut для ELISA, Вестерн-блотингу та імуноцитохімії.

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПОНОВАНОСТІ В β N-ДОМЕНУ У ПРОЦЕСІ ПЕРЕТВОРЕННЯ ФІБРИНОГЕНУ У ФІБРИН

В. О. ЧЕРНИШЕНКО

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

Вивчення ролі послідовності В β N-домену (В β 1-53) в полімеризації фібрину, протеїн-протеїнових та протеїн-клітинних взаємодіях ускладнене значною структурною рухливістю цієї ділянки (Doolittle, 2000, Pechik, 2006).

З метою оцінки експонованості окремих фрагментів В β N-домену в молекулах фібриногену та фібрину ми дослідили доступність В β (1-53)-послідовності для гідролізу фібриногеназою із отрути *Echis multisquamatis*. Кінетичні параметри розщеплення фібриногеназою визначали за швидкістю утворення продуктів гідролізу R23-24 пептидного зв'язку. За спорідненістю фібриногенази до субстрату характеризували ступінь експонованості цього зв'язку в В β N-доміні.

Спорідненість ензиму до субстрату та ефективність його дії визначали за кінетичними параметрами реакції гідролізу: K_m , k_{cat} та k_{cat}/K_m . Кінетичні криві будували за результатами денситометрії електрофореграм гідролізатів фібрин(оген)у фібриногеназою у програмі Totallab TL100. Досліджували кінетику гідролізу фібриногеназою нативного фібриногену, полімерного та мономерного дезАА фібрину.

У разі гідролізу фібриногеназою нативного фібриногену одержали $K_m = 8,0$ мкМ, $k_{cat} = 0,13$ с⁻¹, $k_{cat}/K_m = 0,016$ (мкМ·с)⁻¹; мономерного дезАА фібрину (у присутності GPRP, що повністю інгібував полімеризацію) $K_m = 9,6$ мкМ, $k_{cat} = 0,08$ с⁻¹, $k_{cat}/K_m = 0,0083$ (мкМ·с)⁻¹; полімерного дезАА фібрину $K_m = 60$ мкМ, $k_{cat} = 0,041$ с⁻¹, $k_{cat}/K_m = 0,0007$ (мкМ·с)⁻¹.

Оскільки у фібрилах полімерного дезАА фібрину для гідролізу доступні лише молекули фібрину, що знаходяться на їхній поверхні, то

для оцінки кінетичних параметрів ми розраховували їхню концентрацію. Приймаючи діаметр фібрили за 85 нм (Weisel, 1986), діаметр перерізу циліндричної молекули фібрину за 6,5 нм (Hall, 1959) та припускаючи, що щільність молекул фібрину у фібрилі незмінна на всьому перерізі, відсоток доступних для гідролізу у фібрилі молекул фібрину становить 13,7% від загальної концентрації дезАА фібрину. Оскільки а діапазоні вихідних концентрацій фібриногену від 1,4 до 4 мкМ, використаних у наших дослідженнях, товщина фібрил суттєво не змінюється (Blombdsk, 1989), то реальні кінетичні параметри гідролізу полімерного дезАА фібрину становитимуть $K_m = 8,2$ мкМ, $k_{cat} = 0,041$ с⁻¹, $k_{cat}/K_m = 0,005$ (мкМ·с)⁻¹.

Таким чином, константа специфічності (k_{cat}/K_m) реакції гідролізу дезАА фібрину фібриногеназою зменшується вдвічі для мономерного дезАА фібрину і втричі – для полімерного дезАА фібрину порівняно з такою для фібриногену. Ці дані вказують на конформаційні зміни в ділянках NB β -домену, прилеглих до R23-24 пептидного зв'язку, що знижують швидкість його розщеплення у процесі перетворення фібриногену на дезАА фібрин та його наступній полімеризації. Ці зміни можуть бути пов'язані з відходом α C-доменів, сполучених з фібринопептидами В або ж із залученням ділянок В β N-домену у взаємодію з D-регіоном молекули фібрину другої нитки протофібрили, що узгоджується з даними Budzynski, 1990 та Lugovskoy, 2007. Незмінна K_m гідролізу фібриногеназою N-кінцевої ділянки В β -ланцюгів фібриногену в усіх трьох випадках вказує на стабільність структури цієї послідовності, можливо, завдяки утворенню нею мікродоміну (Pandya, 1985).

УДК 616.345-092:[612.015.113+612.015.14]-085.356-092.9

**ВПЛИВ ВІТАМІНУ Е НА ЗМІНИ АКТИВНОСТІ NO-СИНТАЗ
У СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ТОВСТОЇ КИШКИ ЩУРІВ
В УМОВАХ БЛОКУВАННЯ iNOS ЗА СТРЕСУ***Н. Р. ШАМРО**Рівненський державний гуманітарний університет, Україна;
e-mail: nat-shamro@yandex.ru*

Вітамін Е бере участь в антиоксидантних та цитопротекторних механізмах слизової оболонки товстої кишки (СОТК). Його дія має прямий та опосередкований антиоксидантний ефект, який включає вплив на систему L-аргінін/NO-синтази/NO. Як відомо, за стресу активність NO-синтази СОТК зростає, проте вплив одночасної дії вітаміну Е та аміногуанідину (блокатора iNOS) на активність NO-синтази (NOS) у СОТК за стресу вивчено недостатньо.

Дослідження проводили на 48 білих щурах-самцях з масою тіла 180–220 г. Стрес моделювали шляхом інтраперитонеального введення адреналіну (2 мг/кг). Аміногуанідин (20 мг/кг) і вітамін Е (150 мг/кг) вводили внутрішньом'язово за півгодини до введення адреналіну. У гомогенаті СОТК визначали активність NO-синтази, вміст нітританіону, у плазмі крові – концентрацію L-аргініну.

У СОТК за дії адреналіну спостерігається зростання активності загальної NOS на 80% ($P < 0,05$), активність iNOS підвищується у 4,4 раза ($P < 0,05$), активність cNOS не змінюєть-

ся, вміст NO підвищується на 79% ($P < 0,05$). Концентрація L-аргініну знижується на 22,8% ($P < 0,05$). За одноразового введення вітаміну Е на фоні адреналіну відбувається зменшення вмісту нітрит аніону на 38% ($P < 0,05$), зниження загальної активності NO-синтази на 34%, активності iNOS – на 36%. Активність cNOS за дії вітаміну Е зменшується на 28% порівняно із впливом адреналіну. Концентрація L-аргініну у плазмі крові зростає на 59%. Дія вітаміну Е на фоні блокування iNOS аміногуанідином порівняно із впливом вітаміну Е на фоні стресу призводить до незначного зростання активності cNOS, в той же час активність iNOS та вміст NO знижується на 20% ($P < 0,05$).

Встановлено, що введення шурам вітаміну Е на фоні стресу знижує активність NO-синтази, вміст нітрогену оксиду у СОТК та підвищує концентрацію L-аргініну у плазмі крові. Утім, одночасне введення вітаміну Е та аміногуанідину ефективніше знижує активність NO-синтази та вміст нітрит-аніону у СОТК щурів за стресу.

**ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ БІМЕТАЛІЧНОГО КОЛОЇДНОГО
НАНОКОМПОЗИТУ Ag/Au, СТАБІЛІЗОВАНОГО ДСН**

*І. О. ШМАРАКОВ¹, І. В. СВЕРЕДА¹, Н. М. РИДЖАК¹, М. М. МАРЧЕНКО¹,
Г. Р. ЯШАН², Ю. П. МУХА², Н. П. СМІРНОВА², Г. М. ЄРЕМЕНКО²*

¹Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;

²Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Київ;

e-mail: igor.shmarakov@gmail.com

Розробка ефективних протипухлинних препаратів є одним із пріоритетних напрямів сучасної біотехнології. Перспективними в цьому аспекті виявляються наночастинки на основі золота і срібла, сфери застосування яких поширюються від візуалізації клітинних структур до створення векторних систем доставки лікарських препаратів. Використання наночастинок потребує знання молекулярних механізмів, що лежать в основі їхньої метаболічної активності, біодоступності та можливого токсичного впливу на біологічні системи.

У роботі проведена оцінка протипухлинної активності біметалічних наночастинок (НЧ) Ag/Au розміром 5–20 нм, стабілізованих Ds-Na. Протипухлинну активність оцінювали за гальмуванням росту карциноми Герена і збільшенню тривалості життя дослідних тварин. Цитотоксичність на первинну культуру клітин карциноми Герена визначали за рівнем життєздатних клітин після кокультивування з наночастинками в тестах із трипановим синім, МТТ, ЛДГ-«витоку». Про деструкцію клітинних біомолекул робили висновок за кількістю ТБК-активних продуктів, протеїнових SH-груп та карбонільних похідних методом ДНК-комет.

Введення досліджуваних наночастинок щоденно в дозі 0,5 мкг/кг щурам, починаючи з 5-го дня після перещеплення карциноми Герена, спричинює гальмування росту пухлини вже з 9-ї доби експерименту на 40% (73% на

21-у добу) і збільшує тривалість життя тварин у 3 рази.

Для встановлення можливих молекулярних механізмів виявленої активності нами було проведено кокультивування первинної культури клітин карциноми Герена з наночастинками. На початкових етапах кокультивування досліджуваних клітин з наноконкомпозитом (6 год) спостерігають ознаки його значної цитотоксичності, що виявляється у зниженні рівня життєздатності клітин карциноми Герена до 53%, внаслідок імовірного порушення проникності плазматичної мембрани, яке підтверджується високими показниками ЛДГ-«витоку» (2,47 мккат/мг). Водночас, внутрішньоклітинні структури зберігають інтактність (рівень ТБК-активних продуктів $1,1 \cdot 10^{-5}$ нМ, протеїнових карбонільних похідних 0,06 нмоль/мг, переважання комет C₀–C₂, Ідк = 2,2, за метаболічної активності 127% згідно з МТТ-тестом). За умов подальшого культивування (48 год) в пухлинних клітинах виявлялися ознаки розвитку оксидативного стресу, виражені у зростанні продуктів ПОЛ (0,87 нмоль/мг) і ОМБ (0,09 нмоль/мг), та пошкодження ядерної ДНК (переважання комет C₃–C₄, Ідк = 3,2).

Отже, проведені дослідження свідчать про перспективність використання біметалічного колоїдного наноконкомпозиту Ag/Au як базового компонента протипухлинних нанобіотехнологічних препаратів.