



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71516** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/483 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 02917	(72) Винахідник(и): Посохов Євген Олександрович (UA), Корнієнко Євген Михайлович (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.03.2012	(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА, пл. Свободи, 4, м. Харків, 61077 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2012, Бюл.№ 13	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕМБРАНОТРОПНОЇ АКТИВНОСТІ КРІОПРОТЕКТОРА

(57) Реферат:

Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора, що включає введення у досліджувані мембрани флуоресцентних зондів, реєстрацію спектрів їх флуоресценції та математичну обробку одержаних спектральних даних. У мембрани, які піддавали дії кріопротектора, та у мембрани, які не піддавали дії кріопротектора, вводять набір флуоресцентних зондів, складених із зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, а математична обробка спектральних даних полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції зондів.

UA 71516 U

Корисна модель належить до галузі кріобіології, біохімії, біофізики і може бути використана для порівняльної експрес-оцінки впливу різних кріопротекторів на стан ліпідного бішару штучних або природних (клітинних) мембран при підборі оптимального кріопротектора, для тестування мембранотропної активності нових речовин на здатність виступати в ролі кріопротектора, а також для визначення максимальних концентрацій кріопротектора, які можуть бути застосовані при кріоконсервуванні клітин.

Кріопротектори - захисні речовини, які значною мірою послаблюють негативні наслідки дії низьких температур при кріоконсервуванні клітин людини і тварин. Однак, деякі кріопротектори здатні пошкоджувати мембрани клітин і виявляти цитотоксичну дію ще до заморожування, на етапі еквілібрації клітин в кріозахисних розчинах і, таким чином, сенсibiliзувати їх до наступної дії зниження температури і супутніх факторів. Вплив кріопротектора на структуру мембран залежить як від типу клітин, так і від виду тварин: навіть один і той же кріопротектор може по-різному впливати на мембрани одного типу клітин, але отриманих з різних тварин, що пов'язано з видовими розбіжностями білок-ліпідного складу їх цитоплазматичних мембран. Таким чином як для тестування нових речовин - потенціальних кріопротекторів, так і для оцінки ефективності дії кріопротектора по відношенню до певного виду клітин, необхідно оцінювати його вплив 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 луги (кислотний або лужний гемолиз) [1].

Однак, ці способи застосовують лише для еритроцитів, і вони не можуть бути використані для клітин, які не містять гемоглобін. Крім того, неоднорідність розподілу еритроцитів за віком, наявність і неоднакова кількість холестерину в різних індивідуальних зразках еритроцитів не дозволяють вважати цей метод універсальним для оцінки мембранотропних властивостей кріопротектора. До того ж, залежність ступеня гемолізу еритроцитів від концентрації малих гідрофільних молекул має лінійний характер, а для ліпофільних органічних молекул ця залежність має нелінійний характер [2], що значно ускладнює інтерпретацію і зіставлення результатів для порівняння мембранотропних властивостей різних класів хімічних речовин.

Існує спосіб визначення мембранотропної активності речовин, який ґрунтується на введенні в клітини флуоресцеїн діацетату, що в клітинах гідролізується естеразами до вільного флуоресцеїну. Флуоресцеїн має гіршу проникливість через ліпідний бішар мембрани, що дозволяє використовувати його як маркер цілісності плазматичної мембрани [3].

Серед обмежень цього 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.

Відомий спосіб визначення мембранотропної активності органічних сполук шляхом оцінки зміни проникності мембран клітин для фериціаніду калію за методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) [4]. Для цього клітини насичують сумішшю фериціаніду калію, який не проникає в непошкоджені клітини, і парамагнітного іміноксильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопіперидин-1-оксиду, який здатний проникати всередину непошкоджених клітин. При порушенні 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 радикала 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 кріопротектора 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 [5]. 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 4×10^{-4} - 5×10^{-5} М. Такі концентрації є досить високими і можуть спричинити негативний вплив на біомембрани. З іншого боку, у процесі використання

менших концентрацій зондів необхідно застосовувати накопичення сигналів, яке подовжує час вимірювань; 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; висока вартість ЕПР-зондів, які використовуються для досліджень.

Відомий спосіб визначення мембранотропної активності речовин ґрунтується на вимірюванні поляризації флуоресценції зондів ДФГТ, ТМА-ДФГТ [6].

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_{\parallel} , (б) при положенні

поляризатора емісії перпендикулярно поляризатору збудження, тобто F_{\perp} , обчислюють величину анізотропії флуоресценції r , встановлюють залежність величини анізотропії флуоресценції r від концентрації мембранотропної речовини і за зменшенням величини r порівняно з аналогічним параметром, вимірним для даного виду мембран за відсутності мембранотропної речовини, та 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).

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 5000 \$);

- 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 [7], який включає введення в досліджувані мембрани флуоресцентних зондів, реєстрацію спектрів їх флуоресценції та проведення математичної обробки одержаних спектральних даних.

При виконанні зазначеного способу передбачається використання флуоресцентного зонда ФМЕ, що є представником класу 3-гідроксифлавонов, здатного до ізомеризації в збудженому електронному стані з утворенням нормальної (N^*) і тауомерної (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 флуоресцентного зонда ФМЕ, реєстрацію його спектра 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 графік залежності відношення інтенсивностей F_A/F_B від концентрації мембранотропної речовини і за зростанням відношення F_A/F_B порівняно з аналогічним параметром, обчисленим для даного виду мембран за відсутності кріопротектора, роблять висновок про мембранотропну активність кріопротектора.

Основним недоліком цього способу є те, що локалізація ФМЕ в мембранах відбувається на межі полярної і неполярної областей ліпідного бішару [7], тобто локалізується лише в області гліцеринових залишків фосфоліпідів ліпідного бішару. Отже, ФМЕ не дозволяє здійснювати моніторинг змін в інших великих ділянках ліпідних мембран: в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення такого способу визначення мембранотропної активності кріопротектора, використання якого дозволить здійснювати моніторинг змін у різних 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 флуоресцентного зонда, реєстрацію його спектра флуоресценції, проведення математичної обробки спектральних даних, згідно з корисною моделлю, у мембрани вводять набір флуоресцентних зондів, які мають різну локалізацію в ліпідному бішарі мембран, у вигляді ряду орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу, а математична обробка спектральних даних полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції зондів F_A та F_B , 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, причому, для кожного із зондів обчислюють відношення значень інтенсивності флуоресценції зондів F_B/F_A для мембран, що піддавали дії кріопротектора, і за зменшенням відношення F_B/F_A , порівняно з аналогічним параметром, вимірним для даного виду мембран за відсутності кріопротектора, роблять висновок про мембранотропну активність кріопротектора.

Орто-гідроксипохідні 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу здатні 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 їх молекул, таких як: полярність, в'язкість і від здатності утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки.

У мембранах орто-гідроксипохідні 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу локалізуються відповідно до ліпофільності зондів: 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (зонд О10) - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів (ближче до центру ліпідного бішару), в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів, прилеглих до області карбонільних груп; 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол (зонд О60) - в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля полярної частини бішару; 2-(2'-ОН-феніл)-9,10-фенантр-1,3-оксазол (зонд РН7) - в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля центру ліпідного бішару і в центрі ліпідного бішару мембран.

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

- здійснювати моніторинг змін у різних 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) додають в кількості 10 мкл до 2 мл суспензії штучних або природних мембран, що не були під дією кріопротектора, 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. 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 450-600 нм і визначають співвідношення F_B/F_A . Аналогічні вимірювання проводять для зразків, що перебували під дією кріопротектора. За вимірними значеннями інтенсивностей флуоресценції зондів обчислюють відношення F_B/F_A для мембран, що перебували під дією кріопротектора, і по зменшенню відношення F_B/F_A , порівняно з контролем, тобто з аналогічним параметром, вимірним для даного виду мембран за відсутності кріопротектора, роблять висновок про мембранотропну активність кріопротектора.

Приклад 1.

Флуоресцентні зонди (ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу) 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 еритроцитів людини. Еритроцити чоловіків II - групи Rh (+) були отримані з еритроцитарної маси, приготованої станцією переливання крові. Безпосередньо перед експериментом еритроцити центрифугували чотири рази: кожен раз протягом 3 хвилини при 3000 об/хв. у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л хлориду натрію) при кімнатній температурі 20-22 °С. Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли методом аспірації. Світлорозсіювання суспензії часток, оцінюване за поглинанням на довжині хвилі 400 нм, знаходилося в межах 0,24-0,25. Молярне відношення ліпід/зонд складало 1000:1. Флуоресцентні зонди інкубували з еритроцитами людини 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 375 і 470 нм, відповідно, для

зонда О10, і при 420 і 485 нм, відповідно, для зонда О60 і для зонда РН7. Для кожного із зондів обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції F_B/F_A : відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 дорівнювало 3,8, відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 дорівнювало 25,0, відношення F_{485}/F_{420} для зонда РН7 дорівнювало 3,2. Аналогічні виміри проводили для зразків клітин, що перебували під дією диметилсульфоксиду (ДМСО), і для кожного із зондів обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції F_B/F_A : відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10, відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 і для зонда РН7. За різницею величин відношень F_B/F_A для контрольних мембран і мембран, що перебували під дією ДМСО оцінювали порушення структури мембран і локалізацію цих змін у мембранах. Для оцінки дії кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) використовувалися еритроцити, які перебували 40 хвилин під дією ДМСО. Експозицією еритроцитів з диметилсульфоксидом (ДМСО) (0,5; 1; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 15 об. %) здійснювали шляхом змішування з відповідним кріоконсервуючим середовищем у співвідношенні 1:1 (гематокрит: 40-45 %). Було знайдено, що порівняно з відповідними величинами для контрольних мембран, спостерігалось різке зменшення величини відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 та величини відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 для мембран еритроцитів людини, що перебували під дією ДМСО, починаючи з концентрації 1,5 об. % ДМСО: величина відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 у мембранах еритроцитів людини, які перебували під дією 1,5 об. % ДМСО становила 2,5; величина відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 у мембранах еритроцитів людини, які перебували під дією 1,5 об. % ДМСО становила 17,9. Таким чином, показано, що початкова концентрація ДМСО, яка спричиняє порушення упаковки мембран еритроцитів людини становить 1,5 об. %. Було встановлено, що величина відношення F_{485}/F_{420} для зонда РН7 для мембран еритроцитів людини, що перебували під дією ДМСО не відрізнялась від відповідного відношення для контрольних мембран. Таким чином, показано, що дія ДМСО спричиняє порушення упаковки мембран еритроцитів людини в більш полярних областях ліпідного бішару (областях локалізації зондів О10 і О60): в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля полярної частини бішару, і не спричиняє змін в більш гідрофобних областях ліпідного бішару (області локалізації зонда РН7): в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля центру ліпідного бішару і в центрі ліпідного бішару мембран.

Приклад 2.

Флуоресцентні зонди (ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу) 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 еритроцитів людини, 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 375 і 470 нм, відповідно, для зонда О10, і при 420 і 485 нм, відповідно, для зонда О60 і для зонда РН7. Для кожного із зондів обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції F_B/F_A : відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 дорівнювало 3,8, відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 дорівнювало 25,0, відношення F_{485}/F_{420} для зонда РН7 дорівнювало 3,2. Аналогічні виміри проводили для зразків клітин, що перебували під дією гліцерину, і для кожного із зондів обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції F_B/F_A : відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10, відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 і для зонда РН7. За різницею величин відношень F_B/F_A для контрольних мембран і мембран, що перебували під дією гліцерину оцінювали порушення структури мембран і локалізацію цих змін у мембранах. Для оцінки дії кріопротектора гліцерину використовувалися еритроцити, які перебували 40 хвилин під дією гліцерину. Експозицією еритроцитів з гліцерином (0,5; 1; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 15 об. %) здійснювали як описано у прикладі 1. Було знайдено, що, порівняно з відповідними величинами для контрольних мембран, спостерігалось різке зменшення величини відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 та величини відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 для мембран еритроцитів людини, що перебували під дією гліцерину, починаючи з концентрації гліцерину 0,5 об. %: величина відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 у мембранах еритроцитів людини, які перебували під дією 1,5 об. % гліцерину становила 1,4; величина відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 у мембранах еритроцитів людини, які перебували під дією 0,5 об. % гліцерину становила 10,1. Таким чином, показано, що початкова концентрація гліцерину, яка спричиняє порушення упаковки мембран еритроцитів людини становить 0,5 об. %. Було встановлено, що величина відношення F_{485}/F_{420} для зонда РН7 для мембран еритроцитів людини, що перебували під дією гліцерину не відрізнялась від відповідного відношення для контрольних мембран. Таким чином, показано, що дія гліцерину спричиняє порушення упаковки мембран еритроцитів людини в більш полярних областях ліпідного бішару (областях локалізації зондів О10 і О60): в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля полярної частини бішару, і

не спричиняє змін в більш гідрофобних областях ліпідного бішару (області локалізації зонда RH7): в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля центру ліпідного бішару і в центрі ліпідного бішару мембран.

Приклад 3.

5 Флуоресцентні зонди (ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу) 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 еритроцитів людини, 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 375 і 470 нм, відповідно, для зонда О10, і при 420 і 485 нм, відповідно, для зонда О60 і для зонда RH7. Для кожного із зондів обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції F_B/F_A : відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 дорівнювало 3,8, відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 дорівнювало 25,0, відношення F_{485}/F_{420} для зонда RH7 дорівнювало 3,2. Аналогічні виміри проводили для зразків клітин, що перебували під дією 1,2-пропандіолу, і для кожного із зондів обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції F_B/F_A : відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10, відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 і для зонда RH7. За різницею величин відношень F_B/F_A для контрольних мембран і мембран, що перебували під дією 1,2-пропандіолу оцінювали порушення структури мембран і локалізацію цих змін у мембранах. Для оцінки дії кріопротектора гліцерину використовувалися еритроцити, які перебували 40 хвилин під дією 1,2-пропандіолу. Експозицією еритроцитів з 1,2-пропандіолом (0,5; 1; 1,5; 2,5; 5; 7,5; 15 об. %) здійснювали як описано у прикладі 1. Було знайдено, що порівняно з відповідними величинами для контрольних мембран, спостерігалось різке зменшення величини відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 та величини відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 для мембран еритроцитів людини, що перебували під дією 1,2-пропандіолу, починаючи з концентрації 1,2-пропандіолу 5,0 об. %: величина відношення F_{470}/F_{375} для зонда О10 у мембранах еритроцитів людини, які перебували під дією 5,0 об. % 1,2-пропандіолу становила 1,3; величина відношення F_{485}/F_{420} для зонда О60 у мембранах еритроцитів людини, які перебували під дією 5,0 об. % 1,2-пропандіолу становила 11,2. Таким чином, показано, що початкова концентрація 1,2-пропандіолу, яка спричиняє порушення упаковки мембран еритроцитів людини становить 5,0 об. %. Було встановлено, що величина відношення F_{485}/F_{420} для зонда RH7 для мембран еритроцитів людини, що перебували під дією 1,2-пропандіолу не відрізнялась від відповідного відношення для контрольних мембран. Таким чином, показано, що дія 1,2-пропандіолу спричиняє порушення упаковки мембран еритроцитів людини в більш полярних областях ліпідного бішару (областях локалізації зондів О10 і О60): в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля полярної частини бішару, і не спричиняє змін в більш гідрофобних областях ліпідного бішару (області локалізації зонда RH7): в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля центру ліпідного бішару і в центрі ліпідного бішару мембран.

Джерела інформації:

- 40 1. Иванов И.Т. Сравнение механизмов кислотного и щелочного гемолиза эритроцитов человека // Биофизика.-2001. - Т. 4. - Вып. 2. - С. 281-290.
2. Черницкий Е.А., Сенькович О.А., Козлова Н.М. Гетерогенность пор, образуемых в мембране эритроцитов липофильными гемолитиками // Биофизика.-1996. - Т. 41. - Вып. 6. - С. 1270-1275.
- 45 3. Бондаренко В.А., Коптелов В.А., Лежанин С.Н., Олейник О.А., Рамазанов В.В., Середа Т.П. Зависимость интенсивности транспорта флуоресцеина от температуры среды // Проблемы криобиологии.-2001. - № 1. - С. 3-7.
4. Патент UA № 14072, G01N 24/10, Спосіб визначення проникності еритроцитів для осмотично активних органічних речовин, - опубл. 25.04.1997, бюл. № 2.
- 50 5. Иванов Л.В., Ляпунов Н.А., Цымбал Л.В. и др. Влияние состава двухкомпонентных растворителей на биологические мембраны // Хим.-фарм. журнал.-1988. - № 1. - С. 1437-1443.
6. 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.
7. Декларацийний патент на корисну модель UA № 13838, G01N 33/483, G01N 21/64. Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора. - Опубл. 17.04.2006, Бюл. № 4.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора, що включає введення у досліджувані мембрани флуоресцентних зондів, реєстрацію спектрів їх флуоресценції та математичну обробку одержаних спектральних даних, який **відрізняється** тим, що у мембрани, які піддавали дії кріопротектора, та у мембрани, які не піддавали дії кріопротектора, вводять набір флуоресцентних зондів, складених із зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, у вигляді ряду орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу, а математична обробка спектральних даних полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції зондів F_A та F_B , 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, причому для кожного із зондів обчислюють відношення значень інтенсивності флуоресценції зондів F_B/F_A для мембран, що піддавали дії кріопротектора, і за зменшенням відношення F_B/F_A і порівняно з аналогічним параметром, виміряним для даного виду мембран за відсутності кріопротектора, роблять висновок про мембранотропну активність кріопротектора.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601