

30. Сторожук В.М. Функциональная организация нейронной соматической коры / В.М. Сторожук. - Київ : Наук. думка, 1974. - 271 с.

31. Костюк П.Г. Структура и функции нисходящих систем спинного мозга / П.Г. Костюк. - Л.: Наука, 1973. - 280 с.

32. Костюк П.Г. Межсегментарные нейронные системы спинного мозга / П.Г. Костюк, Д.А. Василенко. - Київ : Наук. думка, 1983. - 208 с.

33. Kostyuk P.G. Calcium channels in the neuronal membrane / P.G. Kostyuk // *Biochim. et biophys. acta.* - 1981. - Vol. 650, №1. - P. 128-150.

34. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейронной мембраны / И.С. Магура. - Київ: Наук. думка, 1981. - 206 с.

Резюме

Клименко Л.О. Д.С. Воронцов і його наукова школа.

Висвітлено роль фізіологічної школи Д.С. Воронцова - блискучого фізіолога-експериментатора з широким теоретичним кругозором, прекрасної людини. Охарактеризовано формування і склад наукової школи Д.С. Воронцова, описано її досягнення.

Ключові слова: наукова школа, електрофізіологія, фізіологія нервової системи.

Резюме

Клименко Л.А. Д.С. Воронцов и его научная школа.

Показано роль физиологической школы Д.С. Воронцова - блестящего физиолога-экспериментатора с широким научным кругозором, замечательного человека. Охарактеризовано формирование и состав научной школы Д.С. Воронцова, описаны ее достижения.

Ключевые слова: научная школа, электрофизиология, физиология нервной системы.

Summary

Klimenko L.A. D.S. Vorontsov and his Academic School.

The author shows the role physiological School of D.S. Vorontsov, brilliant physiologist-experimentalist with broad science perception, a wonderful person. Gives characteristic of establishment and structure of Vorontsov academic school. Author shows his scientific achievements.

Key words: science school, electrophysiology, physiology nervous system.

Рецензент: д.мед.н., проф. Н.К. Казімірко

БЕЗРЕЦЕПТОРНІ МЕХАНІЗМИ МЕМБРАНОТРОПНИХ ЕФЕКТІВ БІОРЕГУЛЯТОРІВ НА ПРИКЛАДІ ПЕПТИДНИХ ГОРМОНІВ

Г.В. Островська, Т.В. Рибальченко, М.Е.

Дзержинський, В.Г. Бурлай, В.К. Рибальченко

Київський національний університет ім.Тараса Шевченка
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

Вступ

Для регуляції росту, поділу, диференціації та організації в тканини і для координації функцій клітинам необхідний обмін інформацією одна з одною і з зовнішнім середовищем. Біологічно активні речовини (БАР), в тому числі й лікувальні препарати, здебільшого, здійснюють свої ефекти через взаємодію з специфічними мембранними білковими рецепторами на плазматичній мембрані (ПМ) або всередині клітини, внаслідок чого енергія хімічного сигналу трансформується в біологічні ефекти [1-3]. Проте, за останній період встановлена здатність біорегуляторів змінювати функціональну активність клітин завдяки механізмам, які не включають пряме зв'язування регуляторних молекул з білковими рецепторами [4-8]. Як правило, відповіді на такі взаємодії трактуються як побічні ефекти індивідуальних препаратів, і можуть бути причиною шкідливих, несприятливих і токсичних впливів на клітинні процеси. Особливості безрецепторних взаємодій залежать від фізико-хімічної природи діючих речовин і їх здатності в більшій чи меншій мірі проникати в мембрану і проходити через неї, з одного боку, і від властивостей мембранних ліпідів, з іншого [9, 10]. БАР здатні ініціювати біологічну відповідь, впливаючи безпосередньо на функціональну структуру мембранних фосфоліпідів, обминаючи, таким чином, специфічні рецептори. Ці ефекти є залежними від дози і часу і, окрім фізіологічних змін у функціях клітини, низка БАР може ініціювати індукцію фосфоліпідозу і неспецифічні токсичні ефекти.

Останнім часом в світових дослідженнях значна увага приділяється в основному мембрано-активним властивостям пептидів антимікробної дії і пептидам, токсичним по відношенню до клітин ссавців [11-15]. Безрецепторні ефекти регуляторних пептидів (РП) досі залишаються поза належною увагою дослідників. Проте, з'являється все більше даних про поліфункціональність РП, яку не можна пояснити тільки гетерогенністю рецепторів [7, 16-19]. Це пов'язано також з отриманням експериментальних даних про можливість безрецепторних механізмів зв'язування регуляторних пептидів (РП) клітиною [4,5,20-22], про наявність рецепторів для енкефалінів на внутрішній поверхні плазматичної мембрани [16], утворення окситоцином іонних каналів в бімолекулярних ліпідних мембранах і блокування ним Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФази на везикулах ПМ, орієнтованих цитоплазматичною поверхнею в оточуючий розчин [4,10], транспорт через синаптичні мембрани мет-енкефаліну [23] і фрагментів речовин Р [24] та ін. Важливим при цьому є те, що широкий спектр ефектів проявляється й у впливі більшості пептидів на процеси проліферації клітин, психоневрологічний стан і поведінку людини та тварин, що може привести до виникнення непередбачених наслідків при їх застосуванні в лікувальній практиці. Це вимагає більш детального дослідження механізмів взаємодії БАР з клітинними мембранами. Знання первинних механізмів мембранотропної дії сприятиме пошуку і розробці нових, більш ефективних і селективних препаратів, в тому числі й таких, що не руйнуються ендogenous ферментами, проте мають певну специфічність до того чи іншого типу мембран.

Матеріали та методи дослідження

Розрахунки параметрів гідروفобності пептидів проводились за критеріями, запропонованими Ch.Tanford і описаними в [25]: (1) - шкала середньої гідروفобності пептиду: $H_f = \sum \Delta G_{пер}^i \cdot \chi_i$, де $\Delta G_{пер}^i$ - вільна енергія переносу амінокислотного залишку і-го типу між полярним і неполярним середовищем; а χ_i - мольна доля останнього; (2) - співвідношення полярних і неполярних залишків в молекулі пептиду: $R = \sum \chi_k / \sum \chi_i$, де k відповідає полярним, а i - неполярним групам; (3) - дискримінантна функція Z, яка об'єднує два попередні параметри, $Z = -0,345R + 0,060 H_f$.

Визначення параметрів поверхневої і мембранотропної активності речовин проводили на базі методів Ленгмюра-Вільгельмі. Поверхневий тиск (π) вимірювали за методом Вільгельмі за допомогою напівзануреної платинової пластинки, яка з'єднана перехідником з рухомим катодом механотронного перетворювача ХМ-6. Чутливість вимірювання - 0,1 мН/м. Граничний стрибок потенціалу (ГСП, ϕ), що виникає поверхні розподілу фаз, вимірювали за методом динамічного конденсатора [26]. Чутливість - 2 мВ. Реєстрація обох параметрів проводиться одночасно. За нульове значення приймаються параметри вільної поверхні розподілу фаз електроліт-повітря.

Ліпідні моношари формували нанесенням розчинів ліпідів в хлороформі (1 мг/мл) на поверхню електроліту (звичайно: 0,01М КСІ, 0,01 М Трис-НСІ, рН 7,4) в тефлоновій кюветі (130x200x5 мм) до досягнення необхідної величини поверхневого тиску. При формуванні ліпопротеїнових модельних мембран, використовували суміші складу азоексін/холестерол/ сироватковий альбумін людини у співвідношеннях, що наближені до показників ліпідно-білкового складу ПМ міоцитів кишечника кроля або кардіоміоцитів (за [27]). Фракції ПМ міоцитів тонкого кишечника кроля і гепатоцитів печінки щурів для формування модельних мембран природного складу виділяли за [28].

Проникнення біорегуляторів в мономолекулярні ліпідні плівки вимірювали при внесенні аліквот досліджуваних препаратів (до 1-10 мкМ) в об'єм субфази через насос Бернуллі, який запобігає потраплянню речовин на поверхню і одночасно забезпечує обережне перемішування субфази. Рівень граничної адсорбції препаратів (коефіцієнт адсорбції Гіббса, Γ) розраховували за рівнянням Гіббса: $\Gamma = \frac{1}{RT} \frac{\partial \pi}{\partial \ln C}$, де R - універсальна газова стала, T - абсолютна температура, °К, π - показник поверхневого тиску в мембрані, C - концентрація біорегулятора, М/м³. Питому площу на 1 молекулу адсорбованої в мембрані речовини, розраховували за рівнянням: $S = \frac{10^{18}}{\Gamma \cdot N}$, де Γ - коефіцієнт адсорбції Гіббса, N - число Авогадро, 10^{18} - коефіцієнт переведення м² у нм². Мінімальну діючу концентрацію БАР при взаємодії з мембранами ($C_{мін}$) розраховували при ап-

роксимації графіку $\Delta\pi = f(\Delta\ln C)$ - в точці перетину функції з віссю абсцис ($\Delta\pi=0$). При двофазності процесу за цим же графіком, в точці перегину лінійної функції визначали концентрацію переходу процесу до другої фази ($C_{пер}$).

Отримані результати та їх обговорення

Порівняльний аналіз амінокислотного складу досліджених мембраноактивних регуляторних пептидів і пептидів з цитотоксичними і антибактеріальними властивостями. Останніми роками активно досліджуються механізми мембранолітичної дії антибактеріальних пептидів (АБП), а також близьких до них за механізмами дії різноманітних цитотоксичних пептидів. Багато з цих пептидів в ліпідному оточенні формують α -спіральну структуру з різною орієнтацією, мають каналоформуючу здатність [14, 15]. При цьому більшість з АБП діють переважно на клітини прокариотів, майже не впливаючи на мембрани клітин-хазяїна, що пов'язують з особливостями біохімічного складу мембран (відносна ліпідна асиметрія з переважанням кислих ліпідів в зовнішньому моношарі мембран прокариотів і у цитоплазматичному - в ПМ еукаріотичних клітин) і особливостями самих пептидів (АБП мають високий вміст позитивно заряджених амінокислотних залишків, що забезпечує ефективну електростатичну взаємодію з аніонними бактеріальними мембранами, і характеризуються високою загальною гідрофобністю, завдяки якій проникають в зону ацильних ланцюгів ліпідного бішару).

Нами раніше були встановлені безрецепторні пептид-мембранні взаємодії для нейрогіпофізарних гормонів і їх аналогів і показано значення особливостей їх амінокислотного складу для реалізації прямих пептид-мембранних взаємодій і їх інтенсивності [10]. Ми припустили, що такі особливості можуть лежати в основі первинних механізмів пептид-мембранної взаємодії і для інших ендогенних пептидів з регуляторною дією на тваринні клітини. Виходячи з наших попередніх досліджень і з даних по АБП і цитотоксичним пептидам [29] важливу роль повинні відігравати як гідрофобність молекул, так і відносна кількість полярних залишків у них.

Проаналізовано вміст амінокислотних залишків (АКЗ) для послідовностей 14 РП, для яких нами встановлена мембранотропна

активність (табл.1), у порівнянні з амінокислотним спектром АБП (проаналізована група з 498 пептидів з середньою довжиною 27,82 АКЗ з бази даних The Antimicrobial Peptide Database) і загальним поширенням певних АКЗ в білках еукаріотів цілому (за [30]).

Таблиця 1

Параметри гідрофобності антибактеріальних і регуляторних пептидів з встановленою і можливою мембранотропною активністю

Пептид	Но	R	Z
АБП	1,499±0,087	0,650±0,092	0,636±0,062
<i>РП з встановленою нами мембранотропною активністю</i>			
Кіоторфін Tyr-Arg	1,8	1	0,735
Меліностатин Pro-Leu-Gly-NH ₂	1,67	0,5	0,655
Гироліберин Glu-His-Pro-NH ₂	1,52	2	0,222
Мет-ЕНК Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	1,31	0,0	0,786
Лей-ЕНК Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	1,53	0,0	0,918
S-77 Lys(TFA)-Tyr-D-Ala-Gly-Phe(NO ₂)-NH ₂ -AcOH-2H ₂ O	1,55	0,25	0,844
Пентагастрин Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	1,50	0,25	0,813
Піротензин Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	1,749	1,6	0,497
Оксигонин H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH ₂	1,410	0,5	0,673
Візопресин H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH ₂	1,193	0,8	0,448
Дезамінокситонин H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly	≥1,410	0,5	≥0,673
Субстанція Р H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂	1,477	1,2	0,472
Ангіотензин I Asp ⁻ Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-OH	1,926	1	0,811
Ірідікінін Arg-Pro-Pro-Gly-Ser-Pro-Phe-Arg	1,499	1,7	0,313
M±m	1,539±0,052	0,843±0,169	0,634±0,056
<i>Інші РП з можливою мембранотропною активністю</i>			
Меланотропін, бомбезин, кальцитонін, глюкагон, АКТГ, інсулін, β-ендорфін, кортиколіберин, M±m	1,181±0,053	1,158±0,131	0,410±0,082

В амінокислотному складі мембраноактивних РП виявлено низку особливостей. По-перше, РП, як і мембраноактивні антибактеріальні пептиди, містять більше гідрофобних та менше гідрофільних АКЗ порівняно з вмістом відповідних АКЗ у білках еукаріотів (в білках гідрофобних АКЗ в середньому 45%, тоді як в АБП їх вміст зростає до 50,8%, а в РП - до 58,5%). По-друге, спектр гідрофобних АКЗ в АБП і в РП для є протилеж-

ним за вмістом більшості залишків - якщо певні залишки переважають в одній групі регуляторів, то в іншій вони знижені. По-третє, РП і АБП характеризуються збільшеним вмістом Gly і позитивно зарядженого Arg, але вміст позитивно зарядженого Lys, який вважається істотним для взаємодії з аніонними ліпідами бактеріальних мембран, у складі РП знижений не тільки порівняно з АБП, але й з білками взагалі. Гідрофільний залишок Gly належить до найбільш розповсюджених як в АБП, так і в ендогенних РП, він присутній в більшості досліджених нами РП і, очевидно, має важливе значення для ефективної взаємодії з мембранами.

На нашу думку, саме такі особливості спектру гідрофобних АКЗ забезпечують різну поведінку пептидів двох функціональних груп в ліпідному матриці мембрани - схильність до формування α -спіралей і β -структур при утворенні пептидних комплексів для АБП і формування інших, унікальних конформацій для кожного з РП. Додатковий аналіз амінокислотного спектру цих двох груп пептидів підтверджує це припущення. В складі досліджених РП переважають АКЗ, які перешкоджають або не сприяють формуванню α -структур. В першу чергу, це залишки Gly, Pro і Tyr, які найбільш широко представлені в регуляторних пептидах. Відносний вміст АКЗ, які сприяють формуванню β -структур є більшим, що робить формування таких структур більш ймовірним, але високий вміст залишків Pro і Gly в РП, очевидно, часто не сприятиме формуванню і цих структур також. В той же час, в антибактеріальних пептидах розподіл АКЗ з різною схильністю до формування α -спіралей є більш рівномірним - в них зменшується вміст АКЗ, що перешкоджають їх формуванню (в основному за рахунок залишків Pro і Tyr) і, навпаки, зростає поширеність залишків, які не заважають (Lys, Ile) або сприяють формуванню β -спіралей (Leu, Ala). Саме за вмістом вказаних залишків і спостерігається різниця в амінокислотному складі двох різних за функціями груп пептидів при їх приблизно рівних параметрах гідрофобності.

Можна припускати, що якщо основним призначенням структури (амінокислотного складу) антибактеріальних і цитотоксичних пептидних молекул є утворення порових комплексів різної будови на основі формування α -спіралей, а також β -

структур, то для пептидів регуляторної дії це буде формування специфічної, унікальної для кожного пептиду конформації, що може сприяти його ефективній взаємодії з рецептором.

Розрахунки параметрів гідрофобності і теоретичне прогнозування мембранотропної активності регуляторних пептидів. На основі наведених даних зроблено припущення про важливу роль гідрофобності молекул мембранотропних РП у забезпеченні їх здатності взаємодіяти з ліпідним матриксом мембран. Для оцінки цієї ролі у прояві властивостей РП і порівняння їх з мембраноактивними АБП і відомими внутрішньо-мембранними білками ми застосували підхід, запропонований Ч.Тенфордом та ін. [25], в якому розраховується загальна гідрофобність молекули H_0 за вільною енергією переносу її амінокислотних залишків між полярним і неполярним оточенням ($\Delta G_{пер}^i$), співвідношення полярних і неполярних залишків в молекулі (показник R) і лінійна дискримінантна функція Z, яка оптимально поєднує параметри H_0 і R для чіткого розмежування білків з зовнішньою і внутрішньою локалізацією в мембранах. За нашими даними, підхід дозволяє прогнозувати мембранотропні властивості регуляторних пептидів і використаний нами також для оцінки властивостей ряду інших ендогенних РП з потенційною мембранотропністю (табл.1).

За параметрами гідрофобності (H_0 і Z) мембранотропні РП перевищують значення відповідних параметрів молекул внутрішньомембранних білків і практично співпадають з параметрами АБП (рис.1). В групі пептидів з можливою мембранотропністю ці показники знижені, але близькі до відповідних параметрів внутрішньомембранних білків.

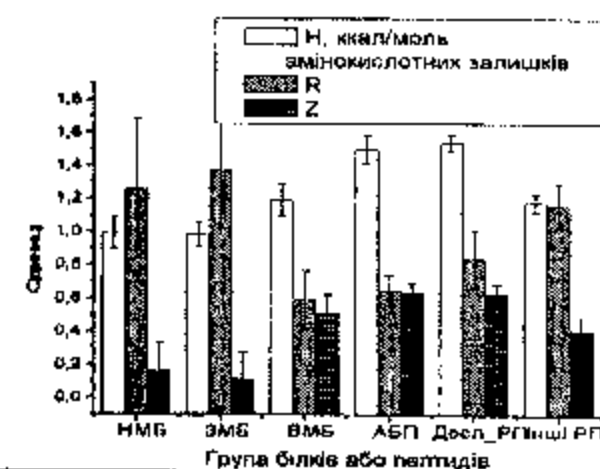


Рис.1. Порівняння параметрів гідрофобності молекул білків і пептидів з різними мембранотропними властивостями. НМБ - немембранні білки; ЗМБ - зовнішні мембранні білки; ВМБ - внутрішні мембранні білки; АБП - антибактеріальні пептиди; Досл_РП - досліджені мембраноактивні РП; інші РП - регуляторні пептиди з потенційними мембранотропними ефектами.

Проведені розрахунки свідчать не тільки про можливість теоретичного визначення характеристик досліджених пептидів, але й дозволяють у першому наближенні встановити ймовірне положення молекул РП у ліпідному матриксі мембрани. Результати теоретичних розрахунків можуть бути важливими для попереднього скринінгу потенційно активних РП та стати підставою для проведення експериментальних досліджень взаємодії РП з штучними та біологічними мембранами.

Поверхнева і мембранотропна активність регуляторних пептидів. Мембранотропні властивості дипептиду кіоторфіну, вплив оптичної ізомерії на особливості його взаємодії з мембраною. Кіоторфін (КТ) - опіоїдний дипептид мозку (Н-Туг-Arg-ОН). Ми дослідили особливості мембранотропних властивостей КТ і залежність їх прояву від вмісту L- і D-амінокислот в його ізомерах, оскільки короткий дипептид є зручною моделлю для комбінування в ньому АКЗ з різною оптичною ізомерією (D-D, D-L, L-D, L-L). Основна роль в стереоселективності фармпрепаратів звичайно відводиться особливостям їх взаємодії з білковими рецепторами, ферментами і транспортуючими системами, різному розподілу в тканинах, але практично не приділяється уваги такому фактору, як механізми зв'язування цих ізомерів з мембранами клітин-мішеней, зокрема ролі ліпідного матриксу в реалізації стереоселективності.

При унікальній амфіфільній структурі КТ (високогідрофобний Туг і полярний заряджений Arg) загальні параметри гідрофобності КТ досить високі - його середня гідрофобність H_f (1,8 ккал/моль) і дискримінантна функція $Z=0,735$, перевищують відповідні показники більшості інших мембраноактивних пептидів (див. табл.1). Мембранотропна активність кожного з оптичних ізомерів КТ різна, залежить також від початкової щільності мембрани і достовірно розподіляється у ряд $L-L > D-L > L-D > DD$ (рис.2).

Аналогічні співвідношення активності відмічені і у змінах показників граничного стрибка потенціалу на межі розподілу фаз.

Динаміка змін характеристик ліпідного моношару під дією L-L-ізомеру пептиду свідчить про його активне вбудовування між ліпідними молекулами (в області гідрофобних жирнокис-

лотних "хвостів"), тоді як ізомери типу L-D і D-L в більшій мірі концентруються в області полярних ліпідних головок за рахунок електростатичних взаємодій. Найменшу активність виявляє форма D-D, яка навіть в концентрації 10^{-5} М викликає дуже незначні зміни стану азолектинового моношару за показниками як поверхневого тиску, так і ГСП.

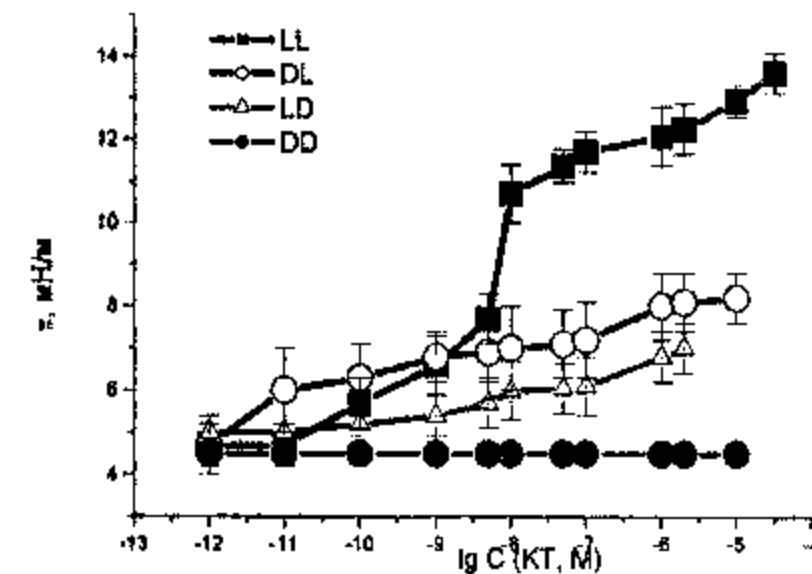


Рис.2. Характер змін поверхневого тиску в азолектинових моношарових мембранах з близькою початковою щільністю ($\pi_0 = 4,7 \pm 0,2$ мН/м) при взаємодії з ними оптичних ізомерів кіоторфіну (КТ).

При взаємодії L-L-ізомера з моношарами, сформованими із ПМ міоцитів тонкого кишківника кроля мембранотропність дипептиду знижується, а характер змін ГСП стає подібним до змін, індукованих дипептидами типу L-D і D-L. Проте, як і у випадку фосfolіпідних мембран зберігається здатність L-L-ізомеру більш активно взаємодіяти з більш щільними моношарами з ПМ, зокрема, при концентраціях КТ вище 10^{-8} М.

Вищевказаний розподіл мембранотропної активності оптичних ізомерів КТ по відношенню до фосfolіпідного матриксу повністю співпадає з розподілом їх анальгетичної активності [16] і свідчить, з одного боку, про значну роль оптичної активності амінокислот в складі біорегулятора у прояві його мембранотропних властивостей, а з другого - про важливу участь саме ліпідного матриксу мембрани в реалізації біологічної дії і стереоселективності ряду пептидних препаратів.

Мембранотропні властивості трипептиду меланостатину (меланотропін-інгібуючий фактор, МІФ-1). МІФ-1 належить до групи гіпоталамо-гіпофізарно-епіфізарних нейропептидів, має вира-

жену поліфункціональності (натрійуретичну і антиопіоїдну дію, анальгезуючі властивості, високу активність в різних поведінкових тестах [31]). МІФ-1 складається з трьох незаряджених АКЗ (табл.1), які належать до найбільш розповсюджених як в мембраноактивних АБП, так і в проаналізованих нами пептидах. МІФ-1 має високі показники гідрофобності, які значно перевищують середні показники для внутрішньомембранних білків, що розташовуються в зоні найвищої гідрофобності ліпідного кору.

МІФ-1 досить слабо взаємодіє з матриксом ліпідних моношарів на поверхні 0,01 М КСІ, викликаючи переважно повільні флуктуації ГСП ($\pm 30-50$ мВ). Проте, при адсорбції з фізіологічного розчину достовірні зміни поверхневого тиску (до 2 мН/м) відбуваються вже при концентрації МІФ-1 10^{-11} М. Розрахована мінімальна концентрація мембранотропної дії меланостатину в умовах експерименту $C_{\text{мін}} = 8 \cdot 10^{-15}$ М. Проте після досягнення наномолярних концентрацій пептиду інтенсивність процесу адсорбції знижується в 1,6 раза ($\Gamma_1 = 1,739 \cdot 10^{-7}$ М/м², вище наномолярних концентрацій $\Gamma_{\text{II}} = 1,094 \cdot 10^{-7}$ М/м²), не спостерігаються і зміни ГСП.

Таким чином, для даного пептиду роль ліпідного матриксу мембрани, очевидно, полягає в основному в концентруванні пептиду на поверхні клітини з набуттям ним певної конфорації, що полегшує подальшу взаємодію з специфічними рецепторами, причому пептид-мембранна взаємодія модулюється іонною силою субфази. Взаємодія трипептиду тироліберину (ТРГ) з модельними мембранами. ТРГ є одним з основних рилізінг-факторів гіпоталамуса, виявляє різнобічний вплив на організм - має психотропну, антидепресивну активність, впливає на процеси пам'яті, може функціонувати як антагоніст опіоїдної активності, знижувати рівень Ca^{2+} в крові, можлива його цитопротективна роль при онкотрансформації [32]

Серед АКЗ в складі ТРГ (табл.1) лише Рго належить до гідрофобних і високорозповсюджених в мембранотропних пептидах. При достатньо високій загальній гідрофобності ($N_0 = 1,52$), яка співпадає з середнім значенням для досліджених РП, завдяки високому дольовому вмісту полярних АКЗ ($R=2$) значення дискримінантної функції $Z=0,222$ є найнижчим серед проаналізованих пептидів і наближається до значення, властиво-

го для немебранних білків (рис.1). В діапазоні концентрацій $10^{-12}-10^{-6}$ М, на відміну від більшості досліджених нами пептидів, для ТРГ не встановлено проникнення в гідрофобний шар фосfolіпідної мембрани. Проте, в значеннях ГСП виявлені особливості, відмінні від ефектів інших пептидів, які свідчать про те, що не проникаючи в матрикс мембрани, ТРГ справляє значний вплив на стан її полярної зони, причому цей вплив характеризується двофазною концентраційною залежністю і є максимально вираженим в пікомольних концентраціях. Отримані концентраційні залежності мембранотропної дії ТРГ узгоджуються з біофізичними дослідженнями його ефектів іншими методами (вплив на термо-індуковані структурні переходи і мікрров'язкість ліпідного бішару мембрани ендоплазматичної сітки клітин печінки мишей), де найбільший ефект спостерігався саме при низьких концентраціях ТРГ - 10^{-10} і 10^{-16} М [33, 34].

Мембранотропні властивості пентагастрину (ПГ). ПГ - С-кінцевий пентапептид, носій фізіологічної активності природного гормону гастрину, у зв'язку з чим широко застосовується в експериментальній і клінічній практиці. Містить 4 неполярні амінокислоти і лише одну полярну - від'ємно заряджену Asp, що визначає високі показники гідрофобності ПГ.

Взаємодія ПГ з азолектиновим моношаром має чітко виражену двофазність із значною активацією при наближенні концентрації пептиду до мікромольних значень ($C_{\text{пер}} = 2,5 \cdot 10^{-7}$ М) (рис.3, А).

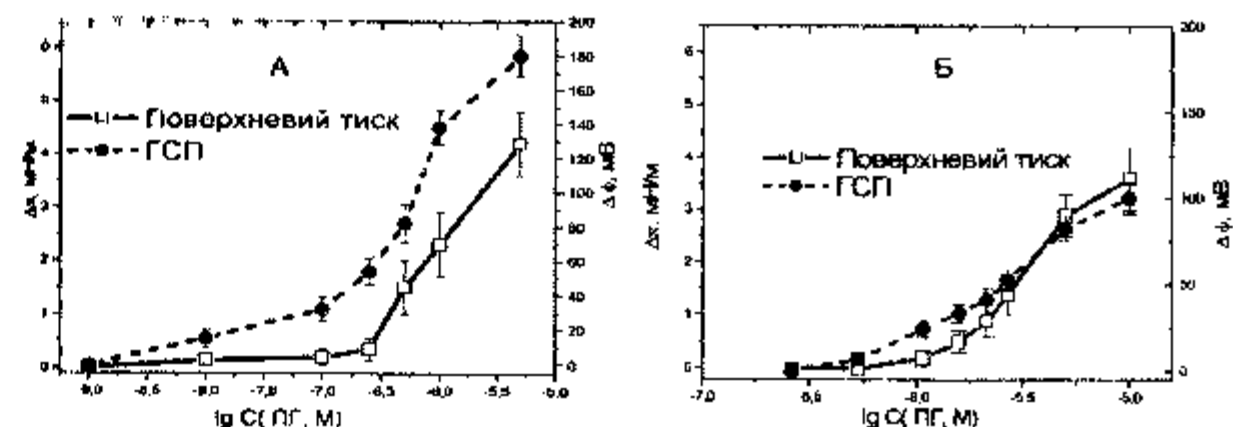


Рис.3. Зміни ГСП і поверхневого тиску при взаємодії пентагастрину (ПГ) з азолектиновими моношаровими мембранами з початковими параметрами $\pi_0 = 7,5 \pm 0,3$ мН/м і $\text{ГСП}_0 = 380 \pm 20$ мВ (А) і з моношаровими мембранами, сформованими з ПМ міоцитів кишечника кроля з початковими параметрами: $\pi_0 = 9,1 \pm 0,4$ мН/м, $\text{ГСП}_0 = 225 \pm 21$ мВ (Б).

Перша фаза (починаючи з $C_{\text{мін}} = 1,58 \cdot 10^{-10} \text{M}$) характеризується низьким коефіцієнтом адсорбції Гіббса ($\Gamma_1 = 2,804 \cdot 10^{-8} \text{M}/\text{m}^2$). Повільна кінетика процесу на цьому етапі, очевидно, обумовлена наявністю від'ємно зарядженого залишку Asp в молекулі ПГ, що веде до електростатичного відштовхування його від мембрани при взаємодії з полярними головками одноіменно заряджених ліпідів. Коефіцієнт Γ_{II} другої фази складає $4,306 \cdot 10^{-7} \text{M}/\text{m}^2$. Таким чином, процес адсорбції після певного періоду накопичення пептиду в примембранній зоні інтенсифікується в 15,4 рази ($\Gamma_1/\Gamma_{\text{II}}$).

При взаємодії ПГ з ПМ міоцитів кишечника початок періоду накопичення пептиду реєструється значно пізніше (ближче до мікромольних концентрацій), проте він є набагато коротшим у порівнянні з фосфоліпідною мембраною. Подальша інкорпорація пептиду в матрикс мембран, сформованих з ПМ (II фаза) є навіть активнішою, ніж у випадку фосфоліпідних мембран (за показником Γ_{II}), але за рахунок зниженого процесу адсорбції на I етапі загальний ефект ($\Delta\pi$) є нижчим.

Мембранотропні властивості природних енкефалінів і їх синтетичного аналога S-77. Ми припустили, що для пептидів опіоїдного ряду здатність взаємодіяти з ліпідним матриксом мембрани могла б сприяти вибору лігандом того чи іншого типу з ряду опіоїдних рецепторів [16] або певного сайту зв'язування на ньому і, як наслідок, визначати ті чи інші ефекти. На нашу думку, модифікація пептид-мембранної взаємодії різними факторами (ліпідний склад, фізико-хімічний стан мембрани і оточуючого її середовища тощо) може збільшувати спектр ефектів одного й того ж регулятора, тобто визначати його поліфункціональність, властиву для пептидних біорегуляторів взагалі.

Енкефаліни (ЕНК) - пентапептиди, які розрізняються одним С-кінцевим амінокислотним залишком: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu. Їм притаманні найвищі показники гідрофобності серед досліджених пептидів. Всі АКЗ в складі енкефалінів (за виключенням Met) належать до таких, що найбільш часто зустрічаються в досліджених нами мембранотропних пептидах.

Пентапептид S-77 - синтетичний аналог енкефалінів - має вдвічі більш високу анальгетичну активність, ніж природні ЕНК [35]. На відміну від них, в S-77 на N-кінці присутній позитивно

заряджений Lys+, який в АБП відіграє важливу роль у визначенні їх мембранотропних властивостей, сприяючи взаємодії з від'ємно зарядженими ліпідами бактеріальних мембран. Середня гідрофобність Но пептиду S-77 вища, ніж у кожного з ЕНК, проте наявність зарядженого Lys знижує значення дискримінантної функції Z. За цим параметром S-77 є більш гідрофобним, ніж більшість мембранних білків, але проміжним між Лей- і Met-ЕНК.

Характер концентраційної залежності показників мембранотропної активності енкефалінів змінюється із зростанням початкової щільності мембрани - поступово зникає двофазність процесу, вираженість якої за нашими даними, отриманими для НГГ і їх синтетичних аналогів [10], є прямопропорційною мембранотропній активності пептиду. На відміну від ряду інших пептидів, обидва ЕНК більш активно взаємодіють з азолектиновими моношарами низької щільності (рис.4). При ущільненні фосфоліпідної мембрани збільшується $C_{\text{мін}}$, знижується ступінь проникнення обох ЕНК в ліпідний моношар, швидко досягається стан насиченості і знижується загальний ефект що особливо вираженим є для Лей-ЕНК. Тобто, характер взаємодії енкефалінів з азолектиновими моношарами залежить від С-кінцевого залишку молекули, вплив якого, в свою чергу, очевидно, визначається параметрами гідрофобності.

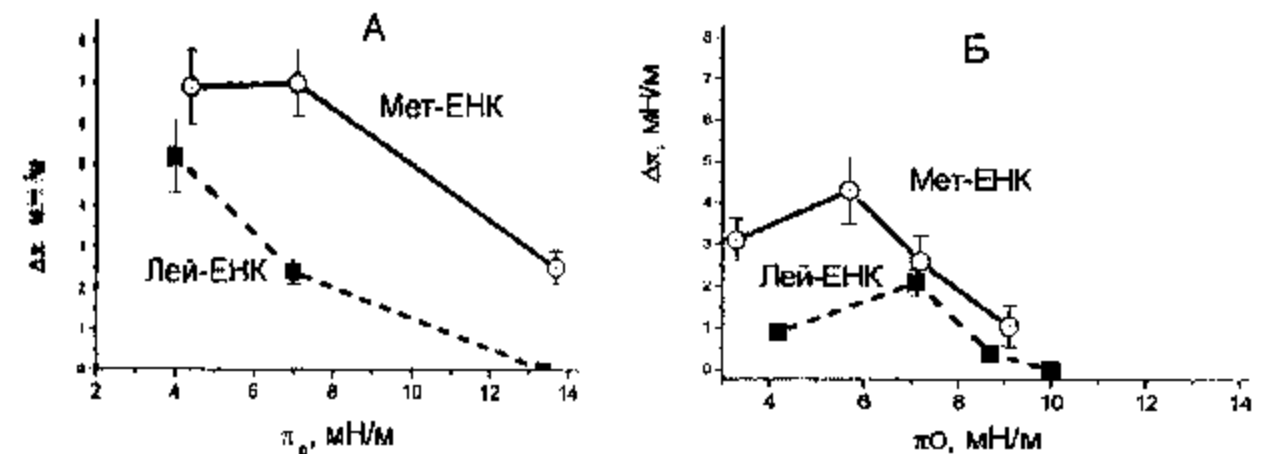


Рис. 4. Залежність зміни поверхневого тиску ($\Delta\pi$) моношарів, сформованих з азолектину (А) і везикул ПМ міоцитів тонкого кишечника (Б) під впливом Met- і Лей-ЕНК в залежності від π_0 мембрани.

Взаємодія енкефалінів з моношарами, сформованими з ПМ міоцитів тонкого кишечника кроля, є менш активною, ніж з фосфоліпідними мембранами. Це відмічається як у зростанні

мінімальної ефективної концентрації, так і у зниженні показників $\Delta\pi$ і $\Delta\phi$ у порівнянні з відповідними параметрами при взаємодії енкефалінів з фосфоліпідними мембранами. Відрізняється і характер залежності ефекту $\Delta\pi$ від π_0 - максимальна мембранотропна активність обох ЕНК реєструється при їх взаємодії з мембранами із значеннями π_0 в діапазоні 5-7 мН/м (рис.4,Б). Проте, виявлені ефекти також (як і в азолектинових мембранах) свідчать про процеси адсорбції енкефалінів в зоні полярних головок мембран і подальшої їх інсерції в гідрофобну зону (останнє більш властиве для Met-ЕНК).

Синтетичний аналог енкефалінів S-77 займає проміжне положення між мет- і лей-енкефалінами як за рівнем гідрофобності, так і за значенням мінімальної діючої концентрації C_{\min} , проте він характеризується повільною фазою первинного накопичення на мембрані і загальний ефект мікромолярних концентрацій природних пептидів значно переважає відповідний ефект пептиду S-77.

Мембранотропні властивості нейротензину (НТ). Тридекапептид НТ (див.табл.1) залучений у цілий ряд ефектів в різних відділах нервової системи, відомий як один з найбільш потужних антиноцицептивних препаратів, доведена його участь в процесах, що мають відношення до таких хвороб, як шизофренія, хвороби Паркінсона і Альцгеймера і навіть рак [36].

Молекула НТ - структура з яскраво вираженими амфільними властивостями, її гідрофобні домени рознесені по кінцевих ділянках молекули, а центральна частина є гідрофільною і позитивно (+3) зарядженою. При дуже високому співвідношенні R (полярні/неполярні залишки, 1,6) загальний рівень гідрофобності НТ ($H_o=1,749$), перевищує відповідний показник мембранних білків і більшості регуляторних пептидів (табл.1) Внаслідок цього Z, як лінійна комбінація показників R і H_o , наближена до значень в групі внутрішньомембранних білків.

Активність інкорпорації нейротензину в як ліпідних, так і ліпопротеїнових модельних мембран залежить від щільності моношару, а сам процес є 2-фазним. Показово, що в дослідженому діапазоні поверхневого тиску (до 10 мН/м) активність зростає із збільшенням щільності мембран (що наближує їх до властивостей біологічних мембран (рис. 5.Б).

Крім того, з ущільненням мембрани: (1) - процес набуває чітко вираженої двофазності, що також свідчить про збільшення афінності пептид-мембранної взаємодії; (2) - знижується мінімальна діюча концентрація НТ (C_{\min}) (рис.5.А) і питома площа на молекулу НТ при максимальній адсорбції; (3) - зростає коефіцієнт адсорбції Гіббса (Γ) і загальний ефект пептиду на стан мембрани, який виражається в її ущільненні ($\Delta\pi$), що свідчить про збільшення кількості пептиду зв'язаного з мембраною. Зростання величини ГСП ($\Delta\phi$) є дуже незначним і не має чіткого розподілу на 2 фази, що також свідчить про те, що молекули НТ при адсорбції практично не затримуються поблизу поверхні мембрани, а переважно інкорпорується між її молекулами.

Отримані факти виступають одним з доказів того, що досліджуваний процес не є простою фізичною адсорбцією, а може розглядатися певною мірою як специфічна взаємодія НТ з мембранною структурою, оскільки для біологічних досліджень має значення характер взаємодії пептиду саме з більш щільними мембранами, параметри яких наближені до клітинних мембран. При цьому аналіз кінетики адсорбції свідчить, що, якщо ліпопротеїнова модельна мембрана, яка за своїми властивостями більш повно відповідає ПМ тваринної клітини, сприяє більш ефективному початку процесу пептид-мембранної взаємодії, то мембрана, сформована тільки з фосфоліпідів, в значній мірі сприяє розвитку наступної стадії - інкорпорації нейротензину поміж ліпідними молекулами.

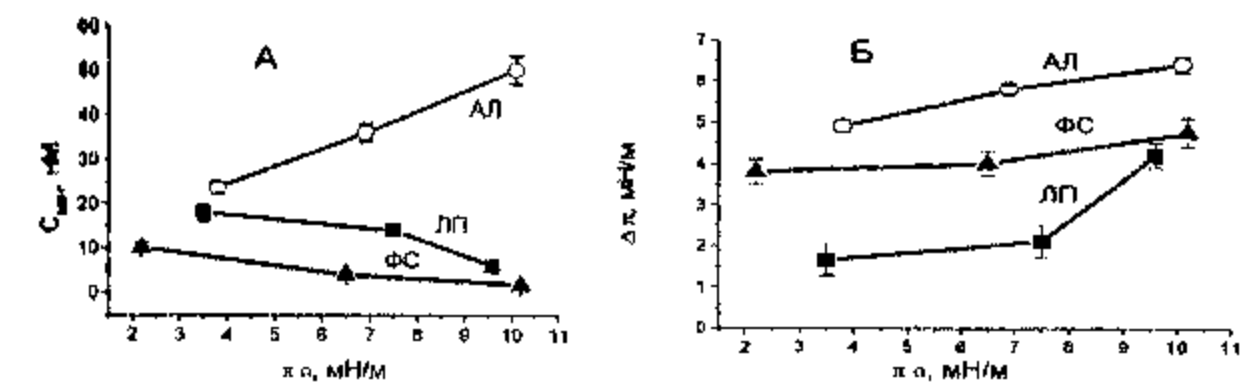


Рис.5. Залежність початкової (мінімальної) концентрації вбудовування, C_{\min} (А) молекул нейротензину і його загального мембранотропного ефекту, $\Delta\pi$ (Б) від початкової щільності уаковки ($\Delta\pi_0$) моношарових мембран різного складу: АЛ - азолектинова, ФС - фосфатидилсеринова, ЛП - ліпопротеїнова.

Припускається, що одним з головних факторів, що визначають адсорбцію позитивно заряджених молекул пептиду на мембранах є звичайна електро-статична взаємодія з негативними полярними групами окремих мембранних ліпідів. Для перевірки цього припущення ми дослідили особливості взаємодії високозарядженого НТ з мембранами, сформованими тільки з негативно зарядженого фосфатидилсерину (ФС) в різному діапазоні початкової щільності.

В фосфатидилсериновий моношар з щільністю -10 мН/м нейротензин починає вбудовуватись у концентраціях, в 30 разів нижчих, ніж при вбудуванні у азолектинову мембрану. На порядок нижчим є і концентрація переходу від першої (повільної) фази адсорбції до другої (активної) ($C_{пер}$). Але, незважаючи на ранній початок процесу, подальша інкорпорація молекул НТ у ФС-мембрани не тільки менш ефективна у порівнянні з азолектиновими моношарами, але й її інтенсивність (коефіцієнт Гіббса) знижується з наростанням щільності мембрани. Оскільки при взаємодії НТ з ФС-моношаром відбувається взаємна нейтралізація заряду, значних змін ГСП не реєструється.

Таким чином, наявність заряду на ліпідних молекулах не тільки сприяє активації адсорбції НТ в області полярної зони мембрани при низьких концентраціях, але й затримує молекули пептиду в цій ділянці, знижуючи їх подальше проникнення в гідрофобний матрикс мембрани.

Співставлення процесів взаємодії НТ з трьома дослідженими типами мембран дозволяє зробити висновок, що як хімічний склад, так і фізичний стан (в даному випадку - щільність упакування молекул-компонентів мембрани) відіграє важливу роль у модуляції характеру взаємодії пептиду з мембраною. Загальний ефект НТ на стан мембрани більш виражений у азолектинових мембранах (рис.5, Б). Проте мінімальні ефективні концентрації є значно нижчими в ліпопротеїнових і, особливо, ФС-мембранах.

Отримані дані, очевидно, можуть бути пояснені тим, що у ліпопротеїновій мембрані крім негативно-заряджених фосфоліпідів додатково присутні білки, гідрофільні ділянки яких виступають у позамембранне середовище і сприяють концентруванню пептиду поблизу поверхні мембрани (і низьким зна-

ченням C_{min}). З іншого боку, невисока (порівняно з ФС-мембранами) наявність кислих фосфоліпідів у такій мембрані не перешкоджає реалізації другого етапу взаємодії - активному проникненню пептиду у гідрофобну ділянку ліпідного матриксу. Проте холестерол, який присутній в ліпопротеїновій мембрані і знижує конформаційну рухомість ацильних ланцюгів ліпідів, гальмує і процес проникнення НТ в гідрофобну зону такої мембрани - результатом цього і є знижений загальний мембранотропний ефект ($\Delta\pi$) нейротензину у ЛП мембранах.

Узагальнення. Взаємодія всіх досліджених біорегуляторів з ліпідними мембранами розпочинається, а в ряді випадків обмежується (тироліберин, МІФ) їх накопиченням в зоні полярних головок ліпідів. Інтенсивність і концентраційні характеристики цього етапу взаємодії пов'язані як з особливостями структури біорегулятора, так і з особливостями модельної мембрани, зокрема складом її полярної зони. Мінімальні діючі концентрації (C_{min}) спостерігаються при взаємодії біорегуляторів з від'ємно зарядженими мембранами з фосфатидилсерину і знижуються при зростанні щільності мембрани, що легко пояснюється одночасним зростанням щільності зарядів на мембрані і збільшенням електростатичної взаємодії. При застосуванні модельних ліпопротеїнових мембран або природних ПМ значення C_{min} звичайно є проміжним - кількість від'ємно заряджених ліпідів в них складає 20-30 %, проте додатково присутні білкові домени, які додають свій внесок в електростатичні взаємодії. Якщо ж в складі спомого біорегулятора присутні від'ємно заряджені групи, одноіменний заряд ФС-мембран, навпаки, гальмує їх накопичення на поверхні мембрани. Наявність таких груп знижує мембранотропну активність біорегуляторів і по відношенню до азолектину, який в цілому нейтральний, але містить в своєму складі також аніонні фосфатидилсерин і фосфатидилетаноламін.

Аніонні ліпіди, а також, очевидно, заряджені амінокислотні залишки на білкових ланцюгах в складі мембран тільки сприяють первинному концентруванню більшості біорегуляторів на поверхні мембрани, але й частково перешкоджають їх подальшому проникненню в гідрофобний матрикс, утримуючи молекули біорегуляторів за рахунок електростатичних сил в зоні полярних голо-

вок. При взаємодії з такими мембранами загальний мембранотропний ефект завжди значно нижчий, ніж при взаємодії з азолектиновими моношарами. Додатковий внесок в цьому, очевидно, належить і холестеролу в їх складі, який знижує конформаційну рухомість ацильних ланцюгів мембранних ліпідів.

Ефективність інкорпорації пептидних біорегуляторів в ліпідні мембрани тісно, але не завжди прямо, пов'язана з рівнем їх гідрофобності пептиду. Всі проаналізовані пептиди, за виключенням тироліберину, характеризуються високими показниками параметрів гідрофобності - вони вищі, ніж навіть у внутрішньо мембранних клітинних білків і практично співпадають з відповідними показниками мембранотропних антибактеріальних і цитотоксичних пептидів (рис. 1).

Достовірний ефект проникнення в ліпідний матрикс ($\Delta\pi \geq 2$ мН/м) виявляють пептиди, у яких показник лінійної дискримінантної функції Z перевищує 0,3 (рис. 6). З подальшим зростанням значення Z до 0,8 ефект збільшується (коефіцієнт лінійної кореляції $r = 0,862$). При перевищенні цього значення (при поєднанні високої загальної гідрофобності і зменшеного вмісту полярних амінокислотних залишків) мембранотропний ефект різко знижується. Вирівнювання отриманого емпіричного ряду за методом Чебишева дозволило знайти теоретичну залежність мембранотропного ефекту від значення Z , представлену на рис. 6 суцільною кривою, яка наближена до параболи другого порядку.

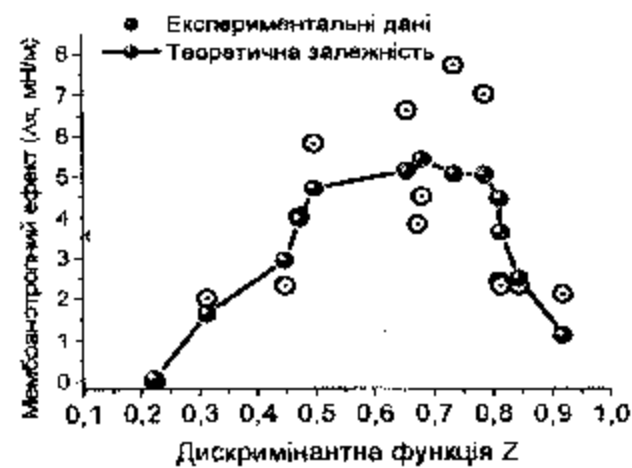


Рис. 6. Залежність ефективності інкорпорації регуляторних пептидів (за зміною поверхневого тиску в мембрані) від значення лінійної дискримінантної функції Z . Концентрація пептидів у субфазі - 10^6 М, мембрани - моношари азолектину, π_0 - від 5 до 7 мН/м).

В цілому механізм ефектів пептидних і інших біорегуляторів за участю ліпідного матриксу мембрани можна уявити таким чином - рис. 7 [37].

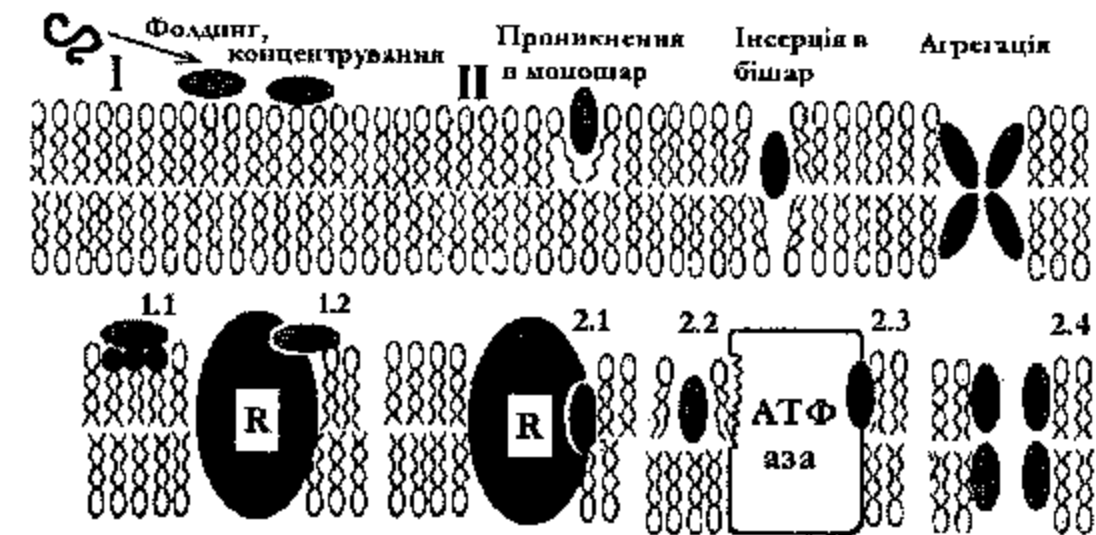


Рис. 7. Можливі шляхи дії пептидних біорегуляторів на клітину з урахуванням їх мембранотропної активності.

I - попередня адсорбція на поверхні ліпідного матриксу мембрани, яка забезпечує набуття пептидом біологічно активної конформації, необхідної для взаємодії з рецептором. Наслідком цього може бути: 1.1 - зміна стану полярної зони ліпідного матриксу; 1.2 - забезпечення ефективної взаємодії з поверхневими акцепторними сайтами рецепторів;

II - різні ступені проникнення пептидної молекули в ліпідний матрикс мембрани, в результаті чого може відбуватися: 2.1 - взаємодія біорегулятора з гідрофобним внутрішнім акцепторним сайтом рецептора 2.2 - зміна фізико-хімічного стану оточуючих ліпідів, яка може приводити до зміни функціонування мембрано-зв'язаних білків, зокрема транспортних АТФаз; 2.3 - безпосередній вплив біорегуляторів на активність таких білків; 2.4 - формування іонних каналів.

На першому етапі біорегулятори адсорбуються на мембрані за рахунок електростатичних зв'язків. Це сприяє їх концентруванню і набуттю певної конформації (фолдингу). Вже на цьому етапі взаємодія БАР з мембраною сприятиме зв'язуванню біорегулятора з поверхневими акцепторними сайтами рецептора. Наступним етапом є інкорпорація молекули біорегулятора в гідрофобну зону ліпідного матриксу. Набуваючи остаточної, єдино-можливої конфігурації в гідрофобному оточенні, молекули біорегуляторів стають здатними ефективно зв'язуватись з внутрішніми акцепторними сайтами відповідних рецепторів, безпосередньо взаємодіяти з мембранними білками (АТФазами, G-білками і ін.) або впливати на їх функціонування через локальні зміни фізико-хімічного стану ліпідів, утворювати іон-провідні структури, можливо, виступають суб-

стратами для утворення внутрімембранних і внутріклітинних месенджерів (наприклад, пептидної природи).

Здатність біорегулятора до реалізації того чи іншого етапу пептид-мембранних взаємодій залежить від його первинної структури, яка й визначає його фізико-хімічні властивості. Особливості таких взаємодій залежатимуть і від фізико-хімічних властивостей самої мембрани, які можуть бути різними не тільки для мембран клітин різних тканин, але й при змінах стану одних і тих же клітин, зокрема, при апоптозі, онкотрансформації тощо [38]. Виходячи з цього, можна припускати існування відносної специфічності безрецепторних пептид-ліпідних мембранних взаємодій.

Висновки

В цілому біологічне значення безрецепторної взаємодії регуляторних пептидів з мембранним матриксом може полягати в таких аспектах:

1. Накопичення ліганду на поверхні мембрани, створення більш ефективної діючої концентрації. Це може бути одним з пояснень ефективності дії ультрамалих доз біорегуляторів. Крім асиметрії в ліпідному складі між двома моношарами мембран спостерігається також нерівномірне розташування різних ліпідів в межах одного моношару (утворення доменів) [39], що також може мати значення для накопичення певного регуляторного пептиду або іншого біорегулятора в тій чи іншій зоні мембрани.

2. Опосередкування вибору підтипу рецептору (наприклад, у випадку енкефалінів, нейрокінінів).

3. Забезпечення безпосередньої взаємодії з мембранними регуляторними структурами - АТФазами (нейрогіпофізарні гормони), G-білками (пептид мастопаран з отрути оси) тощо.

4. Формування пептидних іонних каналів з наступною зміною іонного статусу клітини - як один з механізмів впливу на скорочення міоцитів (нейрогіпофізарні гормони) чи реалізація антибактеріальної дії ряду антибіотиків.

5. Зміна фізико-хімічного стану самого ліпідного матриксу, а через це - активності мембранних ферментів, транспортних і інших білків, функціонування яких, як відомо, в значній мірі визначається станом анулярних ліпідів.

Література

1. Химия биорегуляторных процессов / В.П.Кухарь, А.И.Луйк, С.Е.Могилевич [и др.]. - Київ: Наукова думка, 1992. - 368 с.
2. Авдонин П.В. Рецепторы и внутриклеточный кальций / П.В.Авдонин, В.А.Ткачук. - М.: Наука, 1994. - 283 с.
3. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Р.Геннис. - М.: Мир, 2001. - 624 с.
4. Рыбальченко В.К. "Липидная" гипотеза связывания окситоцина плазматической мембраной гладкомышечных клеток / В.К.Рыбальченко // Докл. АН СССР. - 1990. - Т.314, №4. - С.106-108.
5. Мураневич С.А. Только ли через рецепторы осуществляется модулирующее действие нейропептидов / С.А.Мураневич // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 1993. - Т.79, № 4. - С.9-29.
6. Рыбальченко В.К. Мембранотропная активность нейрогипофизарных гормонов / В.К.Рыбальченко, Г.В.Островская. - Луганськ: Елтон-2, 1998. - 82 с.
7. Бурлакова Е. Б. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов / Е.Б.Бурлакова, А.А.Конрадов, Е.Л.Мальцева // Хим. Физика. - 2003. - Т. 22, № 2. - С.21-40.
8. Herve J.C. Peptides targeting gap junctional structures / J.C. Herve, S.Dhein // Curr. Pharm. Des. - 2010 - Vol. 16 (28). - P. 3056-3070.
9. Могилевич Б.Р. Теоретический подход к определению мембранотропной активности регуляторных пептидов / Б.Р.Могилевич, В.К. Рыбальченко, Г.В.Островская // Биофизика. - 1995. - Т.40, №1 - С.95-97.
10. Островська Г.В. Роль мембранотропних ефектів в механізмах біологічної дії нейрогіпофізарних гормонів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеню канд. біол. наук : спец. 03.00.11, 03.00.04 / Г.В.Островська. - Київ, 1995. - 24 с.
11. Blondelle S.E. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity / S.E.Blondelle, K. Lohner, M.Aguilar // Biochim. Biophys Acta. - 1999. - Vol.15, № 1462 (1-2). - P.89-108.
12. Bechinger B. Membrane association and pore formation by alpha-helical peptides / B. Bechinger // Adv. Exp. Med. Biol. - 2010. - Vol.677. - P.24-30.
13. Zelezetsky I. Alpha-helical antimicrobial peptides - using a sequence template to guide structure-activity relationship studies / I. Zelezetsky, A. Tossi // Biochim. Biophys Acta. - 2006. Vol.1758, № 9. - P.1436-1449.

14. Almeida P.F. Mechanisms of antimicrobial, cytolytic, and cell-penetrating peptides: from kinetics to thermodynamics / P.F.Almeida, A.Pokorny // *Biochemistry*. - 2009. - Vol.1, № 48(34). - P.8083-8093.

15. Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity / H.T.Chou, H.W.Wen, T.Y.Kuo [et al.] // *Peptides*. - 2010. - Vol.31, № 10. - P.1811-1820.

16. Громов Л.А. Нейропептиды / Л.А.Громов. - Київ : Здоров'я, 1992. - 248 с.

17. Mayers Ph. The amphiphilic action of vasopressin and analogues on the plasma membrane of *Amoeba proteus* / Ph.Mayers, P.Couillard // *Gen. and Compar. Endocrinol.* - 1990. - Vol.80, № 1. - P. 24-32.

18. Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 / S.Guha, J.A.Lunn, C.Santiskulvong, E. Rozengurt // *Cancer Res.* - 2003. - Vol. 63, № 10. - P. 2379-2387.

19. A new cytokine: the possible effect pathway of methionine enkephalin / L. Xin-Hua, D.-A.Huang, F.-Y. Yang [et al.] // *World J.Gastroenterol.* - 2003. - Vol. 9, № 1. - P. 169-173.

20. A study of the membrane association and regulatory effect of the phospholemman cytoplasmic domain / E.Hughes, C.A.Whittaker, I.L.Barsukov [et al.] // *Biochim. Biophys Acta.* - 2011. - Vol.1808, № 4. - P.1021-1031.

21. Schwyzer R. In search of the "bio-active conformation" - is it induced by the target cell membrane? / R.Schwyzer // *J. Mol. Recognit.* - 1995. - Vol. 8, № 1-2. - P. 3-8.

22. Schwyzer R. Molecular mechanism of opioid receptor selection / R.Schwyzer // *Biochem.* - 1986. - Vol. 25, № 20. - P. 6335-6342.

23. Morphine modulates NF kappa B activation in macrophages / S.Roy, K.J.Cain, R.B.Chapin [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1998. - Vol. 245, № 2. - P. 392-396.

24. Seelig A. Substance P and antagonists surface activity and molecular shapes / A.Seelig // *Biochim.Biophys.Acta. Biomembranes.* - 1990. - Vol.1030, № 1. - P. 111-118.

25. Кантор Ч. Биофизическая химия. Т.1 / Ч.Кантор, П.Шиммел. - М.: Мир, 1984. - 336 с.

26. Богуславский Л.И. Биоэлектрoхимические явления и граница раздела фаз / Л.И.Богуславский. - М.: Наука, 1978. - 360 с.

27. Ивков В.Г. Липидный бислой биологических мембран / В.Г.Ивков, Г.Н.Берестовский. - М.: Наука, 1982. - 224 с.

28. Рыбальченко В.К. Структура и функции мембран : практикум / В.К.Рыбальченко, М.М.Козанов. - Київ : Вища школа, 1988. - 312 с.

29. Interactions between the plasma membrane and the antimicrobial peptide HP (2-20) and its analogues derived from *Helicobacter pylori* / K.H.Lee, D.G.Lee, Y.Park [et al.] // *Biochem. J.* - 2006. - Vol.15, № 394 (Pt 1). - P.105-114.

30. Optimality of the genetic code with respect to protein stability and amino-acid frequencies / D.Gilis, S.Massar, N.J.Cerf, M.Roosman // *Genome Biology.* - 2001. - Vol. 2. - Res. 0049.1-0049.12.

31. Rotzinger S. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety / S.Rotzinger, D.A.Lovejoy, L.A.Tan // *Peptides.* - 2010. - Vol.31. - P.736-756.

32. Nilini E.A. Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs / E.A.Nilini // *Front. Neuroendocrinol.* - 2010. - Vol.31, № 2. - P.134-156.

33. Структурные изменения в мембранах эндоплазматического ретикулума при действии сверхмалых доз тиролиберина *in vitro* / В.Е.Жерновков, Н.Г.Богданова, Т.В.Лелекова, Н.П.Пальмина // *Радиация, биология. Радиоэкология.* - 2003. - Т.43, № 3. - С.331-333.

34. Торчинский А.А. Влияние тиролиберина на изменения в структуре различных участков в биологических мембранах *in vivo* / А.А.Торчинский, Н.П.Пальмина // *Радиационная биология. Радиоэкология.* - 2003. - Т.43, № 3. - С.328-330.

35. Боброва И.В. Синтез и исследование аналогов энкефалина : автореф. дис.на соискание уч.степени канд. хим. наук / Боброва И.В. - Рига, 1983. - 23 с.

36. Mustain W.C. The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes / W.C.Mustain, P.G.Rychakou, B.M.Evers // *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* - 2011. - Vol.18, № 1. - P.75-82.

37. Островська Г.В. Первинні механізми мембраномодуючої дії біорегуляторів природного і синтетичного походження : автореф. дис.на спoшук. наук.ступеня д-ра біол. наук : спец. 03.00.02. / Г.В.Островська. - Київ, 2005. - 44 с.

38. Azuma Y. Alterations in cell surface phosphatidylserine and sugar chains during apoptosis and their time-dependent role in phagocytosis by macrophages / Y.Azuma, Y.Inami, K.Matsumoto // *Biol. Pharm. Bull.* - 2002. - Vol.25, № 10. - P.1277-1281.

39. Staubach S. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer / S.Staubach, F.G.Hunisch // *Expert. Rev. Proteomics.* - 2011. - Vol.8, № 2. - P.263-277.

Резюме

Островська Г.В., Рыбальченко Т.В., Держинський М.Е., Бурлай В.Г., Рыбалько В.К. *Безрецепторні механізми мембранотропних ефектів біорегуляторів на прикладі пептидних гормонів.*

Досліджено особливості взаємодії біорегуляторів з модельними ліпідними і ліпопротеїновими мембранами різного складу без попереднього залучення специфічних білкових рецепторів. Ефективність цих процесів залежить від електростатичних і гідрофобних взаємодій, модулюється вмістом оптичних ізомерів амінокислотних залишків в їх молекулах, іонним складом і іонною силою субфази. Запропоновано схему механізму реалізації ефектів пептидних і інших біорегуляторів за участю ліпідного матрикса мембрани.

Ключові слова: регуляторні пептиди, плазматична мембрана, ліпідний матрикс, пептид-мембранні взаємодії.

Резюме

Ostrovskaya G.V., Rybalchenko T.V., Dzerzhynskiy M.E., Byrlay V.G., Rybalchenko V.K. *Безрецепторные механизмы мембранотропных эффектов биорегуляторов на примере пептидных гормонов.*

Исследованы особенности взаимодействия биорегуляторов с модельными липидными и липопротеиновыми мембранами различного состава без участия специфических белковых рецепторов. Эффективность этих процессов зависит от электростатических и гидрофобных взаимодействий, модулируется содержанием оптических изомеров аминокислотных остатков в их молекулах, ионным составом и ионной силой субфазы. Предложена схема механизма реализации эффектов пептидных и других биорегуляторов с участием липидного матрикса мембраны.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, плазматическая мембрана, липидный матрикс, пептид-мембранные взаимодействия

Summary

Ostrovskaya G.V., Rybalchenko T.V., Dzerzhynskiy M.E., Byrlay V.G., Rybalchenko V.K. *Receptorless mechanisms of bioregulator membranotropic effects on the example of peptide hormones.*

The features of interaction of bioregulators with model lipide and lipoprotein membranes of different composition without precursor involving of specific protein receptors are investigated. The efficiency of these processes depends on electrostatic and hydrophobic interpaactions, and it is modulated by the contents of optical isomers of aminoacidic residues in their molecules, by ionic composition and ionic strength of a subphase. It is offered the scheme of the mechanism of realization of bioregulators effects with assistance of membrane lipide matrix.

Key words: Regulator peptides, plasma membrane, lipide matrix, peptide-membrane interaction.

Рецензент: д.біол.н., проф. Б.П.Романюк

УДК 611.118+616.34-008.87+616.006

МУЛЬТИПРОБІОТИКИ ЯК ЗАСІБ ПРОФІЛАКТИКИ МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН У ТОВСТОМУ КИШЕЧНИКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГІПЕРГАСТРИНЕМІЇ

О.М. Радчук, В.К. Рыбальченко, Н.О. Карпезо
Київський Національний університет ім.Тараса Шевченка

Вступ

Гіпоацидність, спричинена різними чинниками, призводить до суттєвих морфо-функціональних змін не тільки у шлунку, але й у кишечнику. Знижена секреція соляної кислоти за механізмом зворотнього зв'язку посилює виділення гастрину, а гастрин стимулює ріст нормальної та злоякісної тканин шлунково-кишкового тракту, отже гіпергастринемія є фактором ризику розвитку раку і шлунку, і товстої кишки. Гастрин спричиняє порушення зкоординованості процесів проліферації та диференціації клітин, йому притаманна виражена антиапоптотична активність [1-4]. Зважаючи на це, нормалізація інтенсивності перебігу апоптозу є однією з ключових ланок запобігання розвитку неопластичних процесів у слизовій оболонці. Особливої уваги у зв'язку з цим заслуговує масляна кислота, продукт гідролізу лактобацилами та біфідобактеріями харчових волокон, яка здатна стимулювати апоптоз і впливати на проліферацію та диференціацію клітин. Такі порушення супроводжуються змінами у розподілі мембранних рецепторів до лектинів арахісу, сої і золотого дощу, та атипівістю локалізації глікокон'югатів, які зв'язують ці лектини, у малігнізованих клітинах [5-8].

Тривале зниження кислотності шлункового соку при гіпоацидності, ахілії чи тривалому прийомі антисекреторних препаратів призводить до розвитку дисбіозу в шлунково-кишковому тракті [9-10] і, відповідно, зменшення утворення коротколанцюгових жирних кислот, в тому числі і масляної. З метою корекції стану мікрофлори широко використовуються біопрепарати на основі живих мікробних культур. Розповсюдженими переважно є ліофілізовані моноштамові препарати або пробіо-