

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ КОНФЕРЕНЦІЇ МОЛОДИХ УЧЕНИХ «АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ БІОХІМІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ – 2015»

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, 23–24 квітня, 2015 р., Київ

Всеукраїнська конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015» відбулася в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України 23–24 квітня. В ній взяли участь 28 доповідачів – наукова молодь Інституту та інших наукових установ міста Києва і України. Конкурсні доповіді оцінювала комісія на чолі з д.б.н., проф. Миколою Миколайовичем Великим. Цього року конференція була присвячена 110-річчю від дня народження академіка НАН України Максима Федотовича Гулого.

Відкрив Конференцію вітальним словом до учасників академік НАН України, заступник директора Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна Сергій Олексійович Костерін, після чого розпочали свою роботу секції: біохімії, біотехнології, медичної біохімії та онкології.

Окрім представників Інституту у Конференції взяли участь студенти, аспіранти та наукова молодь Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Національного технічного університету України «Політехнічний інститут», Національного університету біоресурсів і природокористування України тощо. Особливо тепло вітали гостей з інших міст – Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича, Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара, Національного центру насінництва та сортівиведення (м. Одеса).

За результатами дводенної роботи Конференції та засідання журі було визначено переможців, які отримали відзнаки та численні оплески аудиторії. Абсолютним лідером змагань з результатом 8,75 балів із 10 стала Ірина Горак (лабораторія сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії). Друге місце з однаковим результатом (8,5) поділили Анна Хоменко та Анна Мазанова, які також представляли й одну лабораторію – лабораторію медичної біохімії. Третє місце з великим відривом від переслідувачів посів Кирило Пиршев (8,4) з лабораторії нанобіотехнологій Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна.

Попри те, що гостей з інших міст цього року було не надто багато, журі відзначило високий науковий рівень їхніх робіт і присудило відзнаки за активну участь Поліні Жердевій (Дніпропетровськ) та Тетяні Макаренко (Чернівці). Третю відзнаку за активну участь присуджено Сергію Вишневіському з Національного університету біоресурсів і природокористування України.

На завершення організатори Конференції побажали всім учасникам нових наукових звершень і запросили на наступну Конференцію, до якої вже і не так далеко.

За результатами таємного голосування журі визначило переможців конференції:

I місце

Горак Ірина Романівна за роботу: Functional properties of mouse 4t1 breast adenocarcinoma cells depend on adapter protein Ruk/CIN85 expression level (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

II місце

Мазанова Анна Олександрівна за роботу: Synthesis of 25OHD₃-KLH conjugate and obtaining anti-25OHD₃ polyclonal antibodies (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

Хоменко Анна Вікторівна за роботу: Vitamin D₃ and osteotropic cytokines in regulation of bone homeostasis at glucocorticoid-induced osteoporosis (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

III місце

Пиршев Кирило Олександрович за роботу: Lipids dynamics in plasma membrane on live and apoptotic cells (Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України).

За активну участь нагороджено грамотами:

Вишневського Сергія Георгійовича за роботу: Біохімічні показники крові індичат за сечокислового діатезу (Національний університет біоресурсів і природокористування України).

Макаренко Тетяну Олександрівну за роботу: Корекція гострих уражень печінки моноетаноламіном амідів стеаринової кислоти (Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича).

Жердєву Поліну Іванівну за роботу: Зміна електролітного складу крові і сечі в шурів з моделлю пухлинного росту за введення їм кластерної сполуки ренію з ферулатним лігандом (Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара).

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *NOX* ТА ПРОДУКУВАННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У КЛІТИНАХ АДЕНОКАРЦИНОМИ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ ЛІНІЇ MCF-7 З НАДЕКСПРЕСІЄЮ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk/CIN85

А. В. БАЗАЛІЙ, Л. Б. ДРОБОТ

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

NADPH-оксидази (Nox) залучені до реалізації низки біологічних відповідей клітин, таких як проліферація, міграція, виживання, а також беруть участь у розвитку патологічних процесів, зокрема онкологічних захворювань. Для активування ензиматичної активності NADPH-оксидази утворюють комплекси із цитоплазматичними та мембраноасоційованими субодинамиціями. У 2009 році за допомогою мас-спектрометричного аналізу співробітниками лабораторії сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна у співпраці з польськими колегами було встановлено, що з однією із цитоплазматичних субодинамиць, організатором NADPH-оксидазного комплексу Tks4, взаємодіє адаптерний протеїн Ruk/CIN85. У подальших експериментах було підтверджено взаємодію двох протеїнів за допомогою реакції імунопреципітації та GST *in vitro* pull down аналізу.

Нами встановлено, що апоцинінзалежне продукування активних форм кисню (АФК) в пухлинних клітинах різного тканинного походження (MCF-7, MDA-MB 231, HT-29) корелює з рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Для з'ясування можливих змін у рівні експресії генів, що кодують різні форми каталітичних субодинамиць NADPH-оксидазного комплексу (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5,

Duox2), залежно від рівня експресії Ruk/CIN85, було використано кількісну ПЛР у реальному часі. Показано, що в стабільних субклонах аденокарциномних клітин грудної залози людини лінії MCF-7 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 експресуються чотири гени – *Nox1*, *Nox2*, *Nox5* та *Duox2*. Продемонстровано, що у клітинах субклонів із високим рівнем експресії Ruk/CIN85 (G4 і G10) значно більше утворюється мРНК *Nox1* та *Nox2*, ніж у клітинах дикого типу та субклону D4 з низьким рівнем експресії Ruk/CIN85. Також спостерігалось значне зниження вмісту мРНК відповідних NADPH-оксидаз у клітинах G4, інфікованих shRNA-лентівірусом, специфічним до Ruk/CIN85. Водночас, рівень експресії мРНК *Nox5*, навпаки, знижується з підвищенням вмісту досліджуваного адаптерного протеїну. В клітинах субклону G4 з високим рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 також відмічено значне зростання вмісту мРНК *Duox2* порівняно з клітинами дикого типу, субклонів D4 і G10 та його зниження за умов siRNA інтерференції Ruk/CIN85.

Одержані експериментальні дані свідчать про те, що підвищене продукування АФК в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 корелює з диференційними системними змінами у рівні експресії генів *Nox*.

УДК 543.424 + 577.27

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ IgG ІЗ РЕКОМБІНАНТНИМ ПРОТЕЇНОМ А *Staphylococcus aureus*, ІММОБІЛІЗОВАНИМ НА СЕНСОРНІЙ ПОВЕРХНІ СПЕКТРОМЕТРА ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

А. О. БАХМАЧУК^{1,2}, О. Б. ГОРБАТЮК², О. Е. РАЧКОВ²

¹ННЦ «Інститут біології», Київський національний
університет імені Тараса Шевченка Україна;
e-mail: a.bakhtachuk@gmail.com;

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

Розробка імуносенсорів є актуальним і важливим завданням, оскільки його успішне вирішення дасть змогу істотно покращити діагностику хвороб, контроль якості харчових продуктів тощо. Однак за іммобілізації антитіл на сенсорній поверхні зазвичай спостерігають зниження їхньої антигензв'язувальної активності. Головними причинами цього вважають випадкову орієнтацію антитіл та стеричні обмеження, що мають місце завдяки наявності поверхні. Щоб запобігти цьому, можна створити проміжний шар, який включав би в себе імуноглобулінзв'язувальні протеїни, наприклад, поверхневий протеїн А *Staphylococcus aureus*. Введення залишку цистеїну в рекомбінантний протеїн А має сприяти його ефективнішій іммобілізації на золотій поверхні. Таким чином, мета цієї роботи – дослідити процес іммобілізації рекомбінантного поверхневого протеїну А *Staphylococcus aureus* із додатково введеним на С-кінці залишком цистеїну (SPA-Cys) та взаємодію імуноглобулінів з іммобілізованим SPA-Cys.

SPA-Cys було одержано синтезом в *E. coli* та очищено методом металоафінної хроматографії. Біологічну активність імунокомпонентів, які було використано в цьому дослідженні, перевіряли імуноензимним аналізом. Молекулярні взаємодії між імунокомпонентами вивчали за допомогою проточної вимірювальної комірки спектрометра поверхневого плазмонного резонансу (ППР) «Плазмон-4м».

Було сконструйовано рекомбінантний протеїн SPA-Cys, який містить п'ять імуноглобулінзв'язувальних доменів протеїну А *Staphylococcus aureus*, послідовність олігогістидину для його хроматографічної очистки та С-кіцевий залишок цистеїну. Одержаний SPA-Cys зберігав свою імуноглобулінзв'язувальну активність. Введення розчинів різної концентрації SPA-Cys у вимірювальну комірку спектрометра ППР з попередньо очищеною золотою сенсорною поверхнею спричинювало відгуки, величина яких залежала від концентрації SPA-Cys і відповідала рівню поверхневої щільності іммобілізації від 0,35 до більш ніж 1 нг/мм². Блокування місць неспецифічної сорбції на сенсорній поверхні за допомогою протеїнів молока дозволило сформувати біоселективний елемент імуносенсора, селективність якого перевіряли введенням у вимірювальну комірку різних протеїнів. Тільки введення IgG людини спричинювало помітний сенсорний відгук, залежний від концентрації IgG. За допомогою двох підходів було розраховано рівноважні константи взаємодії імуноглобулінів з іммобілізованим SPA-Cys.

Таким чином, досліджено процес іммобілізації SPA-Cys на сенсорній поверхні спектрометра ППР та його взаємодію з IgG людини. Сформований біоселективний елемент імуносенсора виявляє досить високу селективність, чутливість детектування та відтворюваність результатів.

ВІТАМІННИЙ СТАТУС ГЛИБОКО НЕДОНОШЕНИХ ДІТЕЙ*О. Ю. БОРЕНКО¹, О. Л. ЛЯННА², Ю. А. ШЕВЧЕНКО²**¹Інститут педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України, Київ;
e-mail: olga_313@mail.ru;**²ДЗ «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України*

Відомо, що після народження 80–90% недоношених новонароджених мають неврологічні відхилення, зокрема для немовлят, які вважаються недоношеними III ступеня (недоношені з низькою та екстремально низькою масою тіла до 1500 г) ця цифра сягає 100%. За даними літератури, формування синдромів перинатального ушкодження ЦНС у недоношених новонароджених відбувається дещо по-іншому, ніж у доношених дітей, що зумовлено особливим реагуванням незрілих структур головного мозку на патологічні перинатальні фактори. Особливо важливими в цьому плані є перші чотири тижні життя новонароджених з перинатальним ураженням, коли відбувається формування порушень, які надалі визначатимуть перебіг та результат захворювання. Вважається, що розвиток та впровадження комплексних профілактичних та реабілітаційних заходів, спрямованих на перешкодження хронізації патологічного процесу і мінімізацію важких наслідків захворювання дозволяють зменшити стійкі порушення здоров'я та інколи навіть вивести дитину зі стану інвалідності.

Продовжуючи серію досліджень щодо вивчення біохімічних механізмів, які лежать в основі неврологічних порушень недоношених дітей, в цій роботі представлено результати визначення вітамінного статусу сироватки крові

глибоко недоношених дітей: 1 – група дітей з екстремально низькою масою тіла (менше 1000 г) ($n = 25$), 2 – група дітей з низькою масою тіла (до 1500 г) ($n = 26$). Діти, які досліджувались (51 особа) надходили у важкому та надзвичайно важкому стані. Вітамінний статус оцінювали за показниками концентрації вітамінів С, В₁, В₆, В₁₂ та D₃ у сироватці крові. Встановлено, що на момент народження концентрації вітамінів, що досліджувались, знаходились в межах нормальних показників та мали найменше значення в діапазоні допустимих нормальних значень. Виключення становили показники у немовлят, які померли протягом першого місяця життя, для них спостерігались відхилення концентрацій вітаміну D₃ в сироватці крові, які були майже на 30% меншими за найнижчу границю норми та становили $24,4 \pm 9,6$ нМ. У групі 2 визначено концентрації вітамінів С, В₁, В₆ та В₁₂ вищими за показники першої групи відповідно на 41, 41, 32 та 25%. Для всіх досліджуваних вітамінів протягом наступних тижнів встановлено підвищення їх концентрації.

Одержані дані свідчать про низький рівень метаболічної компенсації дітей з екстремально низькою масою тіла. Відсутність своєчасної корекції вітамінного статусу може мати негативні наслідки розвитку та критичні ускладнення, в тому числі й з боку ЦНС.

УДК 579.841.11.222

ФУНКЦІОНАЛЬНА І БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *Pantoea agglomerans*

Т. В. БУЛИГІНА

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

Грамнегативна бактерія – *Pantoea agglomerans*, яка належить до родини *Enterobacteriaceae*, спорідненість якої з типовим родом *Escherichia* становить 25%. Це доволі велика спорідненість порівняно з іншими родами, такими як *Budvicia*, *Pragia*, *Moellerella* та *Xenorhabdus*. Відомо, що основним фактором патогенності грамнегативних бактерій є ліпополісахариди (ЛПС) – основний структурний компонент їхньої клітинної оболонки. Оскільки в літературі немає даних про дослідження ліпополісахаридів *P. agglomerans*, то метою наших досліджень було вивчити деякі аспекти функціональної та біологічної активності ліпополісахаридів 7 штамів *P. agglomerans*.

ЛПС із 7 досліджуваних штамів *P. agglomerans* було виділено методом водно-фенольної екстракції. Визначення вмісту вуглеводів проводили за Dubois et al. Жирні кислоти ідентифікували в препаратах ЛПС на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert. Чутливість бактерій *P. agglomerans* до поліміксину В визначали диско-дифузійним методом. Дослідження антигенної активності препаратів ЛПС проводили за допомогою подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні, а токсичну дозу визначали за внутрішньочеревного введення їх білим мишам. Вивчали вплив різних концентрацій ліпополісахаридів *P. agglomerans* на адгезію клітин *E. coli* до нативних еритроцитів кроля.

Хімічна ідентифікація препаратів ліпополісахаридів показала, що вони характе-

ризуються різним відносним виходом від 5,2 до 14,0% залежно від штаму. У досліджуваних препаратах був визначений доволі високий вміст вуглеводів – від 22 до 54%, КДО – від 0,39 до 2,22% та гептоз – від 3,3 до 14,0%, які є обов'язковими компонентами молекули ЛПС. Аналіз жирнокислотного складу показав присутність жирних кислот, які містять у ланцюзі від 12 до 16 атомів вуглецю. Домінуючою в ліпідах А ЛПС всіх досліджуваних штамів була 3-ОН-С14:0. Оскільки всі досліджувані штамів *P. agglomerans* виявилися чутливими до дії поліміксину В, то можна зробити висновок, що ліпополісахариди, одержані з цих штамів, у складі ліпиду А не містять такий замісник як 4-аміно-4-дезоксид-арабінозу. Одним із шляхів зміни функціональних і біологічних властивостей ліпополісахаридів є хімічна модифікація. Як модифікатори було використано комплекси германію, олова з бідентатними гідразонами диметиламінобензальдегіду та олова з тридентатними гідразонами 2-гідроксибензальдегіду. За дослідження серологічної активності та токсичності модифікованих комплексами германію та олова ліпополісахаридів було встановлено, що деякі з них втратили серологічну активність у зв'язку з екрануванням антигенної детермінанти та повністю нейтралізували токсичну активність досліджуваних ліпополісахаридів *P. agglomerans*. Останні знижували кількість адгезованих клітин *E. coli* на еритроцитах кроля шляхом конкуренції за зв'язування з їхніми поверхневими структурами.

БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ІНДИЧАТ ЗА СЕЧОКИСЛОГО ДІАТЕЗУ

С. Г. ВИШНЕВСЬКИЙ

*Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: esculat@bigmir.net*

Вирощування індиків м'ясних кросів має низку особливостей, які пов'язані з умовами їх утримання, розведення, годівлі та експлуатації. Важливе значення при цьому має своєчасна діагностика та профілактика в індичат захворювань різноманітної етіології, найпоширенішим з яких є сечокислий діатез.

Метою роботи було дослідити біохімічні показники крові клінічно здорових та хворих на сечокислий діатез індичат кросу Б'юті-8 у віці двох місяців за екстенсивної технології вирощування у ПП «Gander» (Київська область).

Встановлено, що вміст гемоглобіну в крові клінічно здорових індичат становив $89,00 \pm 1,41$ г/л, тоді як в індичат із симптомами сечокиислового діатезу цей показник був в 1,23 раза вірогідно нижчим, що вказує на наявність гіпоксії в їхньому організмі.

У плазмі крові клінічно здорових індичат вміст загального протеїну становив $43,53 \pm 1,26$ г/л, а у хворих на сечокислий діатез індичат він був у 1,2 раза вірогідно вищим. Це може вказувати на порушення морфофункціонального стану печінки в індичат за вказаної патології.

Про ураження клітин печінки у хворих на сечокислий діатез індичат свідчать результати дослідження активності аланін- (АлАТ) і аспартатамінотрансфераз (АсАТ). Так, у плазмі крові клінічно здорових індичат активність АлАТ становила $0,31 \pm 0,02$ ммоль/год/л, а АсАТ – $1,07 \pm 0,17$ ммоль/год/л, тоді як в індичат із симптомами сечокиислового діатезу активність АлАТ була в 1,70, а активність АсАТ – у 1,63 раза вірогідно вищою. Одержані результати вказують на некроз клітин печінки у хворих на сечо-

кислий діатез індичат, що може бути наслідком гострого або хронічного гепатиту, або жирової дистрофії печінки.

Рівень загального кальцію в плазмі крові клінічно здорових і хворих на сечокислий діатез індичат становив $2,67 \pm 0,06$ та $3,06 \pm 0,04$ мМ відповідно, а фосфору неорганічного – $1,47 \pm 0,04$ та $2,27 \pm 0,05$ мМ відповідно. Зниження в 1,35 раза співвідношення кальцію до фосфору в крові хворих на сечокислий діатез індичат вказує на порушення всмоктування їх в шлунково-кишковому тракті внаслідок розладу процесів травлення.

Рівень сечової кислоти у плазмі крові клінічно здорових індичат становив $0,26 \pm 0,01$ мМ, тоді як у хворих на сечокислий діатез індичат він був у 1,58 раза вірогідно вищим. Зростання вмісту сечової кислоти в плазмі крові птиці (гіперурикемія) спостерігається у разі підвищеного синтезу її з нуклеїнових кислот. Це має місце за надмірного згодовування птиці кормів тваринного походження та обмеженого згодовування зелених кормів, під час захворювань, які супроводжуються посиленням розпадом нуклеопротеїдів, а також внаслідок зменшення виділення сечової кислоти із сечею за патології нирок (нефрит, нефроз).

Результати досліджень біохімічних показників крові індичат за екстенсивної технології вирощування вказують на значні порушення метаболізму в організмі птиці, які призводять до розвитку сечокиислового діатезу. Це потребує розробки відповідних профілактичних заходів, на що будуть спрямовані наші подальші дослідження.

УДК 577.218; 577.215

RAD50 ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ПРЕДИКТИВНИЙ МАРКЕР ПРОТИПУХЛИННОЇ ТЕРАПІЇ

К. В. ГАВРИШ¹, І. В. ДОСЕНКО², В. В. ФІЛОНЕНКО³, Р. Г. КІЯМОВА³

¹ННЦ «Інститут біології», Київський національний
університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: kristinahavrysh@gmail.com;

²Національний інститут раку МОЗ України, Київ;

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

Пухлиноасоційовані антигени (ПАА) – протеїни, які розпізнаються імунною системою як чужорідні і є потенційними пухлинними маркерами. Протеїн RAD50, який входить до складу репараційного комплексу RAD50-NBS1-MRE11, був ідентифікований методом SEREX (serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning) як автоантиген під час скринінгу кДНК-бібліотеки медулярної карциноми молочної залози (МЗ) й охарактеризований як ПАА в широкомасштабному алогенному скринінгу. Нещодавно стало відомо, що мутації в гені *RAD50* призводять до розвитку раку молочної залози (РМЗ), а його інгібування shRNA погіршує репарацію пошкодженої ДНК і підвищує чутливість клітин РМЗ до цисплатину. Оскільки антитіла до антигену RAD50 виявляються не в усіх хворих на РМЗ, ми припустили, що рівень експресії гена *RAD50* може бути різним у пухлинах хворих на РМЗ.

Метою нашої роботи було визначення рівня експресії гена *RAD50* в пухлинах МЗ порівняно з умовно нормальними тканинами МЗ.

Для колекції тканин МЗ у 19 пацієнтів було відібрано зразки 17 злоякісних, 2 доброякісних пухлин та 19 зразків умовно нормальних тканин із супутніми даними. Створено їх реєстр, що включає перелік зразків, повний діагноз та рівень експресії рецепторів. Сумарну РНК зі зразків виділяли системою екстракції «miRNA

Isolation Kit» (Thermo Scientific - TS), кДНК синтезували з використанням комерційного набору «RevertAid RT Reverse Transcription Kit» (TS). Кількісну ПЛР у режимі реального часу проводили на приладі RealTime CFX 96 (Bio-Rad) з використанням комерційного набору «SYBR® Select Master Mix» (TS). Ефективність кожної ПЛР визначали за допомогою програмного забезпечення RStudio. Обрахунок рівня експресії цільового гена проводили за методами Лівака, Пфаффла, ΔCT методу (BioRad) з модифікаціями.

В процесі роботи виділено фракцію сумарної РНК із 36 зразків та синтезована відповідна кДНК. На кДНК проведена кількісна ПЛР для оцінки експресії цільового гена *RAD50* в пухлинах РМЗ. Як референтні було обрано гени *PUM1* і *ACTB*. Внаслідок проведених досліджень виявлено гетерогенний рівень експресії гена *RAD50* в пухлинах МЗ, причому в 10 із 13 зразків він був переважно знижений порівняно з навколишньою нормальною тканиною МЗ. Гетерогенний рівень експресії гена *RAD50* в пухлинах МЗ може бути однією з причин різної чутливості хворих на РМЗ до дії цисплатину. Відповідно *RAD50* може розглядатися як потенційний предиктивний маркер ефективності протирадикальної терапії хворих на РМЗ, що потребує детального вивчення його експресії, в тому числі на протеїновому рівні з використанням більшої кількості зразків.

Робота виконана за рахунок коштів гранту РНФ №15-15-20032.

ЗМІНИ СПЕКТРА КОРОТКОЛАНЦЮГОВИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ ТА ЕКСПРЕСІЇ РЕЦЕПТОРІВ В ТОВСТІЙ КИШЦІ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЦЕФТРИАКСОНУ

*Ю. В. ГОЛОТА¹, Н. В. ДЗЮБЕНКО¹, А. М. ОСТАПЧУК²,
А. В. ПУТНИКОВ¹, Т. М. СЕРГІЙЧУК¹, Г. М. ТОЛСТАНОВА¹*

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: juliagolota@gmail.com;

²Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

В останні роки набуває актуальності вивчення процесів обміну низькомолекулярними метаболітами між індигенною мікробіотою і макроорганізмом. Коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) є одними з найважливіших метаболітів кишкової мікрофлори. Дослідження спектра та кількісних показників вмісту КЛЖК у фекальному біопаті та процесів всмоктування колоноцитами може стати основою для розробки принципово нових підходів оцінки стану мікробіоценозу та участі його метаболітів у забезпеченні локальних і системних функцій макроорганізму. Тому метою роботи було дослідити спектр та профіль КЛЖК фекального біоптату лабораторних щурів, а також рівень експресії та розподілу рецепторів до КЛЖК після 14-добового введення антибіотика цефтріаксону (Цф).

Дослідження було проведено на щурах-самцях лінії Вістар ($n = 6$, 180–230 г). Цефтріаксон (300 мг/кг, в.м.) вводили щоденно впродовж 14 днів. Аналіз спектра КЛЖК здійснювали на газовому хроматографі з мас-детектором. Рівень експресії та розподіл рецепторів до КЛЖК оцінювали імуногістохімічно з антитілами Rabbit FFA2 та FFA3.

Після введення Цф абсолютний вміст КЛЖК ($\sum(C_2-C_6)$) знижувався в 7,8 раза ($P < 0,05$), що є свідченням зміни активності кишкової мікробіоти. Різко знижувалась абсолютна кількість кислот: масляної (в 9,3), пропіонової (в 15,0) та оцтової (в 2,8) раза ($P < 0,05$). Аналіз профілю C_2-C_4 кислот, які становлять основний внесок у загальний пул КЛЖК показав превалювання відносного вмісту оцтової кислоти за зниження частки пропіонової та масляної кислот після введення Цф, що свідчить про пригнічення активності анаеробної цукролітичної ланки мікробіоти. Це було підтверджено зниженням в 5,9 раза значення анаеробного індексу.

Введення Цф зменшувало в 2 рази кількість FFA2 та FFA3 рецепторів до КЛЖК, які локалізовані на поверхні епітеліоцитів крипти слизової оболонки товстої кишки.

Встановлено, що введення Цф призводить до порушення кількісного складу та співвідношення КЛЖК у фекальному біопаті товстої кишки щурів, що асоціювалось зі зниженням кількості рецепторів до КЛЖК в слизовій оболонці товстої кишки.

UDC 577.218+616-006

FUNCTIONAL PROPERTIES OF MOUSE 4T1 BREAST ADENOCARCINOMA CELLS DEPEND ON ADAPTER PROTEIN RUK/CIN85 EXPRESSION LEVEL

*I. HORAK¹, G. PASICHNYK¹, D. GERASHCHENKO¹, D. PETUKHOV¹,
N. SHABAS², L. DROBOT¹, L. KNOPFOVA³, L. BORSIG⁴*

¹*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: iryna.horak@gmail.com;*

²*Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine;*

³*Masaryk University, Brno, Czech Republic;*

⁴*University of Zurich, Switzerland;*

Adapters are known as multidomain proteins which coordinate supramolecular complexes assemblage. One of adapter proteins called Ruk/CIN85 was demonstrated to be involved in essential cell processes such as proliferation, migration, intracellular signalling. Previously, it was found that overexpression of Ruk/CIN85 in human MCF-7 breast adenocarcinoma accompanied by reduction in proliferative potential, increasing resistance to anticancer drugs, migration potential, ongoing activation of specific signaling pathways. The syngeneic murine model originated from mouse 4T1 breast adenocarcinoma was used in order to study the role of Ruk/CIN85 in cancerogenesis *in vivo*.

The aim of our study was to investigate the effect of different levels of Ruk/CIN85 expression on cell proliferative potential and their migratory and invasive properties.

For generation Ruk/CIN85-overexpressing sublines 4T1 cells were transfected with pRc/CMV-Ruk1 plasmid. Ruk/CIN85 expression was suppressed with lentiviral construction pLKO.1-shRuk/CIN85 R22. Transfection/infection was followed by selection with specific drugs G418 and puromycin. Expression level of Ruk/CIN85 was determined both

with Western-blot analysis and quantitative PCR. Proliferative potential was evaluated by direct cell counting with trypan blue and MTT test. The level of cytokine CCL-2 expression was measured using quantitative PCR, and the activation level transcription factor NF- κ B was assessed by the number of phosphorylated form of p65 using Western-blot. For cell migration evaluation *in vitro* scratch wound healing assay was used. Invasiveness of received sublines was assessed by effectiveness of migration through Matrigel layer or endothelial cells layer in the modified Boyden chamber.

At first, we generated sublines of 4T1 cells with different Ruk/CIN85 expression levels. Cells with Ruk/CIN85 overexpression were demonstrated to proliferate faster than control cells and Ruk/CIN85 suppression led to increasing in cell proliferation. Also positive correlation between level of Ruk/CIN85 expression and migration and invasion properties was established.

These data suggest that adapter protein Ruk/CIN85 is involved in regulation of physiological activities of tumor cells such as proliferation, invasion and migration.

ДОСЛІДЖЕННЯ ФРАКТАЛЬНОЇ РОЗМІРНОСТІ ЧУТЛИВИХ ТА РЕЗИСТЕНТНИХ ДО ДІЇ ДОКСОРУБІЦИНУ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ, ЕКСПОНОВАНИХ У МАГНІТНОМУ ПОЛІ

*О. Ю. ГОРОБЕЦЬ¹, С. В. ГОРОБЕЦЬ¹, В. Ф. ЧЕХУН²,
О. В. МЕДВЕДЄВ¹, О. Б. БЕРЕЗІН¹, О. М. ГАРКАВЕНКО¹*

*¹Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут»;
e-mail: sasha1.0@yandex.ua;*

*²Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ*

У 1995 році під час досліджень морфології злоякісних клітин було виявлено наявність у ракових клітинах фрактальної розмірності, нехарактерної для звичайних здорових клітин (Pierard G. E., 1995). Подальші дослідження підтвердили одержані результати (Sedivy R., 1999; Wax A., 2003).

Метою цієї роботи було визначення діапазонів фрактальної розмірності клітин раку молочної залози людини, чутливих і резистентних до дії доксорубіцину, підданих дії магнітного поля, що, ймовірно, дозволить зробити висновок про можливість застосування аналізу фрактальної розмірності злоякісних клітин для визначення резистентності або чутливості до дії доксорубіцину.

У ході виконання роботи було досліджено клітини раку молочної залози людини, чутливі (MCF-7S) і резистентні (MCF-7/Dox) до дії доксорубіцину. Центрифуговані препарати клітин обох ліній було експоновано в магнітному полі з величиною індукції 160 мТл протягом 1,5 год. Вивчення фрактальної розмірності окре-

мих клітин проводили за допомогою аналізу АСМ зображень програмою, написаною у середовищі Mathcad.

За аналізу фрактальної розмірності ракових клітин молочної залози, резистентних до дії доксорубіцину і підданих дії магнітного поля, було виявлено, що діапазон фрактальних розмірностей для них становить 1,10–1,18 із середнім значенням $\langle D \rangle = 1,160$. Діапазон фрактальних розмірностей для клітин лінії MCF-7S (чутливих до дії доксорубіцину), що також експонувались у магнітному полі, становить 1,2–1,36 із середнім значенням $\langle D \rangle = 1,273$.

Встановлено, що діапазони їх фрактальних розмірностей відрізняються і не перекриваються між собою. При цьому для клітин лінії MCF-7S характерний діапазон фрактальної розмірності з $D = 1,2–1,36$, у той час як для клітин лінії MCF-7/Dox – діапазон $D = 1,10–1,18$. Діапазони цих клітинних ліній не перекриваються, що можна використати для визначення чутливості ракових клітин молочної залози до дії доксорубіцину.

UDC 577.112.083

ONE STEP PURIFICATION METHOD OF FIBRINOGEN α C-REGION FRAGMENTS

A. S. DUBOVETSKYI

*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: dubovetskiy@i.ua*

Earlier we obtained two monoclonal antibodies (mAbs) against fibri(noge)n α C-region which proved to inhibit specifically fibrin polymerization (Pozniak, 2012). We suggested that this inhibition is realized by blocking their epitopes coinciding with fibrin polymerization sites in α C-region. Immunoblot showed that these mAbs reacted with two products of fibrinogen hydrolysis by plasmin with molecular weight of 10 kDa and 24 kDa. The aim of the work was to develop a new isolation method of 10 kDa and 24 kDa fragments of α C-region for localization of epitopes of two mAbs.

Fibrinogen was obtained from fresh human plasma according to (Varetskaya, 1960) using our modifications. The purified fibrinogen was diluted in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4 containing 0.2 M NaCl, the final fibrinogen concentration was 10 mg/ml. Plasmin in concentration of 0.03 CU per mg of fibrinogen was added. Incubation was carried out at 37 °C for 30 minutes. Then ϵ -aminocaproic acid in final concentration 0.1 M and Contrical© (250 IU/ml probe) were added to hydrolysate. The probes were

filtered with sterile syringe filter and injected in Agilent 1100 HPLC system with the usage of a guard column and two Zorbax GF-250 columns connected in series, the mobile phase was 0.01 M KH_2PO_4 , pH 7.3, 0.14 M NaCl and 5% methanol. Fraction of 10 kDa fragment was concentrated by method "TCA-DOC precipitation with acetone wash" (Peterson, 1977). Fraction of 24 kDa was concentrated on 10 kDa molecular weight cut-off centrifugal concentrators. Both fragments were analyzed by Tricine-SDS-PAGE (Schagger, 2006). The yield of electrophoretically pure 10kDa fragment was 70% and 24kDa - 86%. The proposed one step purification procedure of both fragments has advantage as compared with previous methods of fibrinogen α C-region fragments obtaining (Lau, 1993; Pozniak, 2012).

As a result of this work new fibrinogen polymerization sites in α C-region will be localized. The mAbs are planned to be used for a design of two test-systems for quantification of soluble fibrin in human blood plasma.

НОВІ ЕФЕКТИ АЛОСТЕРИЧНОГО МОДУЛЯТОРА GABA_B-РЕЦЕПТОРА – гас-ВННН

М. В. ДУДАРЕНКО, М. В. ПІСКОВА, Н. Г. ПОЗДНЯКОВА

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

Позитивні алостеричні модулятори GABA_B-рецепторів мають великий терапевтичний потенціал для лікування станів тривоги, депресії тощо. Активація пресинаптичних GABA_B-рецепторів уповільнює вивільнення γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) та інших нейромедіаторів. Алостеричні модулятори змінюють ефекти активованих рецепторів, не впливаючи на неактивовані рецептори. Метою нашої роботи було дослідити вплив алостеричного модулятора GABA_B-рецепторів – гас-ВННН на ключові характеристики ГАМК-ергічної передачі. Дослідження проводились на ізольованих нервових терміналях кори та гіпокампа шурів – синаптосомах.

В роботі були застосовані такі методи: виділення синапсом головного мозку шурів за методом Котмана (препаративна біохімія), вивчення вивільнення та накопичення нейромедіатору за допомогою радіоізотопного методу із використанням міченої [³H]ГАМК, а також спектрофлуориметрія (з використанням потенціал- та рН-чутливих флуоресцентних барвників).

Експерименти проводили на синаптосомах кори та гіпокампа мозку дорослих шурів-самців лінії Wistar з масою тіла 100–120 г.

Було показано, що позаклітинний рівень [³H]ГАМК, який відображає баланс між вивільненням та накопиченням нейромедіатору, значно збільшувався у присутності гас-ВННН

(в концентраціях 10–30 μ M) – з 17 до 30% загальнонакопиченої [³H]ГАМК як у корі, так і в гіпокампі. Початкова швидкість накопичення [³H]ГАМК синаптосомами гіпокампа та кори знижувалася внаслідок дії алостеричного модулятора, гас-ВННН (в концентраціях 10 та 30 μ M), на 12 та 77% відповідно. У присутності блокатора ГАМК-транспортера GAT-1, NO-711, показано, що як у корі, так і в гіпокампі гас-ВННН (30 μ M) збільшує тонічне вивільнення [³H]ГАМК синаптосомами з 21,7% (у контролі) до 29,8%. Виявлено, що гас-ВННН не посилює інгібування екзцитозу [³H]ГАМК баклофеном. Також гас-ВННН спричинював дозозалежну деполяризацію плазматичних мембран синапсом та дисипацію протонного градієнта синаптичних везикул, що було показано за допомогою флуоресцентних барвників родаміну G6 та акридину оранжевого відповідно.

Таким чином, виявлені нами ефекти гас-ВННН на функціонування ГАМК-ергічних нервових закінчень не були пов'язані з модуляцією пресинаптичних рецепторів GABA_B. Тому стратегія розробки ліків на основі позитивної алостеричної модуляції GABA_B-рецепторів має включати в себе усунення вищезазначених побічних ефектів гас-ВННН у пресинапсі, і, навпаки, ці нові властивості алостеричного модулятора можуть бути використані в новітніх підходах.

УДК 541.49: 546.719:615.277:616.006.699

ЗМІНА ЕЛЕКТРОЛІТНОГО СКЛАДУ КРОВІ І СЕЧІ В ЩУРІВ З МОДЕЛЛЮ ПУХЛИННОГО РОСТУ ЗА ВВЕДЕННЯ ЇМ КЛАСТЕРНОЇ СПОЛУКИ РЕНІЮ З ФЕРУЛАТНИМ ЛІГАНДОМ

П. ЖЕРДСЬКА, А. НАУМЕНКО, С. БАБІЙ, С. СЕМЕНОВ, Н. ШТЕМЕНКО

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

Ферулова кислота є загально визнаним органічним антиоксидантом із протипухлинними властивостями (Graf E., 1992). Було припущено, що поєднання цієї сполуки із кластером ренію буде мати адитивний ефект у разі гальмування росту пухлини з одночасною нормалізацією функціонального стану нирок, показників системи червоної крові і кісткового мозку, як було виявлено для інших кластерних сполук ренію (Воронкова 2015; Shtemenko 2008–2015; Бабій 2012, 2014). Оскільки саме нирки відповідають за регуляцію гемопоезу, виведення токсичних метаболітів, а також регуляцію осмолярності плазми крові, це є досить важливим для збереження цілісності клітин крові.

З огляду на вищенаведене, метою роботи, було дослідити електролітний склад крові та сечі, екскрецію окремих електролітів і розрахувати осмолярність плазми крові щурів з карциномою Герена Т8 за введення цисплатину (ЦП) і цис-біс-диметилсульфоксидотетрахлоро-ди- μ -карбоксилатдиренію (III) з феруловою кислотою цис- $\text{Re}_2(\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCOO})_2\text{Cl}_4 \cdot 2\text{DMSO}$ (Re).

В умовах розвитку пухлини і введення ЦП дослідним щурам виявлено зниження інтенсивності сечоутворення, кліренсу ендогенного креатиніну і відносної реабсорбції води. Як наслідок в сечі щурів цієї групи визначався підвищений рівень загального протеїну, альбуміну, глюкози, а

також ензимів лактатдегідрогенази і гамма-глутамілтрансферази. Під час дослідження електролітного складу крові в цій групі спостерігали зростання концентрації калію, хлоридів та зниження вмісту кальцію і натрію порівняно з інтактними щурами. Виражені гіпонатріємія і гіперкаліємія за введення ЦП щурам-пухлиноносцям призводили до зменшення об'єму циркулюючої плазми, зменшення її осмолярності, збільшення протеїну в крові, гемоглобіну і рівня гематокриту. Слід відмітити значне зростання екскреції кальцію, калію і фосфатів за введення ЦП порівняно з контролем. При цьому осмолярність плазми порівняно з контролем знижувалась втричі, а осмолярність сечі зростала в 5 разів. За введення дослідним тваринам наноліпосом, навантажених Re, подібних змін не відмічалось. Встановлено, що кластерні комплекси Re здатні знижувати нефротоксичний ефект ЦП. За введення змішаних наноліпосом і наночастинок, навантажених Re і ЦП досліджувані показники наближались до контрольного рівня.

Отже, одержані дані підтверджують раніше встановлену гематопротекторну властивість Re і здатність його впливати на еритропоез шляхом зменшення ниркових розладів, забезпечення нормального електролітного складу і осмолярності плазми крові. Це може свідчити про ефективність застосування комплексів ренію як допоміжних сполук під час лікування новоутворень.

ПОРІВНЯННЯ МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТРАНСФОРМОВАНИХ ТА МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПІСЛЯ ВПЛИВУ ТЕЙХОЄВОЇ КИСЛОТИ

*О. О. КАЛМИКОВА, О. І. ДЖУС, Г. М. СВІТІНА,
Г. В. ОСТРОВСЬКА, Л. В. ГАРМАНЧУК*

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

Тейхоєві кислоти (ТК) – велика група фосфатвмісних біополімерів, яка поширена в клітинних стінках грампозитивних бактерій. ТК є лігандом для Toll-like рецепторів TLR2, TLR4, TLR6 (TLR), які присутні на пухлинних і мезенхімальних стовбурових клітинах (МСК). Відомо, що TLR можуть включатися в різні етапи пухлинного росту, проте у зв'язку з неоднозначністю впливів активації TLR на трансформовані клітини вивчення зміни їхньої морфології після дії ТК на сьогодні є актуальним. Оскільки в пухлинних клітин деякі ембріональні гени активні (*Nanog*, *Oct-4*, *Sox-2*), вони подібні до стовбурових клітин. Тому порівняння окремих характеристик цих ліній клітин у культурі допоможе краще зрозуміти роль TLR за канцерогенезу та вплив ТК на стан МСК.

Культури клітин вирощували на поживному середовищі DMEM (HeLa), RPMI (Нер G2) або α MEM (культури МСК) із додаванням 10%-ї ембріональної бичачої сироватки, 2 мМ L-глутаміну, 40 мкг/мл гентаміцину. Одержання первинної культури МСК з кісткового мозку щура проводили за стандартною методикою. ТК додавали в концентрації 5 мкг/мл та інкубували 72 год. Потім клітини фарбували залізним гематоксиліном Гейденгайна, гематоксиліном Бемера, еозином, барвником Май-Грюнвальда. Морфологічний аналіз проводили за допомогою світлової мікроскопії. Морфометричні параметри вимірювали за допомогою програм Axiovision та ImageJ 1.45 на цифрових мікрофотографіях, зроблених з використанням камери Canon та інвертованого мікроскопа Axiovert 40.

У культурі інтактних клітин HeLa переважали кулясті клітини, деякі набували веретеноподібної форми (тобто мезенхімального фенотипу), а клітини Нер G2 мали полігональну форму з чітко окресленими краями та потовщеними відростками. МСК в контролі були витягнутої форми з тоненькими довгими відростками. Після дії ТК пухлинні клітини стають правильною округлої форми, збільшується їх кількість на одиницю площі, проте площа клітин зменшується. А за дії ТК на МСК відростки стають біполярно розміщеними, ядра овальної форми, площа клітини та ядра вірогідно зменшується. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС) культури клітин HeLa, Нер G2 зростає (збільшується частка популяції клітин, що готуються до поділу). ЯЦС МСК також вірогідно зростає, що свідчить про синтетичну активність ядра.

Спостерігається підвищення спорідненості цитоплазми до барвників (еозину, Май-Грюнвальда, залізного гематоксиліну) після дії ТК, що виявляється в її більш рожевому (темному) кольорі. Це може пояснюватися як наслідок зміни метаболізму, зокрема активації синтезу протеїну або деполімеризації протеїнів цитоскелета.

Згідно з морфометричними даними тейхоєва кислота стимулює проліферативну активність трансформованих клітин та підвищує синтетичну активність мезенхімальних стовбурових клітин.

УДК 577.112-022.252:616.153

ПОКАЗНИКИ ЕНДОГЕННІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ В ЩУРІВ В УМОВАХ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ НА ФОНІ АЛІМЕНТАРНОЇ НЕСТАЧІ ПРОТЕЇНУ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. БУЧКОВСЬКА, Р. О. НІКОЛАЄВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;
Інститут біології, хімії та біоресурсів, Чернівці, Україна;
e-mail: romanfromukrain@gmail.com

Синдром ендогенної інтоксикації (ЕІ) – складний багатокомпонентний процес, зумовлений накопиченням у тканинах та біологічних рідинах ендотоксинів – продуктів метаболізму в аномально високих концентраціях, медіаторів запалення, екзотоксинів, продуктів клітинної та протеїнової деградації. Ступінь вираженості ендотоксемії відображає порушення рівноваги між утворенням токсичних субстанцій в організмі та функціонуванням систем їх трансформації та елімінації. Для об'єктивної оцінки наявності ЕІ використовують визначення речовин низької та середньої молекулярної маси (РНіСММ), вміст яких, насамперед, відображає рівень патологічного протеїнового метаболізму та корелює з основними прогностичними критеріями обмінних порушень.

З метою дослідження динаміки показників ендогенної інтоксикації в умовах аліментарної нестачі протеїну щурів протягом 28 днів утримували на напівсинтетичній низькопротеїновій дієті. Гостре токсичне ураження моделювали шляхом введення *per os* ацетамінофену у вигляді суспензії в 2%-му розчині крохмально-го гелю з розрахунку 1250 мг/кг ($0,5 LD_{50}$) маси тварини протягом 2 діб. Синдром ЕІ оцінювали шляхом реєстрації вмісту та спектральних характеристик РНіСММ в діапазоні 238–300 нм екстракційно-спектрофотометричним методом.

Показано, що в групі щурів, які перебували на низькопротеїновій дієті, вміст РНіСММ в плазмі крові та еритроцитах статистично не відрізняється від показників контрольної

групи тварин, проте розподіл цих речовин за спектрами поглинання істотно змінюється. За споживання повноцінного раціону спектрограми розподілу РНіСММ у плазмі крові та еритроцитах відповідають профілю анаболічних інтермедіатів, зокрема фосфорилованих похідних цитидину, що слугують коензимами в реакціях синтезу гліцерофосфоліпідів, у разі протеїнової недостатності виражене зростання екстинкцій при 262–290 нм вказує на утворення сполук катаболічного пулу – вільних амінокислот, сечовини, креатиніну. Водночас зрушення максимуму кривої (238 нм) внаслідок зростання концентрації РНіСММ в еритроцитах характерні для компенсаційної фази ендогенної інтоксикації, за якої токсичний вплив компенсується адсорбцією метаболітів, утворених у катаболічних реакціях мембранами еритроцитів. Водночас, спектрограми розподілу РНіСММ у плазмі крові та еритроцитах тварин, яким вводили ацетамінофен та індукували токсичне ураження на фоні аліментарної нестачі протеїну, є атиповими. Відмічено, що піки спектрограм відповідають появі речовин катаболічного походження, протеїнових аддуктів, ксенобіотиків, деструктивних продуктів тканин, що свідчить про розвиток загальнотоксичної фази ЕІ.

Отже, токсичне ураження на фоні аліментарної нестачі протеїну супроводжується активацією катаболічних процесів зі збільшенням вмісту ендотоксинів в еритроцитах та плазмі крові, що призводить до розвитку синдрому ендогенної інтоксикації.

АКТИВНІСТЬ ТА КОМПОНЕНТНИЙ СКЛАД ІНГІБІТОРА ТРИПСИНУ В ТКАНИНАХ ЗЛАКОВИХ РОСЛИН ЗА ДІЇ *Fusarium graminearum* ТА ЖАСМОНОВОЇ КИСЛОТИ

О. Б. ЛИХОТА, О. О. МОЛОДЧЕНКОВА

*Селекційно-генетичний інститут «Національний центр
насіннезнавства та сортовивчення», Одеса;
e-mail: lykhota.elena@gmail.com*

Важлива роль у регуляції метаболізму структурних і каталітичних протеїнів належить протеолітичним ензимам та їх інгібіторам. Накопичення інгібіторів протеїназ у відповідь на пошкодження фітопатогенними мікроорганізмами вважається одним із захисних механізмів рослин, а одним із індукторів захисних реакцій рослин є жасмонова кислота (ЖК), яка виконує функції сигнального інтермедіату та фітогормону.

Виявлено закономірності зміни активності та компонентного складу інгібітора трипсину в проростках сортів пшениці та ячменю, що відрізнялися рівнем стійкості до збудників фузаріозу за інфікування патогеном та дії ЖК. Вивчення активності інгібітора трипсину дозволило встановити, що сорти пшениці та ячменю, відносно стійкі до збудників фузаріозу, у разі інфікування патогеном виявляють вищу активність інгібітора трипсину порівняно зі сприйнятливими генотипами (в надземній частині та коренях проростків). ЖК спричинювала індукцію інгібітора трипсину як у стійких, так і в сприйнятливих до збудників фузаріозу сортів. Проте в стійких сортів цей показник в 1,2–1,5 рази вищий, ніж у сприйнятливих сортів. За спільної дії цих двох чинників спостерігалось зростання активності інгібітора трипсину

відносно контролю та відносно інфікованих рослин як у стійких, так і у сприйнятливих сортів пшениці та ячменю.

Компонентний склад інгібіторів досліджували за допомогою афінної хроматографії, використовуючи бромціанактивовану трипсин-сефарозу 4 В з подальшим електрофорезом в ПААГ. Аналіз одержаних даних показав, що відносно інгібітора трипсину в проростках пшениці сортового поліморфізму не виявлено, тобто всі сорти характеризувалися однаковим компонентним складом інгібітора трипсину. У разі інфікування рослин збудниками фузаріозу та дії ЖК відбувалося зростання компонентів із молекулярною масою 25, 20 і 14 кДа. Під впливом фузаріозної інфекції виявлено появу протеїнового компонента з молекулярною масою близько 29 кДа.

Одержані результати та подальше вивчення змін протеїназно-інгібіторної системи за дії фітопатогену та індукторів захисних реакцій рослин дозволять удосконалити існуючі методи оцінки селекційного матеріалу щодо стійкості до збудників фузаріозу та стануть основою для створення ефективних індукторів стимулювання і управління захисними системами злакових рослин.

УДК 557.161.2+612.017.1:616-097

SYNTHESIS OF 25OHD₃-KLH CONJUGATE AND OBTAINING ANTI-25OHD₃ POLYCLONAL ANTIBODIES

A. O. MAZANOVA, I. O. SHYMANSKYI

*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: ann.mazanova@gmail.com*

Growing evidence suggests a high prevalence of vitamin D₃ deficiency across various populations the world over. Therefore, elaboration of immunochemical test systems allowing to determine serum levels of 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃), which is a marker of vitamin D₃ availability, is a promising area of biotechnology. A key problem in developing such test systems is the obtaining of antibodies to 25OHD₃, since the latter is not immunogenic compound with molecular size insufficient to be recognized by the immune system. In line of this, the purpose of the present study was to improve the existing approaches to obtain polyclonal antibodies that recognize 25OHD₃ with their subsequent characterization and application in immunochemical test systems for determining of serum 25OHD₃.

Conjugation of 25OHD₃ with carrier proteins was done by modified carbodiimide method using EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide). Purification of conjugates was performed by gel filtration. The extent of protein modification due to covalent attachment of 25OHD₃ was

determined by thin layer chromatography. Antibody titers were measured in blood serum of rabbits and mice by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The 25OHD₃-KLH (keyhole limpet hemocyanin) conjugate was designed to be used as an immunogen, while the 25OHD₃-OVA (chicken ovalbumin) conjugate was used as a coating antigen. The 25OHD₃-KLH conjugate was presented to an animal's immune system and polyclonal antibody titers with moderate specificity were obtained. The titer of rabbit anti-25OHD₃ antibodies reached a peak of 1:5000 after fifth booster injection. It was demonstrated that the titer of specific antibodies was three times lower in mice in comparison with rabbits.

Our results suggest that conjugates synthesized as described herein may successfully be used in the generation of antibodies targeting small hydrophobic 25OHD₃ molecules. Immunochemical test systems for screening studies of 25OHD₃ content in human blood serum, as a marker of vitamin D₃ availability, can be developed on the basis of obtained polyclonal anti-25OHD₃ antibodies.

КОРЕКЦІЯ ГОСТРИХ УРАЖЕНЬ ПЕЧІНКИ МОНОЕТАНОЛАМІНОМ АМІДУ СТЕАРИНОВОЇ КИСЛОТИ

*Т. О. МАКАРЕНКО¹, В. Л. БОРЩОВЕЦЬКА¹, І. О. ШМАРАКОВ¹,
М. М. МАРЧЕНКО, Н. М. ГУЛА²*

¹Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Україна;

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

e-mail: igor.shmarakov@gmail.com; ngula@biochem.kiev.ua

Зростання кількості гострих і хронічних захворювань печінки та недостатня ефективність традиційних методів їх корекції порушує питання пошуку природних дієвих гепатопротекторів. У цьому аспекті перспективною виявляється група ендогенних ліпідних молекул – амідів жирних кислот із вираженими канабіміметичними властивостями. Особлива увага приділяється ендоканабіноїдам на основі полієнових жирних кислот, які виявляють високу біологічну активність, але локальна дія та надзвичайно швидка інактивація обмежують їх використання. З огляду на високу стійкість амідів насичених жирних кислот, доцільним виявляється використання моноетаноламіну аміду стеаринової кислоти (SEA) як потенційного гепатопротектора.

Метою роботи було оцінити гепатопротекторну активність SEA за гострої гепатотоксичності, індукованої одноразовим інтраперитонеальним введенням тіоацетаміду (ТАА) в дозі 500 мг/кг.

Результати проведених досліджень показали, що пероральне введення SEA з гепатопротекторною метою після надходження в організм гепатотоксину (ТАА) не усуває токсичних ефектів та не виявляє гепатопротекторну активність. Збільшення дози SEA в діапазоні від 3 до 300 мг/кг не змінювало виявленої тенденції відсутності гепатопротекторного ефекту, що, очевидно, не залежить від введеної дози SEA. У тварин, які після введення ТАА отримували SEA, вже через 72 год спостерігалися ознаки пошкодження паренхіми печінки, виражені у підвищенні γ -глутаміл-транспептидазної активності в сироватці крові (у 3 рази) та ознаки її запальної

інфільтрації нейтрофілами, виражені у зростанні мієлопероксидазної активності в паренхімі печінки (у 10 разів). Крім того, введення SEA за вказаних умов не змінювало ступінь оксидативного пошкодження біомолекул паренхіми печінки, спричиненого гепатотоксичними метаболітами ТАА. Рівень ТБК-активних сполук, протеїнових карбонільних похідних, а також протеїнових і непротеїнових тіолів не відрізнявся від показників групи тварин, яким вводили лише ТАА.

Одержані результати спонукали нас до пошуку шляхів модифікації режиму введення SEA з метою створення умов для прояву його гепатопротекторної активності. Для цього SEA вводили в дозі 300 мг/кг за 72 год до інтраперитонеальної ін'єкції ТАА в дозі 500 мг/кг. Ця схема введення дозволила досягти вираженого гепатопротекторного ефекту, про що свідчила відсутність ознак ураження паренхіми печінки та її запальної інфільтрації (показники γ -глутамілтранспептидазної та мієлопероксидазної активності не відрізнялись від таких у тварин, яким не вводили тіоацетамід). Попереднє введення SEA блокувало розвиток тіоацетамідіндукованого оксидативного пошкодження біополімерів печінки, про що свідчили показники рівня ТБК-активних сполук, протеїнових карбонільів, а також протеїнових і непротеїнових тіолів, які знаходились на рівні показників для інтактних тварин.

Отже, результати проведених досліджень показали, що SEA проявляє гепатопротекторний ефект за тіоацетамідіндукованої гострої гепатотоксичності, але за умови його попереднього профілактичного введення.

УДК 619:615:612.017:636.2

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ «МЕМБРАНОСТАБІЛ» НА ФОРМУВАННЯ КОЛОСТРАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ТЕЛЯТ

М. О. МАРИНЮК

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: marynyuk_mo@nubip.edu.ua

У тварин з десмохоріальним типом плаценти колостральний імунітет формується лише за рахунок антитіл молозива. Колостральні імуноглобуліни (Ig) надходять із травного каналу теляти в кров у незмінному вигляді протягом 36–48 год після народження, але найактивніше протягом перших 6 годин життя.

Формування колострального імунітету залежить від здатності ентероцитів тонкого кишечника новонародженого теляти ефективно адсорбувати Ig з молозива корови-матері. Вона визначається структурно-функціональними особливостями плазмалеми ентероцитів тонкого кишечника теляти в перші години життя, що залежить від її ліпідного складу.

Метою роботи було дослідити вплив нативних ліпосом та ліпосом, насичених вітамінами А і Е у водорозчинній формі (препарат «Мембраностабіл») на ліпідний склад плазмалеми ентероцитів тонкого кишечника новонароджених телят у період формування колострального імунітету.

До випоювання молозива новонародженим телятам вміст холестеролу (ХС) та фосфоліпідів (ФЛ) в апікальній мембрані (АМ) ентероцитів порожньої кишки становив $238,5 \pm 23,2$ та $628,5 \pm 32,4$ нмоль/мг протеїну відповідно, а їх співвідношення – 0,38.

Через 6 год після народження вміст ХС в АМ ентероцитів порожньої кишки телят контрольної групи був вірогідно вищим порівняно з телятами цієї групи після народження і становив $312,0 \pm 19,7$ нмоль/мг протеїну, а вміст ФЛ – $552,0 \pm 27,8$ нмоль/мг протеїну. Співвідношення ХС/ФЛ становило 0,57. Значимо, що підвищення вмісту ХС впливає на транспортувальні властивості мембранного

бішару, знижуючи його проникність. Через 24 год після народження в АМ ентероцитів порожньої кишки телят контрольної групи вірогідно знижувався вміст ХС в 1,3 раза, а вміст ФЛ майже не змінювався порівняно з цими показниками на 6-ту годину життя телят. Співвідношення ХС/ФЛ знизилось і становило 0,42, однак в цей час формування колострального імунітету в телят майже завершилося.

Через 6 та 24 години після народження в АМ ентероцитів порожньої кишки телят першої дослідної групи, які отримували нативні ліпосоми, вміст ХС становив $229,5 \pm 21,0$ та $253,5 \pm 22,4$, ФЛ – $544,5 \pm 31,2$ та $604,5 \pm 34,3$ нмоль/мг протеїну відповідно, а співвідношення ХС/ФЛ 0,42. Тобто співвідношення ХС/ФЛ на 6- та 24-ту години життя телят залишалось майже на тому самому рівні, як і при їх народженні, і АМ ентероцитів впродовж періоду формування колострального імунітету залишалась достатньо плинною та проникною для Ig молозива.

В АМ ентероцитів порожньої кишки телят другої дослідної групи, яким застосовували препарат «Мембраностабіл», на 6- та 24-ту години життя вміст ХС становив $234,5 \pm 23,6$ та $237,0 \pm 21,7$, ФЛ – $579,7 \pm 33,1$ та $810,0 \pm 41,3$ нмоль/мг протеїну, а їх співвідношення 0,34 і 0,29 відповідно. Це вказує на ще вищу плинність та проникність АМ ентероцитів порожньої кишки телят для Ig молозива.

Таким чином, застосування нативних ліпосом та препарату «Мембраностабіл» забезпечує оптимальну плинність та проникність плазмалеми ентероцитів порожньої кишки новонароджених телят для імуноглобулінів молозива у період формування колострального імунітету.

УДК 579.66

ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ КАРБОНУ, НІТРОГЕНУ ТА СОЛЕЙ МЕТАЛІВ НА ПРОДУКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *Bacillus subtilis* 1.1 ТА *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113, ЯКІ СИНТЕЗУЮТЬ КАРОТИН

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

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

У народному господарстві широко використовують каротиноїдні пігменти, які, головним чином, отримують шляхом хімічного та мікробіологічного синтезу. Перевагою останнього є те, що мікроорганізми-продуценти здатні синтезувати широкий спектр каротиноїдів. До того ж варіюванням складу живильного середовища можна досягнути значних змін у рівні накопичення біомаси бактерій, кількісному та якісному вмісті каротиноїдних пігментів. Раніше нами було показано, що штами *Bacillus subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 здатні синтезувати червоні пігменти каротиноїдної природи. Однак вплив складових компонентів живильного середовища на їх ріст та пігментоутворення залишається недослідженим. З огляду на це метою нашої роботи було дослідити вплив джерел карбону, нітрогену та солей металів на продуктивність значених вище каротинсинтезувальних штамів.

Об'єктом дослідження були штами *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 із музею відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології. Досліджені штами бактерій вирощували в умовах глибинного культивування на контрольному середовищі такого складу (г/л): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,29, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,75, KH_2PO_4 – 9,60, MgSO_4 – 0,18, глюкоза – 20,00, а також на середовищах з еквімолярними концентраціями різних джерел карбону, нітрогену та катіонів металів.

Екстракцію пігментів проводили, використовуючи суміші хлороформу та метанолу (2:1). Загальну продуктивність каротиноїдів (мг/л) встановлювали на основі калібрувальних кривих. Для попереднього аналізу якісного складу каротиноїдів в екстракті визначали спектри поглинання у видимій області світла.

Загальна продуктивність каротиноїдів штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 найбільшою була на середовищах з арабінозою, мальтозою, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та FeSO_4 і становила 168 та 384 мг/л, 310 та 570 мг/л, 296 та 640 мг/л, 309 та 605 мг/л відповідно. За всіх досліджених варіантів середовищ спектри поглинання каротиноїдів не зміщувалися і для штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 були стандартними. Одержані дані вказують на сталість якісного складу пігментів за варіювання складових середовища.

Таким чином, оптимальними для накопичення біомаси та каротиногенезу обох досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* серед джерел карбону, нітрогену та катіонів металів була наявність у середовищі арабінози, мальтози, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та FeSO_4 . Загальна продуктивність штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на середовищах з арабінозою, мальтозою, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та FeSO_4 була більшою, ніж на контрольному у 2,1–3,9 та 1,6–2,7 раза відповідно за незмінного якісного складу пігментів.

УДК 591.481.1:577.164.1+577.152.2

ЗМІНИ РІВНЯ ТІАМІНПРОФОСФОКІНАЗИ ТА СТАН АСТРОГЛІЇ В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ АЛІМЕНТАРНОГО В₁-ДЕФІЦИТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ

О. С. ПАВЛОВА, А. О. ТИХОМИРОВ

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: aspavlova92@gmail.com*

Медичні спостереження та експериментальні дослідження свідчать, що природний чи експериментальний дефіцит тіаміну (ТД) незмінно супроводжується нейродегенеративними змінами в клітинах як у центральній, так і в периферичній нервовій системі. Дослідження стану протеїнів нервової тканини за ТД є важливим етапом у визначенні механізмів розвитку нейродегенеративних процесів. Ключовим ферментом обміну тіаміну є тіамінпрофосфокіназа (ТПК, 2.7.6.2), яка фосфорилує тіамін до його коензимної форми – тіаміндифосфату (ТДФ). Відомо, що астроцити є найчутливішими до нестачі тіаміну клітинами ЦНС. Пригнічення метаболічної активності клітин астроглії відбивається на їх здатності синтезувати гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП), який є головним компонентом проміжних філаментів їхнього цитоскелета, і використовується як маркер функціональної активності астроцитів. Отже, метою нашої роботи було визначити зміни вмісту ТПК та оцінити стан астроглії головного мозку щурів за аліментарного ТД та його корекції.

Модель аліментарного дефіциту було створено з використанням дієти Gubler. Термін дієти становив чотири тижні. Щурам із парнокормленого контролю тіамін вводили перорально (10 мкг/день). За добу до декапітації частині

щурів було введено тіамін відповідно до добової норми. Кількість щурів у групах становила $n = 3-4$. Рівень ТПК і ГФКП в різних відділах головного мозку тварин (кора великих півкуль, мозочок, гіпокамп) було досліджено методом імуноблотингу. Результати візуалізували за допомогою набору ECL. Сигнал фіксували на рентгенівській плівці.

Показано, що за ТД відбувається зростання рівня ТПК в корі мозку в 1,5 раза, в мозочку майже в 2 та в гіпокампі в 1,2 раза відносно контролю ($P < 0,05$). У щурів з ТД спостерігалось зменшення рівня ГФКП в усіх досліджуваних відділах мозку в середньому до 60% від контрольного значення. Додавання тіаміну призвело до різкого зростання рівня ТПК у корі, мозочку та гіпокампі (у 2,1, 3,1 та 1,9 раза відповідно). Збільшення рівня ферменту супроводжувалося частковим відновленням астроцитарного маркера, який в різних відділах становив 80% від контрольного значення. На нашу думку, результати роботи вказують на можливість тіамінзалежної регуляції синтезу ТПК в нервових клітинах. Також, ймовірно, що нормалізація тіамінзалежних процесів за введення тіаміну тваринам із ТД сприяє відновленню метаболічної активності клітин астроглії, яка має важливе значення для реалізації її нейропротекторної функції.

ВПЛИВ ВУГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТА НА ІМУНОГЕННІСТЬ РЕКОМБІНАНТНОГО ФРАГМЕНТА $\alpha 7(1-208)$ НІКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛІНОВОГО РЕЦЕПТОРА НА ВЛАСТИВОСТІ ОДЕРЖАНИХ АНТИТІЛ ТА ЇХ ЕФЕКТИ В МОЗКУ

Д. В. ПАСТУХОВА¹, О. Ю. ЛИХМУС², М. В. СКОК²

¹*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;*

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

e-mail: daria-past@ukr.net

Нікотиніві ацетилхолінові рецептори (nAChR) регулюють вивільнення нейромедіаторів у мозку, впливаючи на пам'ять і когнітивні процеси. Зниження $\alpha 7$ субтипу nAChR в мозку супроводжує розвиток нейродегенеративних захворювань, зокрема хвороби Альцгеймера. Раніше було показано, що антитіла, утворені проти рекомбінантного позаклітинного фрагмента $\alpha 7(1-208)$ nAChR, проникали в мозок мишей за умов запалення, спричинюючи зниження рівня $\alpha 7$ nAChR, накопичення пептиду (1-42) β -амілоїду, погіршення епізодичної пам'яті. Подібні ефекти зумовлювали також регулярні ін'єкції бактеріального ліпополісахариду (ЛПС). Оскільки рекомбінантний $\alpha 7(1-208)$ містить вуглеводний компонент, не можна виключити, що він є причиною запальноподібного ефекту у разі введення цього фрагмента тваринам. Ми порівняли імунну відповідь і ефекти імунізації мишей за допомогою глікозилуваною (глік) та деглікозилуваною формами $\alpha 7(1-208)$ ендоглікозидази (деглік).

За даними імуноблотингу з $\alpha 7(1-208)$ -специфічними антитілами глік-форма була представлена агрегатами з молекулярною масою 35–70 кДа, а деглік-форма – близько 27 кДа, що відповідає протеїновій масі фрагмента $\alpha 7(1-208)$. За даними лектин-ІФА, вуглеводні залишки глік-форми представлені переважно фукозою і манозою та невеликою кількістю сіалових кислот, N-ацетил- β ,D-глюкозаміна і β -D-галактози. Деглік-форма містила лише залишки манози.

Мишей лінії C57Bl/6J імунізували глік/деглік-формою $\alpha 7(1-208)$ двічі з інтервалом у

3 тижні; кров брали із хвостової вени кожні 5 днів; кількість/специфічність антитіл визначали методом сорбційного ІФА. Показано, що глік-форма $\alpha 7(1-208)$ спричинювала більш швидку і потужну первинну (IgM) імунну відповідь, ніж деглік-форма; у вторинній IgG-відповіді ця різниця була менш вираженою. При цьому антитіла розрізняли глік- та деглік-форми антигену. Оцінка епітопної специфічності антитіл із використанням коротких пептидів $\alpha 7(1-208)$ дозволила зробити висновок, що глік- і деглік-форми $\alpha 7(1-208)$ процесуються, презентуються і розпізнаються імунною системою миші по-різному завдяки стану агрегації та глікозилуванню антигену. Хоча антитіла утворюються проти однакових епітопів протеїну, проте з різною ефективністю.

Через півтора місяці від початку імунізації методом сандвіч-ІФА було досліджено кількість $\alpha 7$ nAChR та продуктів процесингу бета-амілоїду (A β) в мозку мишей: імунізація і глік-, і деглік-формами $\alpha 7(1-208)$ призводила до зниження кількості цього субтипу в лізаті мозку; ні повний ад'ювант Фрейнда, ні ЛПС не призводили до такого зниження. В мозку імунізованих та ЛПС-ін'єктованих мишей спостерігали накопичення аберантно-процесованого A β (1-42); кількість A β (1-40) зменшувалась переважно після імунізації деглік-формою антигену.

Одержані дані продемонстрували, що вуглеводний компонент рекомбінантного $\alpha 7(1-208)$ є критичним для специфічності антитіл до пептидних епітопів, але не впливає на ефекти $\alpha 7(1-208)$ -специфічних антитіл у мозку імунізованих мишей.

UDC 576.08

LIPIDS DYNAMICS IN PLASMA MEMBRANE ON LIVE AND APOPTOTIC CELLS

K. A. PYRSHEV, A. P. DEMCHENKO

*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: pyrshevka@gmail.com*

Plasma membrane is one of the central organelles on different signaling or regulation processes in living cells (Mohandas and Gallagher, 2008; Simons and Toomre, 2000). Lipid domains, defined as liquid-ordered phase enriched in cholesterol, sphingomyelin, and glycosphingolipids, can be observed in model lipid membranes and plasma membrane vesicles as “rafts” floating in a sea of loosely packed phase enriched in unsaturated phospholipids, the so-called liquid disordered (fluid) phase (Simons and Ehehalt, 2002). Despite the significant progress in this field, the role and the way of plasma membrane lipid domains’ redistribution on programmed cell death are still debated, as the direct observation of separated lipid phases in living cells remains a challenge (Munro, 2003; Truong-Quang and Lenne, 2014).

The aim of this research was to compare some properties of the plasma membrane of nucleated cells and erythrocytes on suicidal cell death.

Cellular studies were performed to characterize the lipid order changes induced by programmed cell death in outer plasma membrane leaflet of erythrocytes in comparison with that of nucleated cells. The cells were characterized with common approaches to detect phosphatidylserine-exposed cells, Ca^{2+} levels, cell size etc. Environment-sensitive probes (Kreder et al., 2015; Kreder et al., 2015) were applied for lipid order characterization. Binding kinetics followed

from the fluorescence intensity of the environment sensitive plasma membrane probes was measured to characterize lipid domains’ properties in cells. The affinity of the probes for the plasma membrane was similar in both nucleated cells and erythrocytes, suggesting the similarity of the lipid domains’ distribution in living cells. However, in contrast to nucleated cells the programmed cell death did not influence general lipid redistribution in erythrocytes. The new FRET-based approach for detection of the local changes in viscosity of the outer plasma membrane leaflet showed strong increase of the lipid composition density. The microscopy data of erythrocytes showed the increase of FRET efficiency in the regions of blebs formation, suggesting the presence of lipid disorder domains in strongly curved parts of outer plasma membrane leaflet. In contrast to erythrocytes HeLa cells showed strong decrease of the viscosity in outer plasma membrane leaflet with higher values in regions of bleb formation. So, the lipid redistribution during programmed cell death of erythrocytes is much less pronounced. Current experiments suggest that the strong decrease of the cell volume with the stable plasma membrane surface area result in the suppress of the passive and active flip-flop leading to the rigid lipid dynamics and low hydration effects in outer leaflet of the plasma membrane.

ПОХІДНІ ПІРИДИН-3-КАРБОНІТРИЛІВ ЯК НОВІ ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНКІНАЗИ FGFR1

М. В. ПРОТОПОПОВ¹, С. А. СТАРОСИЛА¹, В. Д. ДЯЧЕНКО², С. М. ЯРМОЛЮК³

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Луганський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

e-mail: mykola.protopopov@gmail.com

Кіназа рецептора фактора росту фібробластів 1 (FGFR1) належить до родини рецепторних тирозинових протеїнкіназ (РТК). Активність протеїнкінази FGFR1 є ключовою для низки процесів, таких як міграція, диференціювання та проліферація клітин. Порушення експресії гена FGFR1 або зміна активності цієї протеїнкінази спричинює низку патологій: ревматоїдний артрит, утворення пухлин, діабетичну ретинопатію та судинні проліферативні захворювання, зокрема атеросклероз.

Підвищення активності FGFR1 разом з іншими кіназами РТК (VEGFR і EGFR) забезпечує процес неоваскуляризації пухлинної тканини, що зумовлює ріст солідних пухлин. Блокування онкоангіогенезу зумовлює зупинку росту пухлини та некроз. Таким чином, одним із підходів лікування солідних пухлин є пригнічення онкогенного неоваскулогенезу через інгібування РТК, зокрема FGFR1. З огляду на це, останнім часом проводиться інтенсивний пошук інгібіторів РТК для застосування їх як протипухлинних препаратів.

Метою цієї роботи був пошук нових класів інгібіторів протеїнкінази FGFR1 за допомогою сучасних методів комп'ютерного моделювання та біохімічного тестування.

Для пошуку інгібіторів протеїнкінази FGFR1 було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолеку-

лярних органічних сполук, що налічувала 1257 речовин. Для біохімічного тестування було відібрано 12 сполук із найкращими показниками енергії зв'язування комплексів «рецептор–ліганд». Відібрані сполуки було протестовано за їх концентрації в реакційній суміші – 33 мкМ. Внаслідок біохімічного тестування було знайдено три активні сполуки: 2-((2-(4-хлорофеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(4-гідроксифеніл)-6,7-дигідро-5Н-циклопента[b]піридин-3-карбонітрил, 2,2'-(етан-1,2-діілбіс(сульфандііл))біс(5-ацетил-6-метилнікотинонітрил) та 2-аміно-6-((2-(4-бутилфеніл)-2-оксоетил)тіо)-4-(тіофен-2-іл)піридин-3,5-карбонітрил. Активні сполуки пригнічували активність FGFR1 зі значенням IC₅₀ 1,58 мкМ, 4 мкМ та 6,9 мкМ. За даними комп'ютерного моделювання, досліджувані сполуки мали подібний механізм зв'язування з активним центром протеїнкінази – утворювали водневі зв'язки із шарнірним районом протеїнкінази, гідрофобні зв'язки в аденінзв'язувальній ділянці та водневі, електростатичні і гідрофобні взаємодії із ключовими амінокислотними залишками фосфатзв'язувального регіону.

Таким чином, внаслідок виконаної роботи знайдено новий клас інгібіторів протеїнкінази FGFR1 серед похідних піридин-3-карбонітрилів. Структури цих сполук можна використати для подальшої оптимізації їх з метою покращення активності, селективності та фізико-хімічних параметрів.

UDC 579.264:602.4 (043.2)

***Lactobacillus* AND *Bifidobacterium* STRAINS RESISTANCE TO AGGRESSIVE FACTORS OF HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT**

O. Yu. SOKOLVYAK^{1,2}, *L. P. BABENKO*¹, *V. V. MOKROZUB*^{1,2}, *K. I. STEPANENKO*¹,
*I. V. SAGAN*¹, *L. M. LAZARENKO*¹, *M. Ya. SPIVAK*¹

¹*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv;*

²*Ukrainian State Scientific Research Institute of Nanobiotechnologies
and Resource Reservation, Kyiv;*

e-mail: sokolvyak_alena@mail.ru

It is known that according to the “Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food” one of the requirements to probiotic strains that allow using them as a component of probiotics is survival during the transit through the gastrointestinal tract. So, the aim of our research was to investigate the resistance of *Lactobacillus acidophilus* IMV B-7279, *L. casei* IMV B-7280, *L. ramosus* LB-3 VK6, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMV B-7281, *L. delbrueckii* LE VK8, *L. plantarum* LM VK7, *Bifidobacterium animalis* VKL and *B. animalis* VKB to aggressive gastrointestinal tract conditions *in vitro*.

The survival of the tested strains was verified by cultivating in Man-Rogosa-Sharpe medium in the presence of stomach acidity in concentration 1-100% during 2.5 hours, bile salt in concentration 0.1-40 % during 5 hours and pancreatine in concentration 0.1-5 mg/ml during 15 hours. For studying complex impact of aggressive gastrointestinal tract conditions on the strains we cultivated them stepwise with 50% of stomach acidity during 2.5 h, with 0.3% of bile during 5 h and with 2.5 mg/ml of pancreatine during 15 h.

B. animalis VKL, *B. animalis* VKB and *L. acidophilus* was resistant to 100% concentration of stomach acidity, *L. casei* – to 75%, *L. ramosus* – to

50%, *L. delbrueckii* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – to 10%, *L. plantarum* – to 8%.

B. animalis VKL, *B. animalis* VKB, *L. ramosus* and *L. casei* retained high viability in the presence of 40% bile, *L. acidophilus* – in the presents of 30% bile. *L. plantarum* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* had medium resistance to bile (10-25%), the most sensitive was *L. delbrueckii* (8%).

All strains survived under the action of pancreatine in concentration 0.1-5 mg/ml during 15 h cultivation.

The most tolerant for the complex action of aggressive gastrointestinal tract conditions were *L. acidophilus*, *B. animalis* VKB and *B. animalis* VKL (82, 78 and 78% of the cells, respectively, survived after the cultivation). 52% of *L. casei* cells survived under the complex action of aggressive gastrointestinal tract factors. The other strains were not enough resistant.

So, we can make a conclusion that all the strains are promising for probiotic preparation creation but *L. ramosus* LB-3 VK6, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMV B-7281, *L. delbrueckii* LE VK8 and *L. plantarum* LM VK7 strains need additional protection against gastrointestinal tract factors action in cases of *per os* use.

РАЦІОНАЛЬНИЙ ДИЗАЙН НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ ПРОТЕЇНКІНАЗИ ASK1

С. А. СТАРОСИЛА¹, М. В. ПРОТОПОПОВ¹, С. С. ЛУКАШОВ²,
Г. П. ВОЛИНЕЦЬ², В. Г. БДЖОЛА², С. М. ЯРМОЛЮК²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;

e-mail: starosila@gmail.com

Протеїнкіназа ASK1 є перспективною терапевтичною мішенню, оскільки підвищена активність цього ензиму пов'язана з розвитком низки захворювань людини.

Доведено, що ASK1 бере участь у патогенезі хвороби Альцгеймера та аміотрофічного латерального склерозу, задіяна в розвитку міокардиту, фіброзу серця і серцевої недостатності. Результати досліджень *in vivo* свідчать про важливу роль ASK1 у розвитку септичного шоку. Таким чином, високоактивні і селективні інгібітори ASK1 можуть бути попередниками для розробки засобів для лікування цих захворювань.

Метою роботи був дизайн низькомолекулярних інгібіторів ASK1 і дослідження їх взаємодії з амінокислотними залишками активного центру ASK1 методами комп'ютерного моделювання та біохімічного тестування.

На першому етапі роботи за допомогою пакету програм DOCK проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки, яка нараховувала близько 270 тисяч органічних сполук. Для тестування *in vitro* було відібрано 186 лігандів, що за даними докінгу мали енергію зв'язування з ензимом нижче -50 ккал/моль та утворювали водневі зв'язки з ключовими амінокислотними залишками АТР-зв'язувального сайту ASK1. Виявлено, що сполука 5-(4-хлоро-феніл)-4-(фуран-2-карбоніл)-3-гідрокси-1-(6-метокси-бензотіазол-2-іл)-1,5-дигідро-пірол-2-он інгібує ASK1 зі значенням $IC_{50} = 4,2$ мкМ.

Для вивчення залежності активності 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-

дигідро-пірол-2-онів від їхньої хімічної структури, було синтезовано і протестовано 33 похідних цього класу. Найактивніша сполука 1-(6-флуоро-бензотіазол-2-іл)-3-гідрокси-5-[3-(3-метил-бутоксифеніл)-4-(2-метил-2,3-дигідро-бензофуран-5-карбоніл)-1,5-дигідро-пірол-2-он (ВРyO-34) інгібує ASK1 зі значенням $IC_{50} = 0,52$ мкМ.

Показано, що присутність залишку бензотіазолу в структурах досліджуваних сполук важлива для їхньої інгібувальної активності відносно ASK1. За даними комп'ютерного моделювання, цей гетероцикл бере участь у гідрофобних взаємодіях із аденінзв'язувальною ділянкою активного сайту ASK1. Виявлено, що атом кисню 3-гідрокси-1,5-дигідро-пірол-2-ону утворює водневий зв'язок з аміногрупою Val757, який розташований в шарнірній ділянці протеїнкінази. Продемонстровано, що хімічна природа замісника, який взаємодіє з гідрофобною кишенею I, важлива для прояву інгібувальної активності відносно ASK1.

Визначення селективності найактивніших інгібіторів ASK1 проводили *in vitro* з використанням панелі із шести протеїнкіназ. Показано, що ВРyO-34 та низка інших активних сполук виявляють хорошу специфічність по відношенню до ASK1.

Таким чином, застосування віртуального скринінгу та біохімічного тестування дозволило ідентифікувати новий клас інгібіторів протеїнкінази ASK1 – похідні 1-бензотіазол-2-іл-3-гідрокси-5-феніл-1,5-дигідро-пірол-2-ону.

UDC 579.2

**THE EFFECT OF *Bifidobacterium animalis* VKL
ON THE UROGENITAL TRACT MICROFLORA OF MICE
UNDER PHYSIOLOGICAL NORM CONDITION**

*K. I. STEPANENKO^{1,2}, L. P. BABENKO¹, V. V. MOKROZUB¹, O. Yu. SOKOLVYAK¹,
I. V. SAGAN¹, L. M. LAZARENKO¹, M. Ya. SPIVAK¹*

¹*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv;*

²*National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute";*

e-mail: katerina.stepanenko.92@mail.ru

It is known, that microflora of various cavities of human body, including vagina, is an impassable barrier for most infections. This fact confirms the relevance of using probiotics on the base of representatives of normal vaginal microflora (lacto- and bifidobacteria) not only in the complex therapy of vaginosis and infectious pathologies of the urogenital tract, but in norm, for prevention. Therefore, the aim of our work was to determine the effect of *Bifidobacterium animalis* VKL probiotic strain on the spectrum of vaginal and kidneys microflora *in vivo* under physiological norm condition.

B. animalis VKL cells suspension in 0.15 M saline was injected intravaginally to BALB/c mice in a dose of 1×10^6 cells per animal once a day during 7 days. It was investigated that the number of lacto- and bifidobacteria in the vagina increased and remained on a high level for an extended observation period (30 days) after intravaginal adminis-

tration of *B. animalis* VKL. The quantity of lactic acid bacteria was 3.75 ± 0.06 and 3.32 ± 0.03 Lg CFU/ml on the 15th and 30th days respectively (2.68 ± 0.03 Lg CFU/ml in the control). The number of bifidobacteria was 3.58 ± 0.08 Lg CFU/ml on the 15th day and 2.92 ± 0.09 Lg CFU/ml on the 30th day (2.12 ± 0.11 Lg CFU/ml in the control).

Streptococci appeared in the kidneys after *B. animalis* VKL introduction in the level of 1.24 ± 0.05 and 1.39 ± 0.11 Lg CFU/ml on the 9 and 12th days respectively, but did not seeded out on the 1-6th days.

Thus, obtained data showed, that the influence of *B. animalis* VKL on the microflora of vagina and kidneys is considerable, therefore the using the probiotic strain to create probiotic preparations for prevention or correction of the urogenital tract microflora is promising.

МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА I-5A ПРОТИ α C-РЕГІОНУ МОЛЕКУЛИ ФІБРИН(ОГЕНУ) ТА ЇХ ПРАКТИЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ

В. Є. ХАДЖИНОВА, І. М. КОЛЕСНИКОВА, Т. А. ПОЗНЯК, О. П. КОСТЮЧЕНКО

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

Більшість захворювань серцево-судинної системи людини супроводжуються аномальною активацією системи зсідання крові. Для діагностики захворювань системи гемостазу, а також для моніторингу ефективності їх лікування, важливе значення має кількісне визначення в плазмі крові людини концентрації молекулярних маркерів, що характеризують стан цієї системи. Одним із таких важливих маркерів є розчинний фібрин. Він являє собою комплекси фібрину desA з фібриногеном та олігомери фібрину desA, на кінцях якого також знаходяться молекули фібриногену. У молекулі фібрин(огену) умовно розрізняють центральний регіон E, два периферійних регіони D та α C-регіони, які є 2/3 C-кінців його A α -ланцюгів. У процесі фібринолізу плазмін, в першу чергу, відщеплює α C-регіони від молекули фібрину. Визначення кількості ранніх форм розчинного фібрину, в якому присутні α C-регіони, дасть можливість діагностувати загрозу тромбоутворення на початковій її стадії.

Метою нашої роботи було одержати моноклональні антитіла проти α C-регіону молекули фібрин(огену), описати їхні імунохімічні властивості та використати їх як «tag»-антитіла в імунодіагностичній тест-системі для кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину в плазмі крові людини.

Проти частково денатурованого фібрину методом гібридомної технології були одержані

моноклональні антитіла (монАТ), названі I-5A. Імуноензимним методом визначили ізотип одержаних антитіл та перевірили можливість їх використання як «tag»-антитіл у діагностичній тест-системі для кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину. Турбідиметричним методом було перевірено дію монАТ на полімеризацію фібрину.

Встановлено, що одержані антитіла належать до класу IgG1a та мають константу афінності $3,41 \cdot 10^{-9}$ М. Показано інгібіторну дію монАТ на полімеризацію фібрину. За еквімолярного співвідношення монАТ I-5A до фібрину максимальна швидкість полімеризації зменшувалась на 80%, що свідчить про високоспецифічне інгібування. Показано, що Fab-фрагменти монАТ I-5A інгібують полімеризацію фібрину desAB. Виявлено, що епітоп монАТ I-5A розташований в C-кінці α C-регіону, що відповідає ділянці A α 509-602.

Біотинільовані монАТ було вдало використано як «tag»-антитіла за кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину в плазмі крові людини.

Дійшли висновку, що монАТ I-5A можуть бути використані для локалізації сайту полімеризації фібрину, розташованого у C-кінцевій ділянці α C-регіону, і в розробці діагностичної тест-системи для кількісного визначення ранніх форм розчинного фібрину.

UDC 577.16+577.15:577.121

VITAMIN D₃ AND OSTEOTROPIC CYTOKINES IN REGULATION OF BONE HOMEOSTASIS AT GLUCOCORTICOID-INDUCED OSTEOPOROSIS

A. V. KHOMENKO, V. M. VASYLEVSKA, O. O. LISAKOVSKA

*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: annavic@ukr.net*

Impairments of bone tissue homeostasis associated with long-term glucocorticoids (GC) therapy can lead to alterations of bone cells function through dysbalance of cytokine system OPG/RANKL/RANK or/and inhibition of vitamin D₃ turnover. We investigated the pathways leading to GC-induced osteoporosis by studying changes of mineral biomarkers and expression of OPG/RANKL in relation to cholecalciferol availability.

Female Wistar rats (100 ± 5 g) received prednisolone at dose 5 g with or without 100 IU of D₃ (daily for 30 days). The contents of 25OHD₃, OPG, RANKL in blood serum were measured by ELISA. The expressions of OPG, RANKL and osteocalcin in bone tissue were assessed by Western-blotting. The levels of Ca²⁺, P_i, activity of alkaline phosphatase (ALP) and its bone isoenzyme were determined by Bio-test kits.

It was shown that prednisolone administration lowered the level of 25OHD₃ (by 70%) in serum. The decrease in 25OHD₃ led to hypocalcemia and

hypophosphatemia that was accompanied by elevation of the activities of ALP and its bone isoenzyme in serum. Similar changes of mineral metabolism were also observed in bones. Prednisolone reduced the level of OPG (by 34 and 38%) and increased the level of RANKL (by 27 and 10%) both in serum and bone tissue, respectively. OPG/RANKL ratio was found to be reduced 1.7 times in serum. These changes were accompanied by a significant decrease in the expression of osteocalcin. Co-administration of vitamin D₃ with prednisolone normalized the content of mineral components and the balance of OPG/RANKL system through enhancement of vitamin D₃ bioavailability.

Our results indicate that GC administration altered remodelling by activating bone tissue resorption that correlated with impairments of vitamin D₃ turnover. Normalization of vitamin D₃ availability might be considered to be perspective in reducing the negative effects of GC on bone homeostasis.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФРАГМЕНТІВ ФІБРИНОГЕНУ НА РІЗНІ ЛАНКИ ФІБРИНОЛІЗУ

Т. А. ЯЦЕНКО, В. Н. РИБАЧУК, О. І. ЮСОВА

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

В організмі людини активація плазміногену основним ендогенним активатором плазми крові – тканинним активатором плазміногену – відбувається на поверхні фібрину, що захищає протеїни плазми від неспецифічного протеолізу плазміном і спрямовує дію ензиму на гідроліз саме полімерного фібрину. За гіперактивації фібринолітичної системи плазмін може гідролізувати фібриноген з утворенням продуктів його деградації. Однак ефект продуктів плазмінового гідролізу фібриногену на фібринолітичний процес остаточно не з'ясовано. У представленій роботі досліджено здатність різних D- і E-фрагментів фібриногену людини зв'язувати плазміноген і тканинний активатор, стимулювати активацію проензиму, впливати на лізис фібринового згустку і інгібування плазміну $\alpha 2$ -антиплазміном плазми.

Із плазмінового гідролізату фібриногену людини було виділено ранні та пізні продукти – фрагменти E_p і E_n , що відрізнялись за амінокислотними залишками, тоді як ранній та пізній D-фрагменти були однаковими. З E_p -фрагмента, використовуючи карбоксипептидазу В, був одержаний E-фрагмент, позбавлений C-кінцевих залишків лізину, та з використанням тромбіну – позбавлений 16 амінокислотних залишків в N-кінцевій частині $A\alpha$ -ланцюга.

Вперше показано, що E_p -фрагмент здатен зв'язувати Glu-плазміноген і тканинний активатор плазміногену та стимулювати процес

активації проензиму. E_n втрачає стимулюючі властивості, але здатен зв'язувати проензим і його активатор. Обробка E_p -фрагмента тромбіном призводить до часткового зниження стимулюючого ефекту, тоді як обробка карбоксипептидазою В – до повної втрати такого впливу. Таким чином, наявність C-кінцевих залишків лізину трьох пар поліпептидних ланцюгів і 16 або 24 N-кінцевих амінокислотних залишків фрагмента є істотними для цього процесу. Зниження зв'язування E_p -фрагмента із тканинним активатором за дії ϵ -амінокапронової кислоти та після обробки карбоксипептидазою В вказує на залучення C-кінцевих залишків лізину $A\alpha$ - та γ -ланцюгів фрагмента і лізінзв'язуючої ділянки кринглу 2 активатора до цієї взаємодії. Ймовірно, зв'язування цього фрагмента з плазміногеном забезпечується N-кінцевою ділянкою $A\alpha 1-19$ та C-кінцевою $B\beta 120-122$.

D-фрагмент фібриногену не зв'язується з Glu-плазміногеном і тканинним активатором.

Жоден із продуктів деградації фібриногену не впливає на швидкість лізису фібринового згустку плазміном та на процес інгібування ензиму $\alpha 2$ -антиплазміном плазми.

Таким чином, продукти деградації фібриногену здатні впливати на фібриноліз, зв'язуючи плазміноген і тканинний активатор, стимулюючи утворення плазміну, але не захищають останній від інгібування $\alpha 2$ -антиплазміном.