



УКРАЇНА

(19) UA (11) 66256 (13) U  
(51) МПК  
G01N 1/28 (2006.01)  
G01N 33/52 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕМБРАНОТРОПНОЇ АКТИВНОСТІ ЛЕТКИХ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

1

(21) u201107786  
(22) 20.06.2011  
(24) 26.12.2011  
(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.  
(72) ПОСОХОВ ЄВГЕН ОЛЕКСАНДРОВИЧ  
(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-  
ТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА  
(57) Спосіб визначення мембранотропної активності летких органічних сполук, що включає введення в досліджувані мембрани набору флуоресцентних зондів, реєстрацію спектрів їх флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних, який **відрізняється** тим, що в мембрани вводять набір мультипараметричних флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, який містить ряд ортогідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-

2

діарил-1,3,4-оксадіазолу, на спектрофлуориметрі реєструють спектри їх флуоресценції, після чого проводять математичну обробку спектральних даних, яка полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції зондів  $F_B$  та  $F_A$ , відповідно, на довжинах хвиль А і Б діапазонів, де діапазон А знаходиться в межах 370-425 нм, а діапазон Б - в межах 450-600 нм, для кожного із зондів обчислюють відношення значень інтенсивності флуоресценції зондів  $F_B/F_A$  для мембран, що перебували під дією легкої органічної сполуки, і за зменшенням відношення  $F_B/F_A$ , порівняно з аналогічним параметром, вимірним для даного виду мембран за відсутності легкої органічної сполуки, роблять висновки про мембранотропну активність легкої органічної сполуки.

Корисна модель належить до галузі біохімії, токсикології, наркології і може бути використана для порівняльної експрес-оцінки впливу різних летких органічних сполук на стан ліпідного бішару штучних або природних (клітинних) мембран, для тестування мембранотропної активності нових речовин, а також для з'ясування механізму дії різних летких органічних сполук на біологічні клітини.

Токсикоманії, викликані вдиханням летких органічних сполук (ЛОС), являють одну з проблем наркології [1]. Для з'ясування механізму початкового етапу формування патологічного потягу до ЛОС важливо встановити механізм дії ЛОС на біологічні клітини. Серед можливих механізмів дії ЛОС на рецепторні білки клітин відомі: (1) пряме зв'язування ЛОС з рецепторними протеїнами без участі ліпідного бішару [2]; (2) зв'язування ЛОС з ліпідним бішаром: (а) яке супроводжується подальшим зв'язуванням ЛОС з рецепторними білками [3], (б) що призводить до зміни фізико-хімічних властивостей мембрани (впорядкованості ліпідів, в'язкості, гідратованості) і, в ході зміни протеїн-ліпідних взаємодій [4], впливає на властивості рецепторних протеїнів (наприклад, на їх конформацію) [5]. Знання механізму дії ЛОС на біологічні клітини є важливим для пошуку хімічних блокато-

рів рецепторних білків клітин: передбачається, що їх блокування перериває аферентацію, що йде до коркового відділу головного мозку, і тим самим запобігає формуванню патологічного потягу до ЛОС [1]. Таким чином, для з'ясування механізму дії ЛОС на біологічні клітини необхідно оцінювати вплив ЛОС на структурний стан клітинних мембран.

Відомі способи визначення мембранотропної активності речовин, що ґрунтуються на вимірюванні швидкості виходу з еритроцитів гемоглобіну в умовах дії кислоти або лугу (кислотний або лужний гемолиз) [6].

Однак, ці способи застосовують лише для еритроцитів, і вони не можуть бути використані для клітин, які не містять гемоглобін. Крім того, гемоглобін є високомолекулярним білком і для його виходу з мембран у останніх повинні утворитися досить великі пори, які свідчать про суттєве порушення мембран клітин, тоді як порушення цілісності мембран, що супроводжується утворенням менших за розмірами дефектів, також може спричиняти негативний вплив на функціонування клітини. До того ж, гетерогенність розподілу еритроцитів за віком, наявність і неоднорівномірність холестерину в індивідуальних зразках не дозво-

(19) UA (11) 66256 (13) U

ляють вважати цей метод універсальним для оцінки мембранотропних властивостей ЛОС. Відомо також, що залежність ступеня гемолізу еритроцитів від концентрації малих гідрофільних молекул має лінійний характер, тоді як для ліпофільних органічних молекул, до яких можна віднести ЛОС, ця залежність носить нелінійний характер [7], що значно ускладнює інтерпретацію і зіставлення результатів у ході порівняння мембранотропних властивостей ЛОС, які належать до різних класів хімічних речовин.

Відомий спосіб визначення мембранотропної активності речовин, який ґрунтується на введенні в клітини флуоресцеїн діацетату, що в клітинах гідролізується естеразами до вільного флуоресцеїну, який має гіршу проникливість, що дозволяє використовувати його як маркер цілісності плазматичної мембрани [8].

Однак, застосування цього методу також має ряд обмежень, серед яких можна відзначити залежність ферментативного перетворення флуоресцеїн діацетату у флуоресцеїн від активності внутрішньоклітинних естераз, на яку, в свою чергу, можуть впливати фактори, які порушують цілісність чи проникність мембран, а також здатність флуоресцеїну переноситись крізь мембрани за допомогою специфічних каналів або транспортних білків клітин печінки. В клітинах печінки, крім того, флуоресцеїн може метаболізуватись монооксигеназою системою мікосом. Все це може спотворювати результати вимірювань під час роботи з клітинами.

Відомий також спосіб визначення мембранотропної активності органічних сполук шляхом зміни проникності мембран клітин для фериціаніду калію за методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) [9]. Для цього клітини насичують сумішшю фериціаніду калію і парамагнітного іміноксильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопіперидін-1-оксиду, який здатний проникати всередину клітин в нормі, тоді як фериціанід калію в непошкоджені клітини не проникає. У разі порушення нормальної проникності мембран клітин внаслідок дії на мембрани органічної сполуки, яка досліджується, фериціанід калію починає потрапляти всередину клітин і розширювати сигнал від молекул іміноксильного радикалу, які там знаходяться. Падіння інтенсивності ЕПР-сигналу від іміноксильного радикалу є індикатором появи дефектів в структурі мембран. Недоліком цього методу є те, що він дозволяє визначати тільки такі пошкодження мембран, які призвели до утворення пор, і не дозволяє реєструвати порушення, спричинені дією ЛОС на етапах, які ще не призводять до утворення пор.

Існує спосіб визначення мембранотропної активності речовин, що ґрунтується на реєстрації сигналів ЕПР від введених в мембрани парамагнітних зондів [10]. Спосіб полягає в тому, що парамагнітний зонд (за наявності або відсутності органічної сполуки) вводять в досліджувані мембрани, після чого на ЕПР-спектрометрі реєструють спектр ЕПР-зонда, виконують його математичну обробку і будують графік залежності частоти обертальної дифузії зонда від концентрації органічної сполуки,

на підставі якого роблять висновок про мембранотропну активність речовини.

До основних недоліків цього способу можна віднести такі:

- недостатня чутливість, пов'язана з тим, що для отримання задовільного відношення сигнал/шум треба використовувати ЕПР-зонди в кінцевих концентраціях не менш, ніж  $4 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-5}$  М [11]. Такі концентрації є досить високими і самі по собі можуть спричинити негативний вплив на об'єкт дослідження - біомембрани. З іншого боку, у процесі використання менших концентрацій зондів необхідно застосовувати накопичення сигналів, яке подовжує час вимірювань;

- складність інтерпретації результатів, яка полягає в тому, що навіть у випадку використання одного і того ж ЕПР-зонда, інтерпретація спектрів часто ускладнюється завдяки перетинанню спектрів ЕПР від молекул цього зонда, розташованих у водній фазі, і в різних областях мембран;

- великі затрати часу, зумовлені специфікою підготовки зразків для ЕПР-вимірювань, які потребують розміщення зразків в спеціальних скляних капілярах, юстирування в резонаторі спектрометра, налаштування параметрів поля тощо. Для отримання адекватної інформації про стан різних областей бішару, звичайно застосовують по черзі (тобто в окремих експериментах) декілька різних ЕПР-зондів, що збільшує час вимірювань, який для одного зразка становить 10-15 хв. і подовжує термін обробки спектрів;

- висока вартість ЕПР-зондів, які використовуються для досліджень.

Відомий спосіб визначення мембранотропної активності речовин ґрунтується на вимірюванні поляризації флуоресценції зондів ДФГТ, ТМА-ДФГТ [12].

Спосіб включає введення в мембрани зондів ДФГТ, ТМА-ДФГТ, реєстрацію спектрів флуоресценції зондів при паралельній і перпендикулярній орієнтації реєструючого поляризатора (поляризатора емісії флуоресценції) відносно поляризатора джерела збуджуючого світла (поляризатора збудження флуоресценції), проведення математичної обробки спектральних даних, яка полягає в тому, що за спектрами визначають інтенсивність флуоресценції  $F$  зондів на довжині хвилі 430 нм: (а) при положенні поляризатора емісії флуоресценції паралельно поляризатору збудження флуоресценції, тобто  $F_{||}$ , (б) при положенні поляризатора емісії перпендикулярно поляризатору збудження, тобто  $F_{\perp}$ , обчислюють величину анізотропії флуоресценції  $r$  за формулою:

$$r = (F_{||} - F_{\perp}) / (F_{||} + 2F_{\perp}),$$

будують залежність величини анізотропії флуоресценції  $r$  від концентрації мембранотропної речовини і за зменшенням величини  $r$  порівняно з аналогічним параметром, виміряним для даного виду мембран за відсутності мембранотропної речовини, роблять висновок про її мембранотропну активність. Зонди дозволяють здійснювати моніторинг змін ліпідного бішару мембран в області гліцеринових залишків фосфоліпідів (ТМА-ДФГТ) і в центрі ліпідного бішару (ДФГТ). Зонди ДФГТ, ТМА-ДФГТ використовувалися для визначення

мембранотропної активності циклічних вуглеводнів (аренів, циклоалканів, терпенів), токсичних для мікроорганізмів [12]. До недоліків способу належать:

- низька чутливість методу (максимальна зміна анізотропії флуоресценції в результаті дії циклічних вуглеводнів на біомембрани складала лише 12-15 %);

- для виміру поляризації флуоресценції на стандартних спектрофлуориметрах потрібна додаткова установка поляризаторів (ціна набору поляризаторів збудження й емісії складає приблизно 5 000 \$);

- низький рівень флуоресценції зонда ДФГТ, пов'язаного з ліпідними мембранами, оскільки зонд ДФГТ слабо й повільно проникає в мембрани і схильний до агрегації у водних розчинах;

- використані зонди не дозволяють здійснювати моніторинг змін ліпідного бішару в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів.

Найближчим аналогом за сукупністю суттєвих ознак до способу, що заявляється, є спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора [14], який включає введення в досліджувані мембрани набору флуоресцентних зондів, реєстрацію їх спектрів флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних.

При виконанні зазначеного способу передбачається використання флуоресцентного зонда ФМЕ, що є представником класу 3-гідроксифлавонів, здатного до ізомеризації в збудженому електронному стані з утворенням нормальної ( $N^*$ ) і таутомерної ( $T^*$ ) форм. Положення й інтенсивність смуг флуоресценції кожної з форм залежать від параметрів оточення його молекул, таких як в'язкість, полярність, і від здатності утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки.

Спосіб включає введення в мембрани мультипараметричного флуоресцентного зонда ФМЕ, реєстрацію його спектру флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних, який полягає в тому, що за спектрами визначають інтенсивність флуоресценції  $F$  зонда на довжинах хвиль  $A$  і  $B$  діапазонів, де діапазон  $A$  знаходиться в межах 480-535 нм, а діапазон  $B$  - в межах 540-650 нм, будують залежність відношення цих інтенсивностей  $F_A/F_B$  від концентрації мембранотропної речовини і за збільшенням відношення  $F_A/F_B$  порівняно з аналогічним параметром, виміряним для даного виду мембран за відсутності мембранотропної речовини, роблять висновок про його мембранотропну активність.

У мембранах ФМЕ локалізується на межі полярної і неполярної областей ліпідного бішару.

Мультипараметричний флуоресцентний зонд ФМЕ використовувався для визначення мембранотропної активності кріопротекторів [13].

Основним недоліком цього способу є те, що в мембранах ФМЕ локалізується лише в області гліцеринових залишків фосфоліпідів ліпідного бішару. Отже, ФМЕ не дозволяє здійснювати моніторинг змін в інших обширних областях ліпідних мембран: в області полярних головок фосфоліпідів,

в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення такого способу визначення мембранотропної активності ЛОС, який, за рахунок використання набору інших мембранних зондів, дозволить здійснювати моніторинг змін у всіх областях ліпідного бішару мембран, точніше встановити локалізацію змін в ліпідному бішарі, підвищити достовірність визначення змін в мембранах за рахунок зіставлення даних для зондів з різною локалізацією в ліпідному бішару мембран.

Для вирішення поставленої задачі в способі, вибраному за найближчий аналог, який включає введення в досліджувані мембрани набору флуоресцентних зондів, реєстрацію їх спектрів флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних, згідно з корисною моделлю, в мембрани вводять набір мультипараметричних флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, що містить ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу, на спектрофлуориметрі реєструють їх спектри флуоресценції, після чого проводять математичну обробку спектральних даних, яка полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції зондів  $F_B$  та  $F_A$ , відповідно, на довжинах хвиль  $A$  і  $B$  діапазонів, де діапазон  $A$  знаходиться в межах 370-425 нм, а діапазон  $B$  - в межах 450-600 нм, для кожного із зондів обчислюють відношення значень інтенсивності флуоресценції зондів  $F_B/F_A$  для мембран, що перебували під дією легкої органічної сполуки, і за зменшенням відношення  $F_B/F_A$ , порівняно з аналогічним параметром, виміряним для даного виду мембран за відсутності легкої органічної сполуки, роблять висновок про мембранотропну активність легкої органічної сполуки.

Орто-гідроксипохідні 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу здатні до ізомеризації в збудженому електронному стані з утворенням нормальної ( $N^*$ ) і таутомерної ( $T^*$ ) форм [14]. Положення й інтенсивність смуг флуоресценції кожної з форм залежать від параметрів оточення їх молекул, таких як: в'язкість, полярність, і від здатності утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки [15].

У мембранах орто-гідроксипохідні 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу локалізуються відповідно до ліпофільності зондів [16]: 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-феніл)-1,3,4-оксадіазол (зонд D7) - в області полярних головок фосфоліпідів і в області гліцеринових залишків фосфоліпідів; 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазол (зонд D1) - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів; 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (зонд O1O) - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп фосфоліпідів; 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол (зонд O6O) - в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів; 2-(2'-ОН-феніл)-9,10-фенантр-1,3-оксазол (зонд PH7) - в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран.

Використання набору флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран для визначення мембранотропної активності ЛОС дозволяє:

- здійснювати моніторинг змін у всіх областях ліпідного бішару мембран;
- точніше встановити локалізацію змін у ліпідному бішарі мембран;
- підвищити достовірність визначення змін у мембранах за рахунок зіставлення даних для зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран.

Спосіб здійснюють таким чином.

Кожний із флуоресцентних зондів набору (ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу) додають в кількості 10 мкл до 2 мл суспензії штучних або природних мембран, що не були під дією ЛОС, у вигляді ацетонітрильного розчину з початковою концентрацією  $2 \cdot 10^{-4}$  М. Кінцева концентрація зонда в суспензії досліджуваних мембран складе  $1 \cdot 10^{-6}$  М (молярне відношення ліпід/зонд складає 1000:1). Після 60-хвилинної інкубації зразка із зондом вимірюють його спектр флуоресценції, вибираючи довжину хвилі збудження в області 330 нм. За отриманими спектрами флуоресценції для кожного із зондів знаходять значення інтенсивностей  $F_A$  і  $F_B$ , виміряні на довжинах хвиль А і Б діапазонів, де діапазон А знаходиться в межах 370-425 нм, а діапазон Б знаходиться в межах 450-450 нм і визначають співвідношення  $F_B/F_A$ . Аналогічні вимірювання виконують проводять для зразків, що перебували під дією легкої органічної сполуки. За виміряними значеннями інтенсивностей флуоресценції зондів обчислюють відношення  $F_B/F_A$  для мембран, що перебували під дією легкої органічної сполуки, і по зменшенню відношення  $F_B/F_A$ , порівняно з контролем, тобто з аналогічним параметром, виміряним

для даного виду мембран за відсутності легкої органічної сполуки, роблять висновок про мембранотропну активність легкої органічної сполуки.

#### Приклад 1

Флуоресцентні зонди (ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу) розчиняли в ацетонітрилі до початкової концентрації кожного із зондів  $2 \cdot 10^{-4}$  М. 10 мкл ацетонітрильного розчину зонда додавали до 2,0 мл суспензії ліпідних везикул (розмір везикул в межах 40-50 нм), приготованих з яєчного фосфатидилхоліну (із вмістом ліпиду 2,0 мг/мл) і добавкою 25 молярних відсотків холестерину і 5 мкг/л білка (сироваткового альбуміну). Світлорозсіювання суспензії часток, оцінюване за поглинанням на довжині хвилі 400 нм, знаходилося в межах 0,24-0,25. Флуоресцентні зонди інкубували з ліпідними везикулами протягом 60 хв. і реєстрували спектри флуоресценції зондів в області 340-600 нм на спектрофлуориметрі Hitachi F4010 (Японія) при ширині щілин монохроматорів збудження і флуоресценції 5 нм і 5 нм, відповідно, та довжині хвилі збудження 330 нм. Після цього з отриманих спектрів знаходили максимуми флуоресценції зондів на довжинах хвиль А і Б, які вибирали при 410 і 500 нм, відповідно. Для кожного із зондів визначали співвідношення інтенсивностей флуоресценції  $F_{500}/F_{410}$ . Аналогічні виміри проводили для зразків мембран, що перебували під дією ацетону, і для кожного із зондів обчислювали відношення  $F_{500}/F_{410}$ . За різницею величин відношень  $F_{500}/F_{410}$  для контрольних мембран і мембран, що перебували під дією полярного, здатного до утворення водневих зв'язків розчинника - ацетону, оцінювали порушення структури мембран і локалізацію цих змін у мембранах. Отримані результати фіксували в табл. 1.

Таблиця 1

Дія насиченої пари ацетону на модельні мембрани

Зонд	$F_{500}/F_{410}$	
	контроль	ацетон
D7	0,7	0,7
D1	8,2	8,2
O1O	13,1	6,0
O6O	9,8	9,5
PH7	3,4	3,4

Для оцінки дії пари ацетону використовувалися мембрани, заздалегідь поміщені на 1 годину в насичену пару ацетону в герметичній скляній посудині (2 мл розчинника випарювали в 1 л об'єму з чашки Петрі діаметром 90 мм протягом 15-20 хв.). Суспензія модельних мембран перебувала під дією насиченої пари ацетону протягом однієї години.

Зменшення величини відношення  $F_{500}/F_{410}$  зонда O1O (2,5-діарил-1,3-оксазолу) для мембран, що перебували під дією ацетону, свідчить про збільшення протіоакцепторної здатності й полярності його мікрооточення в мембрані. Зважаючи на відсутність змін для інших зондів, зміну

мікрооточення зонда O1O було віднесено до накопичення ацетону в зоні локалізації зонда O1O - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп фосфоліпідів. Установлена можливість накопичення ацетону в ліпідному бішарі допомагає з'ясувати механізм дії ацетону на рецепторні білки мембран.

#### Приклад 2

Флуоресцентні зонди (ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу) розчиняли в ацетонітрилі до початкової концентрації кожного із зондів  $2 \cdot 10^{-4}$  М. 10 мкл ацетонітрильного розчину зонда додавали до 2,0 мл суспензії клітин ньюхового

аналізатора щурів, інкубували 60 хв. і реєстрували спектри флуоресценції зондів, як описано в прикладі 1. Визначали інтенсивності флуоресценції зондів на довжинах хвиль А і Б, які вибирали при 410 і 500 нм, відповідно. Для кожного із зондів визначали співвідношення інтенсивностей флуоресценції  $F_{500}/F_{410}$ . За різницею величин відношень  $F_{500}/F_{410}$  для контрольних мембран і

мембран, що перебували під дією ацетону, оцінювали порушення структури мембран і локалізацію цих змін у мембранах. Отримані результати фіксували в табл. 2.

Вплив інгаляцій ацетону на мембрани клітин нюхового аналізатора щурів вивчався у нелінійних лабораторних щурів (12 щурів-самців).

Таблиця 2

Дія насиченої пари ацетону на мембрани клітин нюхового аналізатора щурів

Зонд	$F_{500}/F_{410}$	
	контроль	Ацетон
D7	0,7	0,7
D1	9,0	6,5
O1O	14,7	4,1
O6O	11,1	6,5
PH7	3,5	3,5

Контрольну групу склали 5 інтактних щурів. Заздалегідь, упродовж однієї години, колби ємкістю 0.5 л насичували парою ацетону. Потім у них поміщали щурів. Час інгаляції насиченою парою ацетону складав 10 хв. Після чого, тканини слизового епітелію витягувалися з носової порожнини щурів і ресуспендувалися в 15 мМ фосфатному буфері (pH 7).

Зменшення величин відношень  $F_{500}/F_{410}$  зондів D1, O1O, O6O для мембран, що перебували під дією ацетону, свідчить про збільшення протонакцепторної здатності й полярності їх мікрооточення в мембрані. Зважаючи на відсутність змін для зондів D7 і PH7, зміна мікрооточення зондів D1, O1O, O6 віднесена до накопичення ацетону в зоні локалізації зондів - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів, а також в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів. Таким чином, показано, що накопичення ацетону в мембранах клітин слизового епітелію відбувається в дещо більшій області ліпідного бішару, ніж у випадку модельних мембран. Установлена можли-

вість накопичення ацетону в ліпідному бішарі допомагає з'ясувати механізм дії ацетону на рецепторні білки мембран клітин слизового епітелію.

#### Приклад 3

Флуоресцентні зонди (ряд ортогідрокси-похідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу) розчиняли в ацетонітрилі до початкової концентрації кожного із зондів  $2 \cdot 10^{-4}$  М. 10 мкл ацетонітрильного розчину зонда додавали до 2,0 мл суспензії клітин нюхового аналізатора щурів, інкубували 60 хв. і реєстрували спектри флуоресценції зондів, як описано в прикладі 1. Визначали інтенсивності флуоресценції зондів на довжинах хвиль А і Б, які вибирали при 410 і 500 нм, відповідно. Для кожного із зондів визначали співвідношення інтенсивностей флуоресценції  $F_{500}/F_{410}$ . За різницею величин відношень  $F_{500}/F_{410}$  для контрольних мембран і мембран, що перебували під дією уайт-спіриту (ізооктану), оцінювали порушення структури мембран і локалізацію цих змін у мембранах. Отримані результати фіксували в табл. 3.

Таблиця 3

Дія насиченої пари уайт-спіриту (ізооктану) на мембрани клітин нюхового аналізатора щурів

Зонд	$F_{500}/F_{410}$	
	контроль	ацетон
D7	0,7	0,6
D1	9,0	6,8
O1O	14,7	14,7
O6O	11,1	11,1
PH7	3,5	3,5

Вплив інгаляцій неполярного та такого, що не створює водневих зв'язків, розчинника - уайт-спіриту (ізооктану) на мембрани клітин нюхового аналізатора щурів вивчався у нелінійних лабораторних щурів (12 щурів-самців). Контрольну групу склали 5 інтактних щурів. Заздалегідь, упродовж однієї години, колби ємкістю 0.5 л насичували

парою уайт-спіриту. Потім, у них поміщали щурів. Час інгаляції насиченою парою уайт-спіриту складав 10 хв. Після цього, тканини слизового епітелію витягувалися з носової порожнини щурів і ресуспендувалися в 15 мМ фосфатному буфері (pH 7).

Зменшення величин відношень  $F_{500}/F_{410}$  зондів D1 і D7 для мембран, що перебували під дією неполярного, нестворюючого водневі зв'язки розчинника - уайт-спіриту (ізооктану), свідчить про збільшення протоноакцепторної здатності і/або полярності їх мікрооточення в мембрані. Зважаючи на відсутність змін для зондів з глибшою локалізацією в ліпідному бішарі, зміна мікрооточення зондів D1 і D7 віднесена до збільшення гідратації поверхневих шарів мембранного бішарі - області полярних головок фосфоліпідів і області гліцеринових залишків фосфоліпідів. Гідратація поверхневих шарів мембрани була викликана порушенням їх структури в результаті можливої зміни конформації поверхневих білків біомембрани під дією уайт-спіриту. Отриманий результат допомагає з'ясувати механізм дії уайт-спіриту на рецепторні білки мембран клітин слизового епітелію.

Джерела інформації:

1. Берченко О.Г., Воробьєва Т.М., Бобрицкая З.М. Электрофизиологические корреляты эмоциональных механизмов формирования влечения к летучим органическим соединениям у крыс // Украинский вестник психоневрологии. - 2002. - Т.10, вып.1(30). - С.248-249.
2. Voet D., Voet J.G. Biochemistry. 3rd Ed. Wiley. - 2004. - 1600 P.
3. Garcia M.L. Ion channels: gate expectations // Nature. - 2004. - V. 430. - P. 153-155.
4. Protein-Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks. Edited by Lukas K. Tamm, Weinheim: Wiley-VCH. 2005. 437 P.
5. Yoshimura K., Sokabe M. Mechanosensitivity of ion channels based on protein-lipid interactions // J.R. Soc. Interface. - 2010. - Vol. 7. - P. S301-S320.
6. Иванов И.Т. Сравнение механизмов кислотного и щелочного гемолиза эритроцитов человека // Биофизика. - 2001. - Т. 46, вып. 2. - С. 281-290.
7. Черницкий Е.А., Сенькович О.А., Козлова Н.М. Гетерогенность пор, образуемых в мембране эритроцитов липофильными гемолизаторами // Биофизика. - 1996. - Т. 41, вып. 6. - С. 1270-1275.
8. Бондаренко В.А., Коптелов В.А., Лежанин С.Н., Олейник О.А., Рамазанов В.В., Середа Т.П. Зависимость интенсивности транспорта флуоресцина от температуры среды // Проблемы криобиологии. - 2001. - № 1. - С.3-7.

сцина от температуры среды // Проблемы криобиологии. - 2001. - № 1. - С.3-7.

9. Патент UA № 14072, G01N24/10, Спосіб визначення проникності еритроцитів для осмотично активних органічних речовин. - опубл. 25.04.1997, бюл. № 2.

10. Иванов Л.В., Ляпунов Н.А., Цымбал Л.В. и др. Влияние состава двухкомпонентных растворов на биологические мембраны // Хим.-фарм. журнал. - 1988. - № 1. - С. 1437-1443.

11. Цымбал Л.В., Нардид Я.О. Проницаемость мембран эритроцитов, модифицированных высокими температурами и сульфгидрильными реагентами Актуальные проблемы медицины и биологии // Сборник научн. тр., Киев, 2004.-С. 185-189.

12. Sikkema J., de Bontt J.A.M., Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes // The Journal of Biological Chemistry. - 1994. - Vol. 269, No. 11. - P. 8022-8028.

13. Декларативний патент на корисну модель UA № 13838, G01N33/483, G01N21/64. Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора. - Опубл. 17.04.2006, Бюл. № 4.

14. Дорошенко А.О., Посохов Е.А., Шершуков В.М., Митина В.Г., Пономарев О. А. Реакция внутримолекулярного переноса протона в возбужденном состоянии в ряду ортогидроксипроизводных 2,5-диарилксазола // Химия высоких энергий. - 1997. - Т.31, №6. - С.395-402.

15. Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A., Ptyagina L.M., Skripkina V.T., Shershukov V.M. Radiationless deactivation of the excited phototautomer form and molecular structure of ESIP-Compounds // Photochemical and Photobiological Sciences. - 2002. - Vol.1. - P.92-99.

16. Посохов Е.А., Бойко Т.П., Абманова Н.А., Бойко Т.П., Дорошенко А.О. Ортогидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для медико-биологических исследований // Вестник Харьковского университета. Химия. - 2001. - Вып.7(30), №532. - С.192-194.