

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
Palladin Institute of Biochemistry

BIOTECHNOLOGIA ACTA

Vol. 7, No 2, 2014

BIMONTHLY

Editor-in-Chief

Komisarenko S.V. (Ukraine)

Deputies Editor-in-Chief:

Stoika R. S. (Ukraine)

Kolybo D. V. (Ukraine)

EDITORIAL BOARD

Levitsky E. L., scientific editor (Ukraine)

Vinogradova A. S., executive secretary (Ukraine)

Honchar M. V. (Ukraine)

Dzyadevych S. V. (Ukraine)

Drobot L. B. (Ukraine)

Filonenko V. V. (Ukraine)

Karpov A. V. (Ukraine)

Kunakh V. A. (Ukraine)

Kuchuk M. V. (Ukraine)

Lukash L. L. (Ukraine)

Matyshevska O. P. (Ukraine)

Melnichuk M. D. (Ukraine)

Minchenko O. G. (Ukraine)

Prylutsky Yu. I. (Ukraine)

Sandomirsky B. P. (Ukraine)

Soldatkin O. P. (Ukraine)

Spivak M. Ya. (Ukraine)

Головний редактор

Комісаренко С.В. (Україна)

Заступники головного редактора:

Стойка Р. С. (Україна)

Колибо Д. В. (Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Левицький С. Л., науковий редактор (Україна)

Виноградова А. С., відповідальний секретар (Україна)

Гончар М. В. (Україна)

Дзядевич С. В. (Україна)

Дробот Л. Б. (Україна)

Філоненко В. В. (Україна)

Карпов О. В. (Україна)

Кунах В. А. (Україна)

Кучук М. В. (Україна)

Лукаш Л. Л. (Україна)

Матишевська О. П. (Україна)

Мельничук М. Д. (Україна)

Мінченко О. Г. (Україна)

Прилуцький Ю. І. (Україна)

Сандомирський Б. П. (Україна)

Солдаткін О. П. (Україна)

Співак М. Я. (Україна)

EDITORIAL COUNCIL

Komisarenko S.V. (Ukraine) (Council Head)

Blum Ya. B. (Ukraine)

Egorov A. M. (Russia)

El'skaya G. V. (Ukraine)

Kordium V. A. (Ukraine)

Kukhar V. P. (Ukraine)

Miroshnikov A. I. (Russia)

Pidgorsky V. S. (Ukraine)

Severin E. S. (Russia)

Sibirny A. A. (Ukraine)

Sidorov V. A. (USA)

Scriabin K. G. (Russia)

Sozinov O. O. (Ukraine)

Shyrobokov V. P. (Ukraine)

РЕДАКЦІЙНА РАДА

Комісаренко С.В. (Україна) (голова)

Блюм Я. Б. (Україна)

Єгоров О. М. (Росія)

Єльська Г. В. (Україна)

Кордюм В. А. (Україна)

Кухар В. П. (Україна)

Мірошников А. І. (Росія)

Підгорський В. С. (Україна)

Северин Є. С. (Росія)

Сибірний А. А. (Україна)

Сидоров В. А. (США)

Скрябін К. Г. (Росія)

Созінов О. О. (Україна)

Широбоков В. П. (Україна)

Editorial address:

Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine,
Building 9, Leontovich str., Kyiv, Ukraine, 01601

Адреса редакції:

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, Україна, 01601.

Постановою Президії ВАК України від 27.05.2009 №1–05/2 журнал внесено до Переліку наукових фахових видань для публікації матеріалів дисертаційних робіт за спеціальностями «Біохімія» та «Біотехнологія»

Tel.: (380-44) 235-14-72; E-mail: biotech@biochem.kiev.ua; Web-site: www.biotechnology.kiev.ua
Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ №19650-9450ПР від 30.01.2013

Літературний редактор Г. М. Шевченко. Комп'ютерна верстка О. В. Мележик.

Підписано до друку 28.04.2014. Формат 210x297. Папір крейд. 115 г/м².

Гарн. SchoolBookC. Друк — цифровий. Обл.-вид. арк. 14,24. Наклад 200 прим. Замовлення 2/6.
Оригінал-макет підготовлено в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;
друк — ФОП Москаленко О. М.

BIOTECHNOLOGIA ACTA

Scientific journal

Bimonthly

Vol. 7, No 2, 2014

CONTENTS

REVIEWS

- Pirog T. P.*
Konon A. D.
Sofilkanich A. P. Microbial surfactants. II. Lipopeptides 9
- Mokrosnop V. M.*
Zolotareva E. K. Microalgae as tocopherol producers 26
- Sviatenko O. V.*
Gorbatiuk O. B.
Vasylchenko O. A. Application of immunoglobulin-binding proteins A, G, L
in the affinity chromatography 34

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Korotkevich N. V.*
Labyntsev A. Ju.
Kolibo D. V.
Komisarenko S. V. Obtaining and characterization of recombinant
fluorescent derivatives of soluble human HB-EGF 46
- Skamrova G. B.*
Prylutskyi Yu. I.
Evistigneev M. P. Combined effect of electromagnetic radiation,
DNA-intercalators, C₆₀-fullerene and caffeine
on human buccal epithelium cells 54
- Fomina M. O.* Variability of coordination complexes of copper
accumulated within fungal colony in the presence
of copper-containing minerals 63
- Ruban A. M.*
Kazanets A. I.
Krupskaya T. V.
Turov V. V. The emulsification of human serum albumin
and hyaluronic acid solutions in polydimethylsiloxane
PDMS-1000 70

<i>Dziak H. V.</i>		
<i>Shulga S. M.</i>		
<i>Adab M.</i>		
<i>Drozdov O. L.</i>		
<i>Glukh I. S.</i>	Influence of biopreparations from dry soybean and sunflower lecithins on serum lipids composition	79
<i>Marchenko M. M.</i>		
<i>Shelifist A. E.</i>		
<i>Cheban L. M.</i>	Properties of the sesquiterpene lactones of <i>in vitro</i> cultivated <i>Saussurea discolor</i> (Willd.) DC. and <i>S. porcii</i> Degen	86
<i>Akinloye O. A.</i>		
<i>Balogun E. A.</i>		
<i>Omotainse S. O.</i>		
<i>Adeleye O. O.</i>	Some effects associated with the use of the biopreparation from <i>Picralima nitida</i> seeds extract as antidiabetic agent	92
<i>Datsyuk U. V.</i>		
<i>Sabadashka M. V.</i>		
<i>Datsyuk L. A.</i>		
<i>Gnatush A. R.</i>		
<i>Slast'ya E. A.</i>	Effect of polyphenolic complex from wine on rats antioxidant enzymes activity at X-ray irradiation low doses	106
<i>Zotov A. N.</i>		
<i>Gerhzykova V. G.</i>		
<i>Sybirna N. A.</i>		
<i>Raksha-Slusareva E. A.</i>		
<i>Krul V. A.</i>	Using of secondary products of rapeseed processing in the food industry	114
<i>Slusarev A. A.</i>		
CHRONICLE		118
BOOK REVIEW		122
NOTICE		125

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

<i>Пирог Т. П. Конон А. Д. Софілканіч А. П.</i>	Мікробні поверхнево-активні речовини. II. Ліпопептиди	9
<i>Мокросноп В. М. Золотарьова О. К.</i>	Мікрородорості як продуценти токоферолів	26
<i>Святенко О. В. Горбатюк О. Б. Васильченко О. А.</i>	Використання імуноглобулінзв'язувальних протеїнів А, G, L в афінній хроматографії	34

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

<i>Короткевич Н. В. Лабинцев А. Ю. Колибо Д. В. Комісаренко С. В.</i>	Одержання та характеристика флуоресцентних похідних рекомбінантного аналога секреторної форми HB-EGF людини	46
<i>Скамрова Г. Б. Прилуцький Ю. І. Євстигнєєв М. П.</i>	Комбінована дія електромагнітного випромінювання, ДНК-інтеркаляторів, C ₆₀ -фулерену та кофеїну на клітини букального епітелію людини	54
<i>Фоміна М. О.</i>	Варіабельність координаційних сполук міді, що накопичуються в грибних колоніях у присутності мідьвмісних мінералів	63
<i>Рубан А. М. Казанець А. І. Крупська Т. В. Туров В. В.</i>	Емульсифікація розчинів сироваткового альбуміну людини та гіалуронової кислоти в полідиметилсилоксані ПДМС-1000	70
<i>Дзяк Г. В. Шульга С. М. Адаб М. Дроздов А. Л. Глух І. С.</i>	Вплив біопрепаратів із сухих лецитинів сої та соняшнику на ліпідний склад сироватки крові	79
<i>Марченко М. М. Шелифіст А. Є. Чебан Л. М.</i>	Властивості сесквітерпенових лактонів культивованих <i>in vitro Saussurea discolor</i> (Willd.) DC. та <i>S. porcii</i> Degen	86
<i>Акінлойє О. А. Балогун Є. А. Омотанзе Т. А. К. Аделейє О. О.</i>	Деякі несприятливі ефекти, пов'язані з використанням біопрепарату з екстракту насіння <i>Picralima nitida</i> як антидіабетичного агента	92

<i>Дацюк У. В.</i>		
<i>Сабадашка М. В.</i>		
<i>Дацюк Л. О.</i>		
<i>Гнатуш А. Р.</i>	Вплив поліфенольного комплексу з виноградного вина	
<i>Сластья Є. А.</i>	на активність антиоксидантних ензимів у щурів	
<i>Зотов А. М.</i>	за низьких доз рентгенівського випромінювання	106
<i>Гержикова В. Г.</i>		
<i>Сибірна Н. О.</i>		
<i>Ракша-Слюсарєва О. А.</i>	Використання вторинних продуктів	
<i>Круль В. О.</i>	перероблення ріпаку в харчовій промисловості	114
<i>Слюсарєв О. А.</i>		
ХРОНІКА		118
РЕЦЕНЗІЇ		122
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ		125

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Пирог Т. П.*
Конон А. Д.
Софилканич А. П. Микробные поверхностно-активные вещества.
II. Липопептиды 9
- Мокросноп В. М.*
Золотарева Е. К. Микроводоросли как продуценты токоферолов 26
- Святенко О. В.*
Горбатюк О. Б.
Васильченко О. А. Использование иммуноглобулинсвязывающих
протеинов А, G, L в аффинной хроматографии. 34

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Короткевич Н. В.*
Лабынцев А. Ю.
Колибо Д. В.
Комисаренко С. В. Получение и характеристика флуоресцентных
производных рекомбинантного аналога
секреторной формы HB-EGF человека. 46
- Скамрова Г. Б.*
Прилуцкий Ю. И.
Евстигнеев М. П. Комбинированное действие электромагнитного излучения,
ДНК-интеркаляторов, C₆₀-фуллерена и кофеина
на клетки буккального эпителия человека. 54
- Фомина М. А.* Вариабельность координационных соединений меди,
аккумулированных в грибных колониях в присутствии
медьсодержащих минералов 63
- Рубан А. Н.*
Казанец А. И.
Крупская Т. В.
Туров В. В. Эмульсификация растворов сывороточного альбумина
человека и гиалуроновой кислоты
в полидиметилсилоксане ПДМС-1000. 70
- Дзяк Г. В.*
Шульга С. М.
Адаб М.
Дроздов А. Л.
Глух И. С. Влияние биопрепаратов из сухих лецитинов сои и
подсолнечника на липидный состав сыворотки крови. . . 79
- Марченко М. М.*
Шелифост А. Е.
Чебан Л. Н. Свойства сесквитерпеновых лактонов культивируемых
in vitro Saussurea discolor (Willd.) DC.
и *S. porcii* Degen. 86
- Акинлойе О. А.*
Балогун Е. А.
Омотанзе Т. А. К.
Аделейе О. О. Некоторые неблагоприятные эффекты,
связанные с использованием биопрепарата
из экстракта семян *Picralima nitida*
в качестве антидиабетического агента 92

<i>Дацюк У. В.</i>		
<i>Сабадашка М. В.</i>		
<i>Дацюк Л. А.</i>	Влияние полифенольного комплекса	
<i>Гнатуш А. Р.</i>	из виноградного вина на активность антиоксидантных	
<i>Сластья Е. А.</i>	энзимов у крыс при низких дозах	
<i>Зотов А. Н.</i>	рентгеновского излучения106
<i>Гержикова В. Г.</i>		
<i>Сибирная Н. А.</i>		
<i>Ракша-Слюсарева Е. А.</i>	Использование вторичных продуктов переработки рапса	
<i>Круль В. А.</i>	в пищевой промышленности114
<i>Слюсарев А. А.</i>		
ХРОНИКА	 118
РЕЦЕНЗИИ	 122
ИНФОРМАЦИОННОЕ СООБЩЕНИЕ	 125

УДК 759.873.088.5:661.185

МІКРОБНІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ. II. ЛІПОПЕПТИДИ

Т. П. ПИРОГ, А. Д. КОНОН, А. П. СОФІЛКАНИЧ

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

E-mail: tapiro@nuft.edu.ua

Отримано 16.09.2013

Подано класифікацію та розглянуто хімічну структуру ліпопептидів, їхніх продуцентів (представники родів *Bacillus* і *Pseudomonas*). Описано роль ліпопептидів у русі клітин та формуванні біоплівки, зв'язуванні металів і деструкції ксенобіотиків, а також дію їх на клітини про- та еукаріотів. Наведено етапи нерибосомального синтезу ліпопептидів і висвітлено роль двокомпонентних (GacA/GacS, ComA/ComP) та кворумної систем у регуляції цього процесу.

Розкрито потенціал молочнокислих бактерій та морських мікроорганізмів як нетрадиційних перспективних продуцентів поверхнево-активних речовин різної хімічної природи (ліпопептидів, фосфоліпідів і жирних кислот, гліколіпопептидів), показано їхню продуктивність та переваги перед традиційними продуцентами. Описано властивості поверхнево-активних речовин, синтезованих молочнокислими бактеріями (зниження поверхневого натягу, критична концентрація міцелотворення, стійкість у широкому діапазоні рН, температури, біологічна дія).

Поверхнево-активні речовини пробіотичних непатогенних бактерій можуть бути використані як ефективні антиадгезивні та антимікробні агенти, а морські продуценти здатні до синтезу унікальних метаболітів, що не продукуються іншими мікроорганізмами.

Ключові слова: мікробні поверхнево-активні речовини, ліпопептиди, нетрадиційні продуценти.

Достатньо дослідженими поверхнево-активними речовинами (ПАР) є ліпопептиди, що їх використовують в основному як ефективні антимікробні агенти [1–20]. Окрім того, здійснюється пошук нових продуцентів ПАР [21–23], зокрема й серед таких нетрадиційних, як молочнокислі бактерії [24–29] та морські мікроорганізми [30–37].

Унікальні особливості мікробних ПАР зумовлюють їх використання в різноманітних галузях промисловості замість хімічно синтезованих аналогів. ПАР мікробного походження набули застосування для вирішення низки практичних завдань, що гостро постали перед людством: усунення екологічних проблем (забруднення ґрунтів і водою токсичними ксенобіотиками, що загрожує екологічною катастрофою), пошук альтернативних антимікробних препаратів проти резистентних мікроорганізмів тощо.

Ліпопептиди складаються з ліпідної частини, з'єднаної з коротким лінійним або циклічним олігопептидом. Продуцента-

ми ліпопептидів є як бактерії (найвідоміші — представники родів *Pseudomonas* та *Bacillus*), так і гриби [13].

Останніми роками детально досліджують фізіологічну роль поверхнево-активних ліпопептидів [13, 30, 38, 39], регуляцію їх біосинтезу [13, 40–42], ведуть пошуки нових продуцентів [43–51]. Значно менше уваги приділено оптимізації процесів їх біосинтезу [52, 53].

Продуценти та класифікація за хімічною структурою. Одними з найбільш вивчених продуцентів ліпопептидів є штами *Bacillus subtilis*, які синтезують сурфактин [48, 51, 54–57]. Перші повідомлення про цей ліпопептид датуються кінцем 60-х років ХХ ст. [58]. Синтезувати ПАР здатні також й інші представники роду *Bacillus*, наприклад *B. amyloliquifaciens* KSU-109 [46].

Окрім сурфактину найвідомішими ліпопептидами є відкриті у 60–70-х рр. ХХ ст. граміцидін S (*B. brevis*) та поліміксин (*B. polymyxa*), а також антифунгальні ліпо-

пептиди ітурин та фенгіцин (*B. subtilis*) [59]. Значно пізніше почали вивчати ліпопептиди псевдомонад, першим з яких був віскозин *Pseudomonas fluorescens*, описаний у 1990 р. [60].

Нині з появою дедалі більшої кількості нових різноманітних ліпопептидів представників родів *Bacillus* та *Pseudomonas* здійснюються спроби їх класифікації за структурою. Так, ліпопептиди різняться за довжиною і складом ліпідного залишку і типом, кількістю та конфігурацією амінокислот, що входять до його складу [47, 49, 61–64].

Ліпопептиди, синтезовані представниками роду *Bacillus*, поділяють на три родини циклічних сполук: сурфактин, ітурин та фенгіцин, які відрізняються за положенням, довжиною та ізомерами жирних кислот, що входять до їхнього складу [62]. Детальніше визначення структури цих сполук здійснюють з використанням двовимірного ядерного магнітного резонансу [65–67] та нейтронної рефлектометрії [68].

Циклічні ліпопептиди псевдомонад поділено на чотири головні групи: віскозин, амфізин, толаазин, сирингоміцин [13].

До відомих трьох родин ліпопептидів бацил не увійшли курстакин *Bacillus thuringiensis* [43, 69], малтацин *B. subtilis* [70], поліміксин *B. polymyxa* [71], бамілоцин А *B. amyloliquefaciens* [72] та нещодавно виділений ліпопептид ліхеніформін, синтезований *Bacillus licheniformis* MS3 [44].

Окрім того, було ідентифіковано низку нових ліпопептидів, продукованих псевдомонадами, наприклад, артрофактин *Pseudomonas* (раніше *Arthrobacter*) sp. MIS38 [73], путисольвін I та II *P. putida* [9, 74], орфамід *P. uorescens* Pf-5 [75, 76], псевдодесмін А та В штаму *Pseudomonas*, ізольованого зі шкіри саламандри [77], причому деякі з них не належать до жодної групи з представлених у класифікації. Також відкрито й лінійні ліпопептиди: сирингофактин *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 [78] та пептид 31 — лінійний похідний сирингопептиду *P. syringae* 31R1 [79].

До синтезу ліпопептидів здатні не тільки бацили і псевдомонади, а й представники інших родин. Так, у 1998 р. було описано нову ПАР пептидної природи, названу стрептофактином, продуцентом якої є *Streptomyces tendae* T 901/8с [80]. До синтезу високоактивних ПАР ліпопептидної природи здатні *Thiobacillus thiooxidans* (утворюють орнісінвмісні ліпіди), *Gluconobacter cerinus* IFO

3267 (цериліпін-, орнісін- та тауринвмісні ліпіди), *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 (лізінвмісні ліпіди) [81–83]. У роботі [84] описано ехінокандинподібні циклічні ліпопептиди з антифунгальними властивостями, синтезовані представниками груп *Coelomycetes* та *Hyphomycetes*. *Paenibacillus* sp. ПРАС-30 утворює циклічну сурфактинподібну сполуку, ефективну проти *Rhizoctonia solani* у концентрації 14 мкг/мл [45].

Етану біосинтезу. Більшість ліпопептидів утворюється нерибосомальним синтезом, проте деякі представники ітуринової родини можуть синтезуватись як полікетиди або жирні кислоти [85, 86].

У нерибосомальному синтезі беруть участь кілька взаємодіючих модулів, що поступово приєднують амінокислоти до основного ланцюга [61, 85–89]. Їх можна поділити на модулі ініціації та елонгації. Зазвичай модуль ініціації містить домен аденілювання (А), відповідальний за активацію амінокислот з утворенням аміноацил-АМФ (рис. 1, А), та тіолювання (Т), що приводить до утворення аміноацилтіоефіру (рис. 1, В) [13, 90]. Під час біосинтезу ліпопептидів зазвичай перший модуль ще містить домен конденсації (С), що каталізує N-ацилювання першої амінокислоти з приєднанням ліпідної частини молекули [91]. Модуль елонгації містить аналогічні домени (А, Т та С), проте домен конденсації (С) каталізує утворення пептидного зв'язку між двома активованими амінокислотами (2АА, рис. 1, С). Процес синтезу ліпопептидів завершує тіоестераза (Те), відповідальна або за циклізацію ліпопептиду [92–94], або репарацію Т-домену (регенерація фосфопантотеїнового кофактора) [95] з утворенням лінійної сполуки (рис. 1, D).

У нерибосомальному синтезі також бере участь домен епімеризації (Е), відповідальний за конфігурацію амінокислот (L- або D-форма) у ліпопептиді, причому у представників роду *Bacillus* такі домени відомі [96, 97], а у псевдомонад не виявлені. Припускають, що за зміну конфігурації амінокислот у представників роду *Pseudomonas* відповідає або екзорацемаза [73], або С-домен, що виконує подвійну функцію (конденсація та епімеризація) [98, 99].

Відомо, що одночасно синтезується кілька структурно схожих ліпопептидів [78], які можуть належати до різних родин [99]. Таке явище зумовлено субстратною неспецифічністю А-домену, що може активувати різні амінокислоти, та подвійною функцією

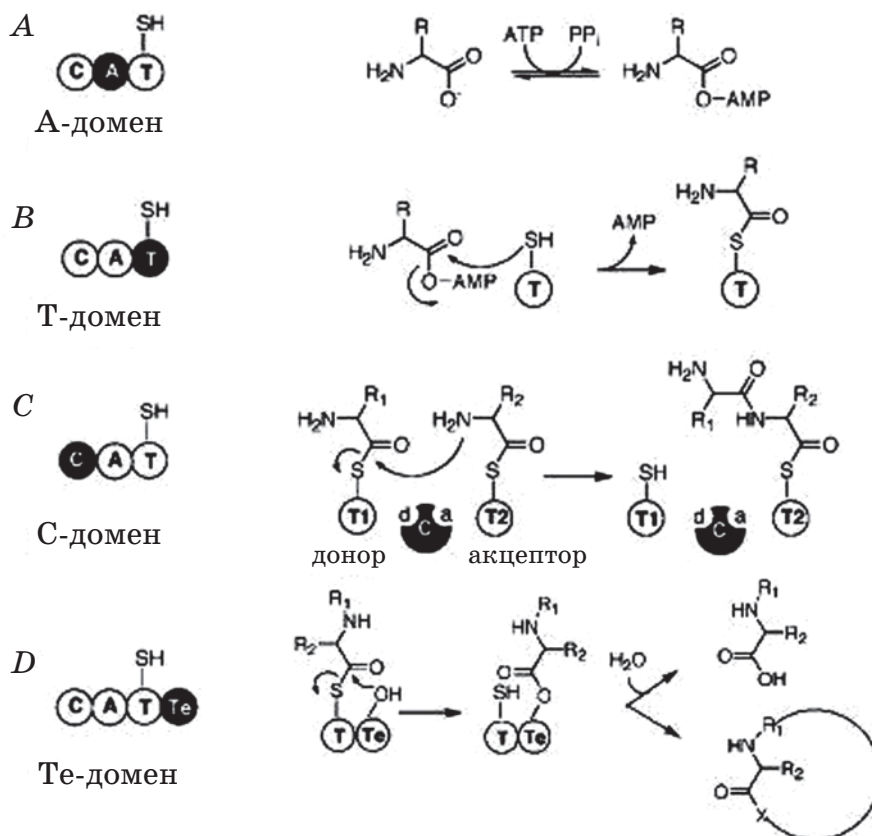


Рис. 1. Поетапна схема нерибосомального синтезу пептидів [90]:
T1 і T2 — T-домени сусідніх аміноацилтіоефірів; D та A — сайт донора й акцептора;
X — нітроген або оксиген

C-домени, внаслідок чого синтезуються ПАР з незначними структурними змінами у пептидній частині [13].

Так, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 синтезує шість ліпопептидів, названих сирингофактинами А–F, за синтез яких відповідають гени *syfR* (pspto_2828), *syfA* (pspto_2829), *syfB* (pspto_2830), *syfC* (pspto_2831) та *syfD* (pspto_2832) з різною кількістю модулів. Наявність C-домени з подвійною функцією в структурі гена *syfA* (pspto_2829), а також високоактивного A-домени в третьому модулі гена *syfB* (pspto_2830) приводить, зокрема, до заміни валіну на лейцин і синтезу не сирингофактину А, а сирингофактину В [78].

Докладніше біосинтез сурфактину, ліхенізіну, фенгіцину, баціломіцину, ітурину, мікосубтиліну, фузарицину (продуценти — представники роду *Bacillus*), а також сирингоміцину, сирингопептину, артрофактину, віскозіну, масетоліду, орфаміду, путисольвіну, сирингофактину, ентолізіну (синтезуються бактеріями роду *Pseudomonas*) описано в [40].

Регуляція біосинтезу у представників родів *Pseudomonas* та *Bacillus*. У представ-

ників роду *Pseudomonas* функціонує двокомпонентна регуляція біосинтезу ПАР GacA/GacS [100–102], проте маловивченими залишаються сигнальні молекули, що впливають на неї. Так, біосинтез сирингопептину активується специфічними фенольними β-глікозидами [103] (сигнальні молекули рослин, вражених фітопатогенними продуцентами даних ПАР), амфісіну — витяжками з насіння цукрового буряку [104], що містять не ідентифіковані сигнальні молекули.

Ще однією важливою регуляцією є кворумна, автоіндуктором якої у псевдомонад є N-ацил-гомосеринлактон (його синтез кодується генами *luxI*-типу). За накопичення сигнальних молекул до високого рівня вони зв'язуються з LuxR регуляторними протеїнами, що сприяє активації транскрипції генів-мішеней [105]. Така кворумна регуляція функціонує у *P. uorescens* 5064 та *P. putida* PCL1445 — продуцентів віскозіну та путисольвіну [106, 107].

Регулятори транскрипції LuxR-типу також відіграють важливу роль у синтезі сирингоміцину, сирингопептину, сирингофак-

тину, путисольвіну, віскозину та масетоліду [78, 103, 108–110]. Крім того, за утворення путисольвіну відповідають регуляторні гени *dnaK*, *dnaJ* та *grpE*, що впливають на синтез протеїнів теплового шоку [111]. У *P. fluorescens* SS101 біосинтез масетоліду регулюється сериною протеазою ClpP (є незалежною від GacS), що впливає на експресію генів *luxR(mA)*, які, у свою чергу, регулюють транскрипцію генів *massABC*, відповідальних за утворення ПАР. Цікавим є припущення, що на експресію цих генів також впливають амінокислоти глутамат та пролін, що виступають як сигнальні молекули, та інтермедіати циклу Кребса [112]. На рис. 2 наведено модель ClpP-опосередкованої регуляції біосинтезу масетоліду *P. fluorescens* SS101.

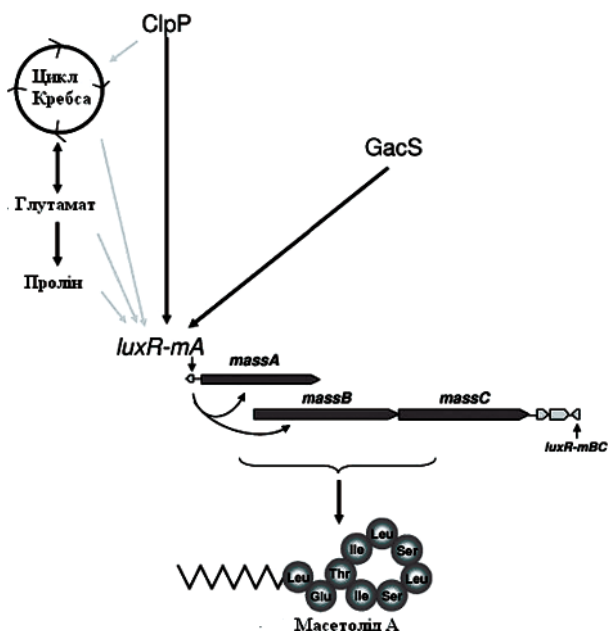


Рис. 2. Схематичне зображення регуляції синтезу масетоліду *P. fluorescens* SS101. Світлими стрілками позначено гіпотетичний вплив [112]

Важливими видами регуляції біосинтезу ліпопептидів представників роду *Bacillus* є як двокомпонентна, так і кворумна [113]. Наприклад, основними складовими двокомпонентної регуляції біосинтезу сурфактину є: ComA/ComP, феромон ComX та фосфатаза RapC. Під дією ComX мембранна гістидинкіназа ComP активує ComA, який, у свою чергу, у фосфорильованій формі зв'язується з промоторною ділянкою гена *srfA*, відповідального за утворення ліпопептиду. За дефосфорильовання ComA відповідає фос-

фатаза RapC, активність якої залежить від внутрішньоклітинної концентрації пентапептиду PhrC. Таким чином, низька концентрація PhrC призводить до низької активності RapC, унаслідок чого підвищується експресія *srf*-генів, тимчасом як висока концентрація PhrC репресує біосинтез сурфактину. Внутрішньоклітинний рівень PhrC також залежить від концентрації інших компонентів, зокрема пермеази SpoOK, яка транспортує PhrC через мембрану. На експресію *srf*-генів впливають і такі транскрипційні фактори, як DegU [114], або H_2O_2 -стресрегулювальні PerR [115] (позитивні регулятори) та деякі репресори [113, 116].

Окрім того, експресія генів, відповідальних за синтез сурфактину, залежить від густини клітин, що є характерним для кворумної регуляції. Одним із основних регуляторів синтезу мікосубтиліну (продуценти штами *B. subtilis*) є AbrB, проте у *abrB*-мутантного штаму ATCC 6633 індукція мікосубтилінового оперону тривала й далі, що свідчить про інші механізми регуляції [113].

Серед ліпопептидів ігуринової родини найбільш дослідженою є регуляція біосинтезу бамілоцину D у *B. amyloliquefaciens* FZB42 [117]. Встановлено, що активація бамілоцинового оперону (*bmy*) відбувається за взаємодії з протеїнами DegU та DegQ [117]. У свою чергу, експресія гена *degQ* контролюється ComA. На посттранскрипційному рівні на синтез бамілоцину діє мембранний протеїн YczE. За синтез пліпастаніну відповідає оперон *ppsABCDE*, на експресію якого впливає DegQ [118].

Вплив на функції продуцентів. ПАР впливають на такі функції власних продуцентів, як рухливість (плавання та роїння, деадгезія з поверхні), міжклітинна взаємодія (утворення біоплівки, кворумна взаємодія, аменсалізм та патогенність), клітинна диференціація, взаємодія із субстратом (пряма та опосередкована), антитоксична функція. Майже всі ці властивості притаманні й ліпопептидам [13].

Антагоністичні властивості. Ліпопептиди з антимікробною активністю у природних умовах надають перевагу їхнім продуцентам у конкурентній боротьбі з іншими мікроорганізмами. У лабораторних дослідах *in vitro* досліджували й антивірусну дію ПАР. Так, ще в 1977 р. було показано ефективність сурфактину проти вірусів з оболонкою [119]. Дещо пізніше почали вивчати антибактеріальні властивості по-

верхнево-активних ліпопептидів, причому ефективніше вони діяли проти грампозитивних бактерій. Корпептин, сиринопептин, толаазин виявляли антимікробну дію щодо *Bacillus megaterium* [5, 10, 15]; масетолід, віскозин, сиринопептин, сириногоміцин — *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-intercellulare* та *Mycobacterium smegmatis* [2, 4, 6]; сурфактин — *B. cereus* [8] та фітопатогенних бактерій *Xanthomonas campestris* і *P. syringae* [101]; путисольвін — *P. uorescens* та *P. aeruginosa* [9]. Ліпопептидам була притаманна антифунгальна активність. Наприклад, фенгіцин діяв на *Fusarium graminearum* [19], *Botrytis cinerea* [17] та *Podosphaera fusca* [14]; ітурин (у деяких випадках у суміші із сурфактином) — *Colletotrichum dematiatum* [7], *Penicillium roqueforti* [3], *Aspergillus avus* [120], *Rhizoctonia solani* [20], *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma polonicum*, *Ophiostoma ips* [18] та *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Clonostachys rosea* [11]; сурфактин — патоген рису *Magnaporthe grisea* [16] та *R. solani* [12]. У роботі [41] показано, що штам *B. subtilis* Bs-M49, який мав три міссенс-мутації у генах *comA*, а також штам MC1 з нокаутованим геном *comA*, були, на відміну від дикого штаму, не здатними до синтезу сурфактину й не пригнічували ріст *R. solani*, Bs-916. Інтеграція *comA* у хромосому штаму Bs-M49 (M49C3) сприяла відновленню його біологічної активності. Ізольовані з басейну річки Амазонки штами *Bacillus* синтезували суміш ліпопептидів (сурфактин, ітурин А, фенгіцин, баціломіцин), що пригнічували фітопатогенні гриби *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. та *Bipolaris sorokiniana* [39]. У роботі [38] описано механізм дії сурфактину, фенгіцину та ітуруну *B. subtilis* QST713 на клітини грибів. Встановлено, що, на відміну від типових синтетичних ПАР (октилглюкозид, додецилсульфат натрію тощо), мікробні не призводили до загального розупорядкування цитоплазматичної мембрани, а діяли локально через спонтанну сегрегацію ліпідів і/або спричинювали дефекти упакування її елементів.

ПАР ліпопептидої природи також були ефективними проти деяких видів ооміцетів *Rhizium* та *Phytophthora* і призводили до лізису зооспор [75, 100, 121–126] або пригнічували міцеліальний ріст [125].

Захист від хижаків. Відомо, що значний вплив на динаміку росту, поширення та еволюцію бактеріальних угруповань справля-

ють найпростіші [127]. З метою самозахисту бактерії розвинули низку механізмів, які загалом можна поділити на дві групи: ті, що діють до та після поглинання бактерії хижакком [128]. До перших можна віднести зміни у морфології клітин, поверхневі властивості та рухливість, до другої — синтез токсичних метаболітів [129, 130]. Так, *Serratia marcescens* та *Bacillus* sp. продукували сераветин W2 і сурфактин, за допомогою яких захищалися від нематої *Caenorhabditis elegans* [131], а *P. uorescens* — масетолід та віскозин, що спричинювали лізис амеби *Naegleria americana* [132].

Рухливість. Відомо, що ПАР відіграють важливу роль у такому виді руху, як роїння, впливаючи на утворення диференційованих клітин більшого розміру із підвищеним вмістом флагеліну. Клітини мутантних штамів, не здатних до синтезу ліпопептидів, були нерухливими й не формували так звані потоки Марангоні за умов росту на напіврідкому середовищі (рис. 3) [78, 133]. Додавання мікробних ПАР у середовище приводило до відновлення їх руху [121, 134–136].

Окрім того, ПАР належала вирішальна роль у колонізації мікроорганізмами рослин [1, 137, 138].

Утворення біоплівки. Суттєвою є і роль ліпопептидів у прикріпленні клітин до поверхні та у процесах формування біоплівки. Так, продуцент артрофактину *Pseudomonas* sp. MIS38 формував біоплівку на поліпропіленовій поверхні, тимчасом як дефектний за артрофактином мутант був практично не здатний до цього [73].

Аналогічні результати було встановлено для штамів *P. fluorescens* SBW25 та *P. fluorescens* SS101, здатних до синтезу віскозину та масетоліду [99, 121], а також *B. subtilis* A1/3 — продуцента сурфактину [140]. На рис. 4 показано вплив сурфактину, фенгіцину й ітуруну дикого штаму *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, а також мутантів AK3, CH1 та CH2 на формування біоплівки.

Припускають, що ПАР змінюють гідрофільність-гідрофобність або заряд поверхні клітини, сприяючи тим самим формуванню біоплівки [99]. Сурфактин може слугувати сигнальною молекулою і спричинювати витік калію, який у свою чергу активує гістидинкіназу KinC, що впливає на експресію генів *psA-O* і *yqxM-sipW-tasA*, відповідальних за формування матриксу біоплівки [141].

ПАР також притаманні й антиадгезивні властивості. Так, сурфактин знижував

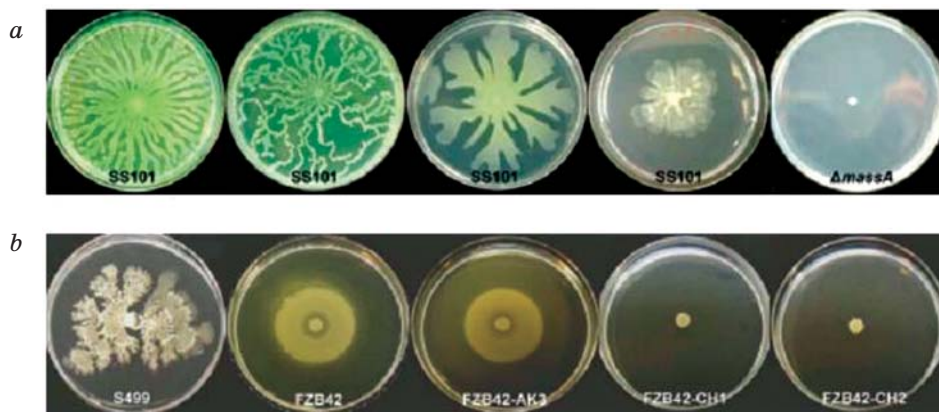


Рис. 3. Роль ліпопептидів у рухливості представників родів *Pseudomonas* та *Bacillus*:
 а — дикий штам *P. fluorescens* SS101, що синтезує ліпопептиди й утворює потоки Марангоні, та нерухливий ліпопептиддефіцитний мутантний штам SS101 (крайній справа);
 б — дикі штами *Bacillus* S499 та FZB42, які продукують сурфактин, ітурин і фенгіцин, мутанти АК3 (сурф⁺, фенг⁻, ітур⁻), CH1 (сурф⁻, фенг⁺, ітур⁻) та CH2 (сурф⁻, фенг⁻, ітур⁺) [139]

адгезію *Listeria monocytogenes* та *Enterobacter sakazakii* на пропіленовій і сталевій поверхнях [142], ліпопептид *B. subtilis* інгібував формування біоплівки *Salmonella enterica* sv. *typhimurium* [143] і *Streptomyces coelicolor* [144], путисольвін, синтезований *P. putida*, — *P. aeruginosa* PA14 та *P. fluorescens* WCS365 [9], псевдофактин II *P. fluorescens* BD5 — різних штамів *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans* [145], а віскозин і масетолід *A. P. fluorescens* порушував процес утворення мікроколоній *P. aeruginosa* PAO1 [13].

Роль у патогенезі та індукції резистентності рослин. Ліпопептиди можуть відповідати за інфікування рослин мікроорганізмами-продуцентами, а також стимулювати їхні захисні функції. Наприклад, синтез сирингоміцину та сирингопептину підвищував вірулентність *P. syringae* pv. *syringae* [146], а віскозин відповідав за колонізацію *P. fluorescens* 5064 тканин броколі [147]. Проте в разі оброблення коренів томату очищеним масетолідом *A. P. fluorescens* листки рослини виявляли підвищену стійкість до інфекцій, збудником яких є *P. infestans* [138]. Аналогічно очищені фенгіцин та сурфактин істотно підвищували захист від патогену *Botrytis cinerea* у листках гороху й томату [148]. З додаванням ліпопептиду *Bacillus* sp. у томатів підвищувалась активність двох ключових ензимів оксиліпінового шляху [148], що зумовлювало синтез широкого спектра вторинних метаболітів [149].

Дія на клітини пухлин. Для нового циклічного ліпопептиду *B. subtilis natto* T-2

було описано протипухлинну активність проти клітин лейкозу лінії K562. Запропонований механізм дії полягає у накопиченні клітиною Ca²⁺ та індукції апоптозу [150]. Інше незалежне дослідження показало антипроліферативну дію сурфактину на злоякісні клітини кишечника LoVo [151].

Зв'язування металів та деструкція ксеобіотиків. Наприкінці XX — на початку XXI ст. з'явилися повідомлення про здатність ліпопептидних ПАР зв'язувати метали. Так, ліхенізин і сурфактин хелатували катіони Ca²⁺ [152], ітурин та граміцинин S — Na⁺, Rb⁺ та K⁺ [153]. Завдяки здатності утворювати комплекси з металами ПАР можуть бути використані для біоремедіації ґрунтів [154]. Окрім того, ПАР відіграють важливу роль у розкладанні нерозчинних ароматичних сполук унаслідок переведення їх у доступнішу для мікроорганізмів-деструкторів форму [155]. Вважають, що мікроорганізми за рахунок синтезу ПАР захищають власні клітини від токсичного впливу металів [13] або емульгують недоступні субстрати для того, щоб використати їх як джерело вуглецю або азоту.



Рис. 4. Роль ліпопептидів представників роду *Bacillus* у формуванні біоплівок [13]

ПАР, синтезовані молочнокислими бактеріями

Література щодо синтезу ПАР молочнокислими бактеріями є нечисленною. Перші роботи з'явилися наприкінці ХХ — на початку ХХІ ст. і були присвячені здатності ПАР молочнокислих бактерій знижувати адгезію патогенних мікроорганізмів на поверхні скла [156], силікону [157], хірургічних імплантатів [158] та голосових протезів [159, 160]. У 2004–2006 рр. уперше описано пробіотичні штами *Lactococcus lactis* 53 та *Streptococcus thermophilus* А, які є продуцентами ПАР з антимікробними властивостями [160–162].

Незважаючи на те, що ПАР пробіотичних бактерій є менш ефективними і синтезуються в значно менших кількостях (усього 20–100 мг/л), ніж відомі рамноліпіди *P. aeruginosa*, софороліпіди *Candida*, сурфактин та ітурин *B. subtilis*, саме вони можуть бути використані у медицині через непатогенність продуцентів [26, 29]. Основним фактором, що стримує комерціалізацію і використання ПАР молочнокислих бактерій у фармакології, є брак знань щодо їхніх структурних та молекулярних характеристик [29].

В останні роки з'являються повідомлення про виділення та ідентифікацію нових продуцентів ПАР серед пробіотичних бактерій. Дослідження присвячено визначенню хімічного складу синтезованих ПАР, їхніх характеристик, а також антимікробних та антиадгезивних властивостей. Так, у роботі [26] було описано штаму *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* А20, виділений на підприємстві молочної промисловості, здатний до синтезу ПАР (хімічний склад не встановлено), що знижували поверхневий натяг до 41,8 мН/м, критична концентрація міцелоутворення (ККМ) становила 2,5 мг/мл. Крім того, ПАР штаму А20 були стійкими в широкому діапазоні рН (від 6 до 10, оптимум 7) і не втрачали своїх властивостей під час нагрівання до 60 °С упродовж 120 год. Встановлено, що неочищені ПАР у концентрації 25 мг/мл на 83,5–100% пригнічували ріст *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae* та *S. pyogenes*, а також виявляли антиадгезивну активність щодо всіх досліджуваних тест-культур.

Найефективніше ПАР лактобацил знижували адгезію *S. aureus* (на 72,0%), *S. epidermidis* (62,1%) та *S. agalactiae* (60,0%). Більш детально ці властивості описано в

роботі [25]. Показано, що повне пригнічення росту непатогенних видів *Lactobacillus* (*L. casei* 36, *L. casei* 72, *L. reuteri* 104R та *L. reuteri* ML1), а також мешканців ротової порожнини *S. oralis* J22 та *S. sanguis* 12 відбувалося за концентрації ПАР *L. paracasei* ssp. *paracasei* А20 25–50 мг/мл. Менш ефективно препарати діяли на гриби. Так, фунгіцидну дію щодо *C. albicans* спостерігали лише за максимально досліджуваної концентрації (50 мг/мл), а ріст *Malassezia* sp., *Trichophyton mentagrophytes* та *Trichophyton rubrum* пригнічувався лише на 71,6–86,1%. Автори зазначають, що це повідомлення є першим стосовно синтезу лактобактеріями ПАР з таким широким спектром антибактеріальної активності. Щодо антиадгезивних властивостей, то найефективніше препарати діяли на штами *L. reuteri* (77,6–78,8% неадгезованих клітин), *L. casei* (56,5–63,8%) та *S. sanguis* 12 (72,9%). Менш ефективно знижували адгезію *S. mutans* HG985 (31,4%) та грибів (15,3–38,9%). Крім того, клітини *L. paracasei* ssp. *paracasei* А20 були здатні до автоагрегації, тобто до утворення багатоклітинних скупчень (51% через 2 год експозиції), що є важливою властивістю пробіотичних мікроорганізмів.

Важливими є дослідження, присвячені вивченню одночасного впливу рН, температури і концентрації солей на поверхнево-активні властивості метаболітів, синтезованих *L. pentosus* [24]. Встановлено, що в діапазоні рН 3–5,5, за низької концентрації солей та температури ці зовнішні чинники діяли синергічно, і ПАР ефективніше знижували поверхневий натяг. В іншій роботі показано можливість використання ПАР *L. pentosus* для очищення ґрунту від октану (70 г/кг ґрунту) [27]. Встановлено, що на 30-ту добу в ґрунті деградувало 76% октану, тимчасом як у контрольному варіанті (ґрунт, не оброблений ПАР) розклалося лише 24% ксенобіотика.

Перспективним є застосування ПАР пробіотичних штамів для покриття абіотичних матеріалів, використовуваних у медицині. Так, у роботі [28] методами інфрачервоної спектроскопії (ATR-FTIR), рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (XPS), атомно-силової мікроскопії (AFM), а також вимірюванням кута змочування встановлено здатність ПАР *L. lactis*, *L. paracasei*, *S. thermophilus* А та *S. thermophilus* В утворювати суцільний шар на поверхні полідиметилсилоксану. Модифікований матеріал було визнано нетоксичним та негемолітичним.

Морські мікроорганізми як продуценти ПАР

Морські мікроорганізми як потенційні продуценти практично важливих метаболітів почали інтенсивно досліджувати у 80–90-х рр. ХХ ст. [162–164]. Тоді ж з'являються перші огляди, присвячені синтезу ними ПАР [165–167], що доповнюються у ХХІ ст. [30, 168–170]. Унікальність морських продуцентів полягає в тому, що в ході еволюції вони набули здатності до синтезу нових метаболітів (антибіотики, ензими, вітаміни, ПАР, біоємальгатори тощо), які не продукуються іншими мікроорганізмами [32, 37]. У літературі останнього десятиліття описано представників різних таксономічних груп — продуцентів поверхнево-активних гліко-, аміно-, фосфоліпідів, жирних кислот, а також ПАР з не ідентифікованою досі хімічною структурою [31, 33–37, 168, 171–179]. Так, у [175] описано штам нафтоокиснювальних бактерій *Rhodococcus erythropolis* 3С-9, виділений з приморських ґрунтів острова Сямінь. Кожен з морських штамів *Bacillus* sp. S3, *Bacillus pumilus* S8, *Bacillus licheniformis* D1 та *Serratia marcescens* V1, виділених із поверхні зелених мідій *Perna viridis* і коралів *Symphyllia* sp., знайдених у прибережних районах Ковалам та Мандапам (Таміл Наду, Індія), синтезував ПАР за попарного сумісного культивування з *P. aeruginosa* PA, *B. pumilus* BP, *C. albicans* CA або *Yarrowia lipolytica* YL, які виступали індукторами синтезу (для кожного продуцента — один-два індуктори) [31–35].

Як відомо, найактивнішими продуцентами ліпопептидів є представники роду *Bacillus*. Так, штам *B. circulans*, ізольований з Андаманських і Нікобарських островів (Індія), синтезував поверхнево-активні ліпопептиди [171], антимікробна активність яких залежала від джерела вуглецю в середовищі культивування. ПАР з найефективнішою антимікробною дією синтезувалися у разі заміни гліцеролу, крохмалю або сахарози на глюкозу [173]. Крім того, *B. circulans* був здатен до деструкції поліароматичних вуглеводнів, таких як антрацен [172].

У роботі [36] описано інший продуцент ліпопептидів — *Bacillus velezensis* H3, ізольований з морського мулу Хуанхайського моря та Бохайської затоки (Далянь, Китай), і встановлено здатність цього штаму до синтезу сурфактиноподібних сполук, які знижували поверхневий натяг з 71,8 до 24,8 мН/м. Найвищу емульгуювальну активність ПАР спо-

стерігали за рН 6,0, 2% NaCl, 28 °С. Культивування штаму здійснювали на середовищі з крохмалем (2%) та сульфатом амонію (1%) як джерелами вуглецю та азоту. Методом дифузії в агар встановлено, що ліпопептидам штаму H3 в концентрації 100 мкг/мл притаманна антимікробна активність щодо *S. aureus*, *Mycobacterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* та *C. albicans* (зони затримки росту 10–14 мм).

Для виділеного з морського середовища порту Тутікорин (Індія) штаму *Azotobacter chroococcum* встановлено здатність до синтезу ПАР ліпопептидної природи за умов росту на неочищеній нафті, використаній моторній оливі та олії земляного горіха [177]. Показано, що максимальної концентрації цільового продукту (до 2,97 г/л) досягнуто на 132-гу год культивування за температури 38 °С, рН 8,0, 30‰ солоності та 2% (масова частка) субстрату. Масштабування процесу на ферментаційне обладнання (3-літровий ферментер) дало змогу підвищити синтез ПАР до 4,6 г/л [179].

Представники роду *Myroides* (*M. SM1*, *M. odoratus* JCM7458 та *M. odoramitimus* JCM7460), виділені з морської води, як продуценти поверхнево-активних фосфоліпідів та жирних кислот описано в роботах [168, 174–178]. За хімічною природою синтезовані цими мікроорганізмами ПАР є холиновими та дезоксихолиновими кислотами, з'єднаними із гліцином. Узагальнюючу інформацію про синтез ПАР морськими мікроорганізмами наведено в таблиці.

Таким чином, великий інтерес до ПАР ліпопептидної природи зумовлений можливістю використання їх як ефективних антимікробних агентів.

У розглянутій літературі велику увагу приділено хімічній структурі цих ліпопептидних ПАР та їхнім продуцентам, етапам і регуляції біосинтезу, а також фізіологічній ролі. Найбільш вивченими є ліпопептиди представників роду *Bacillus* (сурфактин, граміцидин S, поліміксин, ітурин, фенгіцин тощо) та *Pseudomonas* (віскозин, амфізин, толаазин, сириноміцин та ін.). У нерибосомальному синтезі ліпопептидів беруть участь фактори ініціації та елонгації, а регуляція є двокомпонентною GacA/GacS (під *Pseudomonas*) і ComA/ComP (під *Bacillus*), а також кворумною.

Поверхнево-активні речовини, синтезовані морськими мікроорганізмами

Клас ПАР	Продуцент	Хімічна структура	Властивості ПАР	Література
Ліпопептиди	<i>B. circulans</i>	Новий тип ліпопептидів (структуру не ідентифіковано)	Виражена антимікробна дія, відсутність гемолітичної активності	[171]
	<i>B. velezensis</i> H3	nC14-сурфактин та антеізо-C15-сурфактин	Здатність знижувати поверхневий натяг, емульгувальна активність, виражена антимікробна дія	[36]
	<i>A. chroococcum</i>	Ліпіди та протеїни у співвідношенні 31:69	Емульгатор моторної оливи, неочищеної нафти, дизелю, гасу, нафталену, антрацену, ксилену	[177, 179]
Фосфоліпіди та жирні кислоти	<i>Myroides</i> SM1, <i>M. odoratus</i> JCM7458 та <i>M. odoramitimus</i> JCM7460	Холінові та дезоксихолінові кислоти, з'єднані з гліцином	Здатність до зниження поверхневого натягу	[174]
Гліколіпопептиди	<i>C. kutscheri</i>	Вуглеводи (40%), ліпіди (27%) та протеїни (29%)	Емульгатор різних вуглеводнів	[178]

Ліпопептидам притаманна антибактеріальна, антифунгальна, антивірусна, антиадгезивна активність, вони беруть участь у русі клітин (рух роїнням) та формуванні біоплівки, діють на клітини пухлин, спричинюючи апоптоз і пригнічуючи проліферацію, зв'язують метали у нерозчинні комплекси й беруть участь у деструкції ароматичних сполук мікроорганізмами.

Це свідчить про актуальність пошуку нових нетрадиційних продуцентів ПАР. Такі пробіотичні непатогенні бактерії можуть бути використані як ефективні антиадгезивні та антимікробні агенти, а морські продуценти здатні до синтезу унікальних метаболітів, що не продукуються іншими мікроорганізмами.

REFERENCES

1. Bais H. P., Fall R., Vivanco J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant. Physiol.* 2004, 134(1), 307–319.
2. Buber E., Stindl A., Acan N. L., Kocagoz T., Zocher R. Antimycobacterial activity of lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B359. *Nat. Prod. Lett.* 2002, 16(6), 419–423.
3. Chitarra G. S., Breeuwer P., Nout M. J., van Aelst A. C., Rombouts F. M., Abee T. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 94(2), 159–166.
4. El Sayed K. A., Bartyzel P., Shen X. Y., Perry T. L., Zjawiony J. K., Hamann M. T. Marine natural products as antituberculosis agents. *Tetrahedron.* 2000, 56(7), 949–953.
5. Emanuele M. C., Scaloni A., Lavermicocca P., Jacobellis N. S., Camoni L., Giorgio D., Pucci P., Paci M., Segre A., Ballio A. Corpeptins, new bioactive lipodepsipeptides from cultures of *Pseudomonas corrugata*. *FEBS Lett.* 1998, 433(3), 317–320.
6. Gerard J., Lloyd R., Barsby T., Paul H., Kelly M. T., Andersen R. J. Massetolides A–H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. *J. Nat. Prod.* 1997, 60(3), 223–229.
7. Hiradate S., Yoshida S., Sugie H., Yada H., Fujii Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry.* 2002, 61(6), 693–698.
8. Huang X., Lu Z., Bie X., Zhao H., Yang S. Optimization of inactivation of endospores of *Bacillus cereus* by antimicrobial lipopeptides from *Bacillus subtilis* fmbj strains using a response surface method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 74(2), 454–461.
9. Kuiper I., Lagendijk E. L., Pickford R., Derrick J. P., Lamers G. E., Thomas-Oates J. E., Lugtenberg B. J., Bloemberg G. V. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol. Microbiol.* 2004, 51(1), 97–113.

10. Lavermicocca P., Iacobellis N. S., Simmaco M., Graniti A. Biological properties and spectrum of activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. *Physiol. Mol. Plant. P.* 1997, 50(2), 129–140.
11. Lei Li, Minghe Mo, Qing Qu, Hong Luo, Kegin Zhang. Compounds inhibitory to nematophagous fungi produced by *Bacillus* sp. strain H6 isolated from fungistatic soil. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2007, 117(4), 329–340.
12. Nielsen T. H., Thrane C., Christophersen C., Anthoni U., Sorensen J. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin — a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 89(6), 992–1001.
13. Raaijmakers J. M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010, 34(6), 1037–1062.
14. Romero D., de Vicente A., Rakotoaly R. H., Dufour S. E., Veening J. W., Arrebola E., Cazorla F. M., Kuipers O. P., Paquot M., Pérez-García A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, 20(4), 430–440.
15. Soler-Rivas C., Arpin N., Olivier J. M., Wichers H. J. WLIP, a lipodepsipeptide of *Pseudomonas* 'reactans', as inhibitor of the symptoms of the brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 86(4), 635–641.
16. Tendulkar S. R., Saikumari Y. K., Patel V., Raghotama S., Munshi T. K., Balaram P., Chattoo B. B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 103(6), 2331–2339.
17. Tour Y., Ongena M., Jacques P., Guiro A., Thonart P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 96(5), 1151–1160.
18. Velmurugan N., Choi M. S., Han S. S., Lee Y. S. Evaluation of antagonistic activities of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* against wood-staining fungi: *in vitro* and *in vivo* experiments. *J. Microbiol.* 2009, 47(4), 385–392.
19. Wang J., Liu J., Chen H., Yao J. Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 76(4), 889–894.
20. Yu G. Y., Sinclair J. B., Hartman G. L., Bertagnolli B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil. Biol. Biochem.* 2002, 34(7), 955–963.
21. Reddy M. S., Naresh B., Leela T., Prashanthi M., Madhusudhan N. C., Dhanasri G., Devi P. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. *Bioresour. Technol.* 2010, 101(2), 7980–7839.
22. Saimmai A., Sobhon V., Maneerat S. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. *Ann. Microbiol.* 2012, 62(1), 391–402.
23. Shavandi M., Mohebbali G., Haddadi A., Shakarami H., Nuhi A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2011, 82(2), 477–482.
24. Bello X. V., Devesa-Rey R., Cruz J. M., Moldes A. B. Study of the synergistic effects of salinity, pH, and temperature on the surface-active properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus pentosus*. *J. Agric. Food. Chem.* 2012, 60(5), 1258–1265.
25. Gudina E. J., Rocha V., Teixeira J. A., Rodrigues L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010, 50(4), 419–424.
26. Gudina E. J., Teixeira J. A., Rodrigues L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2010, 76(1), 298–304.
27. Moldes A. B., Paradelo R., Rubinos D., Devesa-Rey R., Cruz J. M., Barral M. T. Ex situ treatment of hydrocarbon-contaminated soil using biosurfactants from *Lactobacillus pentosus*. *J. Agric. Food. Chem.* 2011, 59(17), 9433–9437.
28. Pinto S., Alves P., Santos A. C., Matos C. M., Oliverios B., Conçalves S., Gudina E., Rodrigues L. R., Teixeira J. A., Gil M. N. On with biosurfactants isolated from probiotic strains. *J. Biomed. Mater. Res.* 2011, 98(4), 535–543.
29. Saravanakumari P., Mani K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. *Bioresour. Technol.* 2010, 101(22), 8851–8854.
30. Damare S., Singh P., Raghukumar S. Biotechnology of marine fungi. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 2012, V. 53, P. 277–297. doi: 10.1007/978-3-642-23342-5_14.
31. Dusane D. H., Matkar P., Venugopalan V. P., Kumar A. R., Zinjarde S. S. Cross-species induction of antimicrobial compounds, biosurfactants and quorum-sensing inhibitors in tropical marine epibiotic bacteria by pathogens and biofouling microorganisms. *Curr. Microbiol.* 2011, 62(3), 974–980.

32. Kennedy J., O'Leary N. D., Kiran G. S., Morrissey J. P., O'Gara F., Selvin J., Dobson A. D. l. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J. Appl. Microbiol.* 2011, 111(4), 787–799.
33. Khopade A., Ren B., Liu X. Y., Khopade A., Ren B., Liu X. Y., Mahadik K., Zhang L., Kokare C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *J. Colloid. Interface. Sci.* 2012, 367(1), 311–318.
34. Kiran G. S., Thomas T. A., Selvin J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2010, 78(1), 8–16.
35. Konishi M., Fukuoka T., Nagahama T., Morita T., Imura T., Kitamoto D., Hatada Y. Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena* soyoeae (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. *J. Biosci. Bioeng.* 1998, 110(2), 169–175.
36. Liu X., Ren B., Chen M., Wang H., Kokare C. R., Zhon X., Wang J., Dai H., Song F., Lui M., Wang J., Wang S., Zhang L. Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 87(5), 1881–1893.
37. Satpute S. K., Banat I. M., Dhakephalkar P. K., Banpurkar A. G., Chopade B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 2010, 28(4), 436–450.
38. Nazari M., Kurdi M., Heerklotz H. Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order. *Biophys. J.* 2012, 102(3), 498–506.
39. Velho R. V., Medina L. F., Segalin J., Brandelli A. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia. Microbiol. (Praha)*. 2011, 56(4), 297–303.
40. Roongsawang N., Washio K., Morikawa M. Diversity of nonribosomal Peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 12(1), 141–172.
41. Wang X., Luo C., Liu Y., Zhang R., Chen Z. Three non-aspartate amino acid mutations in the ComA response regulator receiver motif severely decrease surfactin production, competence development and spore formation in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 20(2), 301–310.
42. Youssef N. H., Wofford N., McInerney M. J. Importance of the long-chain fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450 enzyme ybdt for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* strain OKB105. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12(3), 1767–1786.
43. Bechet M., Caradec T., Hussein W., Abderahmani A., Chollet M., Leclère V., Dubois T., Lereclus D., Pupin M., Jacques P. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 95(3), 593–600.
44. Biria D., Maghsoudi E., Roostaazad R., Dadafarin H., Lotfi A., Amoozegar S., M. Puri cation and characterization of a novel biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* MS3. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 26(5), P. 871–878.
45. Canova S. P., Petta T., Reyes L. F., Zucchi T. D., Moraes A. B., Melo I. S. Characterization of lipopeptides from *Paenibacillus* sp. (IIRAC30) suppressing *Rhizoctonia solani*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 26(12), 2241–2247.
46. Singh B. R., Dwivedi S., Al-Khedhairi A. A., Musarrat J. Synthesis of stable cadmium sulfide nanoparticles using surfactin produced by *Bacillus amyloliquifaciens* strain KSU-109. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* 2011, 85(2), 207–213.
47. Liu W., Wang X., Wu L., Chen M., Tu C., Luo Y., Christie P. Isolation, identification and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* BZ-6, a bacterial isolate for enhancing oil recovery from oily sludge. *Chemosphere.* 2012, 87(10), 1105–1110.
48. Sousa M., Melo V. M., Rodrigues S., Sant'ana H., B., Gonçalves L. R. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2012, 35(6), 897–906.
49. Sriram M. I., Kalishwaralal K., Deepak V., Gracerosep R., Srisakthi K., Gurunathan S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2011, 85(2), 174–181.
50. Yao D., Ji Z., Wang C., Qi G., Zhang L., Ma X., Chen S. Co-producing iturin A and poly- γ -glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3–10. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 28(3), 985–991.
51. Zhao Y., Yang S. Z., Mu B. Z. Quantitative analyses of the isoforms of surfactin produced by *Bacillus subtilis* HSO 121 using GC-MS. *Anal. Sci.* 2012, 28(8), 789–793.
52. Saimmai A., Sobhon V., Maneerat S. Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, 165(1), 315–335.

53. Shaligram N. S., Singhal R. S. Surfactin — a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food. Technol. Biotechnol.* 2010, 48(2), 119–134.
54. Hsieh F. C., Li M. C., Lin T. C., Kao S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Curr. Microbiol.* 2004, 49(3), 186–191.
55. Ponte Rocha M. V., Gomes Barreto R. V., Melo V. M., Barros Gonçalves L. R. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009, 155(1–3), 366–378.
56. Puntus I. F., Sakharovsky V. G., Filonov A. E., Boronin A. M. Surface activity and metabolism of hydrocarbon-degrading microorganisms growing on hexadecane and naphthalene. *Proc. Biochem. Rev.* 2005, 40(8), 2643–2648.
57. Roongsawang N., Thaniyavarn J., Thaniyavarn S., Kameyama T., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles.* 2002, 6(6), 499–506.
58. Kakinuma A., Oachida A., Shima T., Sugino H., Isano M., Tamura G., Arima K. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. *Agric. Biol. Chem.* 1969, 33(11), 1669–1672.
59. Katz E., Demain A. L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 1977, 41(2), 449–474.
60. Neu T. R., Poralla K. Emulsifying agent from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990, 32(5), 521–525.
61. Gross H., Loper J. E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* sp. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26(11), 1408–1446.
62. Ongena M., Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 2008, 16(3), 115–125.
63. Raaijmakers J. M., de Bruijn I., de Kock M. J. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* sp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2006, 19(7), 699–710.
64. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 2005, 56(4), 845–857.
65. Tsan P., Volpon L., Besson F., Lancelin J. M. Structure and dynamics of surfactin studied by NMR in micellar media. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(7), 1968–1977.
66. Volpon L., Besson F., Lancelin J. M. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A(2). *FEBS Lett.* 2000, 485(1), 76–80.
67. Volpon L., Tsan P., Majer Z., Vass E., Hollósi M., Noguera V., Lancelin J. M., Besson F. NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin Lc reveals the strategic role of L-Asn1 in the natural iturinic antibiotics. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2007, 67(5), 1374–1381.
68. Shen H. H., Thomas R. K., Chen C. Y., Darton R. C., Baker S. C., Penfold J. Aggregation of the naturally occurring lipopeptide, surfactin, at interfaces and in solution: an unusual type of surfactant? *Langmuir.* 2009, 25(7), 4211–4218.
69. Hathout Y., Ho Y. P., Ryzhov V., Demirev P., Fenselau C. Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *J. Nat. Prod.* 2000, 63(11), 1492–1496.
70. Hagelin G., Indrevoll B., Hoeg-Jensen T. Use of synthetic analogues in confirmation of structure of the peptide antibiotics maltacines. *Int. J. Mass. Spectrom.* 2007, 268(2–3), 254–264.
71. Storm D. R., Rosenthal K. S., Swanson P. E. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.* 1977, V. 46, P. 723–763.
72. Lee S. C., Kim S. H., Park I. H., Chung S. Y., Choi Y. L. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Arch. Microbiol.* 2007, 188(4), 307–312.
73. Roongsawang N., Hase K., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem. Biol.* 2003, 10(9), 869–880.
74. Kruijt M., Tran H., Raaijmakers J. M. Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *J. Appl. Microbiol.* 2009, 107(2), 546–556.
75. Gross H., Stockwell V. O., Henkels M. D., Nowak-Thompson B., Loper J. E., Gerwick W. H. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem. Biol.* 2007, 14(1), P. 53–63.
76. Paulsen I. T., Press C. M., Ravel J., Kobayashi D. Y., Myers G. S., Mavrodi D. V., DeBoy R. T., Seshadri R., Ren Q., Madupu R., Dodson R. J., Durkin A. S., Brinkac L. M., Daugherty S. C., Sullivan S. A., Rosovitz M. J., Gwinn M. L., Zhou L., Schneider D. J., Cartinhour S. W., Nelson W. C., Weidman J., Watkins K., Tran K., Khouri H., Pierson E. A., Pierson L. S., Thomashow L. S., Loper J. E. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 2005, 23(7), 873–878.
77. Sinnaeve D., Michaux C., Van Hemel J., Jan Vandenkerckhove, Eric Peys E., Frans A. M.

- Borremans, Benedikt Sas, Johan Wouters, Martins José C. Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* bacteria. *Tetrahedron*. 2009, 65(21), 4173–4181.
78. Berti A. D., Greve N. J., Christensen Q. H., Thomas M. G. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *J. Bacteriol.* 2007, 189(17), 6312–6323.
79. Fiore A., Mannina L., Sobolev A. P., Salzano A. M., Scaloni A., Grgurina I., Fullone M. R., Gallo M., Swasey C., Fogliano V., Takemoto J. Y. Bioactive lipopeptides of ice-nucleating snow bacterium *Pseudomonas syringae* strain 31R1. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008, 286(2), 158–165.
80. Richter M., Willey J. M., Sümuth R., Günther Jung, Hans-Peter Fiedler Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 163(2), 165–171.
81. Knoche H. W., Shively J. M. The structure of an ornithine-containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Biol. Chem.* 1972, 247(1), 170–178.
82. Tahara Y., Yamada Y., Kondo K. A new lysin containing lipid isolated from *Agrobacterium tumefaciens*. *Agric. Biol. Chem.* 1976, 40(7), 1449–1450.
83. Tahara Y., Kameda M., Yamada Y., Kondo K. A new lipid; the ornithine and taurine-containing ‘cerilipin’. *Agric. Biol. Chem.* 1976, 40(1), 243–244.
84. Hino M., Fujie A., Iwamoto T., Hori Y., Hashimoto M., Tsurumi Y., Sakamoto K., Takase S., Hashimoto S. Chemical diversity in lipopeptide antifungal antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 27(3), 157–162.
85. Hansen D. B., Bumpus S. B., Aron Z. D., Kelleher N. L., Walsh C. T. The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129(20), 6366–6367.
86. Tsuge K., Akiyama T., Shoda M. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol.* 2001, 183(21), 6265–6273.
87. Finking R., Marahiel M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides1. *Annu. Rev. Microbiol.* 2004, V. 58, 453–488.
88. Fischbach M. A., Walsh C. T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* 2006, 106(8), 3468–3496.
89. Marahiel M. A., Essen L. O. Nonribosomal peptide synthetases: mechanistic and structural aspects of essential domains. *Meth. Enzymol.* 2009, V. 458, P. 337–351.
90. Felnagle E. A., Jackson E. E., Chan Y. A., Podevels A. M., Berti A. D., McMahon M. D., Thomas M. G. Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Mol. Pharm.* 2008, 5(2), 191–211.
91. Roongsawang N., Lim S. P., Washio K., Takanokawa K., Kanaya S., Morikawa M. Phylogenetic analysis of condensation domains in the nonribosomal peptide synthetases. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 252(1), 143–151.
92. Samel S. A., Wagner B., Marahiel M. A., Essen L. O. The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *J. Mol. Biol.* 2006, 359(4), 876–889.
93. Schwarzer D., Mootz H. D., Marahiel M. A. Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases. *Chem. Biol.* 2001, 8(10), 997–1010.
94. Trauger J. W., Kohli R. M., Walsh C. T. Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry.* 2001, 40(24), 7092–7098.
95. Koglin A., Löhr F., Bernhard F., Rogov V. V., Frueh D. P., Strieter E. R., Mofid M. R., Güntert P., Wagner G., Walsh C. T., Marahiel M. A., Dötsch V. Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. *Nature.* 2008, 454(7206), 907–911.
96. Sieber S. A., Marahiel M. A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* 2005, 105(2), 715–738.
97. Peypoux F., Bonmatin J. M., Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 51(5), 553–563.
98. Balibar C. J., Vaillancourt F. H., Walsh C. T. Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem. Biol.* 2005, 12(11), 1189–1200.
99. De Bruijn I., de Kock M. J., de Waard P., van Beek T. A., Raaijmakers J. M. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 2008, 190(8), 2777–2789.
100. De Souza J. T., De Boer M., De Waard P., van Beek T. A., Raaijmakers J. M. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(12), 7161–7172.
101. Haas D., Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3(4), 307–319.
102. Heeb S., Haas D. Regulatory roles of the *GacS/GacA* two-component system in

- plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2001, 14(12), 1351–1363.
103. Wang N., Lu S. E., Records A. R., Gross D. C. Characterization of the transcriptional activators SalA and SyrF, Which are required for syringomycin and syringopeptin production by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *J. Bacteriol.* 2006, 188(9), 3290–3298.
 104. Koch B., Nielsen T. H., Sorensen D., Andersen J. B., Christophersen C., Molin S., Givskov M., Sorensen J., Nybroe O. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68(9), 4509–4516.
 105. Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006, 30(2), 274–291.
 106. Cui X., Harling R., Mutch P., Darling D. Identification of N-3-hydroxyoctanoyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas fluorescens* 5064, pathogenic to broccoli, and controlling biosurfactant production by quorum sensing. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2005, 111(4), 297–308.
 107. Dubern J. F., Lugtenberg B. J., Bloembergen G. V. The ppuI-rsaL-ppuR quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. *J. Bacteriol.* 2006, 188(8), 2898–2906.
 108. De Bruijn I., Raaijmakers J. M. Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75(14), 4753–4761.
 109. Dubern J. F., Coppoolse E. R., Stiekema W. J., Bloembergen G. V. Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *Microbiology*, 2008, 154(7), 2070–2083.
 110. Lu S. E., Scholz-Schroeder B. K., Gross D. C. Characterization of the *salA*, *syrF*, and *syrG* regulatory genes located at the right border of the syringomycin gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2002, 15(1), 43–53.
 111. Dubern J. F., Lagendijk E. L., Lugtenberg B. J., Bloembergen G. V. The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *J. Bacteriol.* 2005, 187(17), 5967–5976.
 112. De Bruijn I., Raaijmakers J. M. Regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP protease. *J. Bacteriol.* 2009, 191(6), 1910–1923.
 113. Duitman E. H., Wyczawski D., Boven L. G., Venema G., Kuipers O. P., Hamoen L. W. Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73(11), 3490–3496.
 114. Mäder U., Antelmann H., Buder T., Dahl M. K., Hecker M., Homuth G. *Bacillus subtilis* functional genomics: genome-wide analysis of the DegS-DegU regulon by transcriptomics and proteomics. *Mol. Genet. Genomics.* 2002, 268(4), 455–467.
 115. Hayashi K., Ohsawa T., Kobayashi K., Ogasawara N., Ogura M. The H₂O₂ stress-responsive regulator PerR positively regulates *srfA* expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 2005, 187(19), 6659–6667.
 116. Steller S., Sokoll A., Wilde C., Bernhard F., Franke P., Vater J. Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein. *Biochemistry.* 2004, 43(35), 1131–1143.
 117. Koumoutsis A., Chen X. H., Vater J., Borriss R. *DegU* and *YczE* positively regulate the synthesis of bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73(21), 6953–6964.
 118. Tsuge K., Matsui K., Itaya M. Production of the non-ribosomal peptide plipastatin in *Bacillus subtilis* regulated by three relevant gene blocks assembled in a single movable DNA segment. *J. Biotechnol.* 2007, 129(4), 592–603.
 119. Vollenbroich D., Pauli G., Ozel M., Vater J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63(1), 44–49.
 120. Moyne A. L., Shelby R., Cleveland T. E., Tuzun S. Bacillomycin D: an iturin with anti-fungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* 2001, 90(4), 622–629.
 121. De Bruijn I., de Kock M. J., Yang M., de Waard P., van Beek T. A., Raaijmakers J. M. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* 2007, 63(2), 417–428.
 122. De Souza J. T., Mazzola M., Raaijmakers J. M. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 2003, 5(12), 1328–1340.
 123. Kim B. S., Lee J. Y., Hwang B. K. *In vivo* control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest. Manag. Sci.* 2000, 56(12), 1029–1035.
 124. Tran H., Kruijt M., Raaijmakers J. M. Diversity and activity of biosurfactant-producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104(3), 839–851.

125. Van de Mortel J. E., Tran H., Govers F., Raaijmakers J. M. Cellular responses of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* to cyclic lipopeptide surfactants and their dependence on G proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75(15), 4950–4957.
126. Yoo D. S., Lee B. S., Kim E. K. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 15(6), 1164–1169.
127. Ronn R., McCaig A. E., Griffiths B. S., Prosser J. I. Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68(12), 6094–6105.
128. Matz C., Kjelleberg S. Off the hook—how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 2005, 13(7), 302–307.
129. Jousset A., Lara E., Wall L. G., Valverde C. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72(11), 7083–7090.
130. Matz C., Deines P., Boenigk J., Arndt H., Eberl L., Kjelleberg S., Jürgens K. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70(3), 1593–1599.
131. Pradel E., Zhang Y., Pujol N., Matsuyama T., Bargmann C. I., Ewbank J. J. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007, 104(7), 2295–2300.
132. Mazzola M., de Bruijn I., Cohen M. F., Raaijmakers J. M. Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75(21), 6804–6811.
133. Daniels R., Reynaert S., Hoekstra H., Verreth C., Janssens J., Braeken K., Fauvart M., Beullens S., Heusdens C., Lambrichts I., De Vos D. E., Vanderleyden J., Vermant J., Michiels J. Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103(40), 14965–14970.
134. Andersen J. B., Koch B., Nielsen T. H., Nybroe O., Christophersen C., Sørensen J., Molin S., Givskov M. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology.* 2003, 149(1), 37–46.
135. Kearns D. B., Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 2003, 49(3), 581–590.
136. Kinsinger R. F., Shirk M. C., Fall R. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol.* 2003, 185(18), 5627–5631.
137. Nielsen T. H., Nybroe O., Koch B., Hansen M., Sørensen J. Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas* sp. strain DSS73. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71(7), 4112–4116.
138. Tran H., Ficke A., Asiimwe T., Höfte M., Raaijmakers J. M. Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytol.* 2007, 175(4), 731–742.
139. Koumoutsis A., Chen X. H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 2004, 186(4), 1084–1096.
140. Hofemeister J., Conrad B., Adler B., Hofemeister B., Feesche J., Kucheryava N., Steinborn G., Franke P., Grammel N., Zwintscher A., Leenders F., Hitzeroth G., Vater J. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol. Genet. Genomics.* 2004, 272(4), 363–378.
141. López D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 2009, 74(3), 609–618.
142. Nitschke M., Araújo L. V., Costa S. G., Pires R. C., Zeraik A. E., Fernandes A. C., Freire D. M., Contiero J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, 49(2), 241–247.
143. Mireles J. R., Toguchi A., Harshey R. M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001, 183(20), 5848–5854.
144. Straight P. D., Willey J. M., Kolter R. Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: Role of surfactants in raising aerial structures. *J. Bacteriol.* 2006, 188(13), 4918–4925.
145. Janek T., Lukaszewicz M., Krasowska A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiol.* 2012, doi: 10.1186/1471-2180-12-24.
146. Scholz-Schroeder B. K., Hutchison M. L., Grgurina I., Gross D. C. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of *sypA* and *syrB1* biosynthesis mutant analysis. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 2001, 14(3), 336–348.

147. Hildebrand P. D., Braun P. G., McRae K. B., Lu X. Role of the biosurfactant viscocin in broccoli head rot caused by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Plant. Pathol.* 1998, 20(3), 296–303.
148. Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. L., Thonart P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 2007, 9(4), 1084–1090.
149. Blée E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant. Sci.* 2002, 7(7), 315–322.
150. Wang C. L., Ng T. B., Yuan F., Liu Z. K., Liu F. Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cyclic lipopeptide from *Bacillus subtilis* natto T-2. *Peptides.* 2007, 28(7), 1344–1350.
151. Kim S. Y., Kim J. Y., Kim S. H., Bae H. J., Yi H., Yoon S. H., Koo B. S., Kwon M., Cho J. Y., Lee C. E., Hong S. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS Lett.* 2007, 581(5), 865–871.
152. Grangemard I., Wallach J., Maget-Dana R., Peypoux F. Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001, 90(3), 199–210.
153. Rautenbach M., Swart P., van der Merwe M. J. The interaction of analogues of the antimicrobial lipopeptide, iturin A2, with alkali metal ions. *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8(11), 2539–2548.
154. Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53(5), 495–508.
155. Phale P. S., Basu A., Majhi P. D., Deveryshetty J., Vamsee-Krishna C., Shrivastava R. Metabolic diversity in bacterial degradation of aromatic compounds. *OMICS.* 2007, 11(3), 252–279.
156. Velraeds M. M., van der Mei H. C., Reid G., Busscher H. J. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62(6), 1958–1963.
157. Busscher H. J., van Hoogmoed C. G., Geertsema-Doornbusch G. I., van der Kuijl-Booij M., van der Mei H. C. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* sp. on silicone rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63(10), 3810–3817.
158. Gan B. S., Kim J., Reid G., Cadieux P., Howard J. C. *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J. Infect. Dis.* 2002, 185(9), 1369–1372.
159. Rodrigues L., van der Mei H., Banat I. M., Teixeira J., Oliveira R. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006, 46(1), 107–112.
160. Rodrigues L., van der Mei H. C., Teixeira J., Oliveira R. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70(7), 4408–4410.
161. Rodrigues L. R., Teixeira J. A., van der Mei H. C., Oliveira R. Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* 2006, 53(1), 105–112.
162. Rodrigues L. R., Teixeira J. A., van der Mei H. C., Oliveira R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Surf. B. Biointerfaces.* 2006, 49(1), 79–86.
163. Austin B. Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 1989, 67(5), 461–470.
164. Jensen P. R., Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994, V. 48, 559–584.
165. Bertrand J. C., Bonin P., Goutx M., Mille G. Biosurfactant production by marine microorganisms: potential application to fighting hydrocarbon marine pollution. *J. Mar. Biotechnol.* 1993, 1(3), 125–129.
166. Weiner R. M. Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends. Biotechnol.* 1997, 15(10), 390–394.
167. Weiner R. M., Colwell R. R., Jarman R. N., Stein D. C., Somerville C. C., Bonar D. B. Applications of biotechnology to the production, recovery and use of marine polysaccharides. *Nat. Biotechnol.* 1985, 3(10), 899–902.
168. Maneerat S. Biosurfactants from marine microorganisms. *Songklanakarim J. Sci. Technol.* 2005, 27(6), 1263–1272.
169. Nerurkar A. S., Hingurao K. S., Suthar H. G. Bioemulsifiers from marine microorganisms. *J. Sci. Ind. Res.* 2009, 68(4), 273–277.
170. Zhenming C., Yan F. Exopolysaccharides from marine bacteria. *J. Ocean. Univ. China.* 2005, 4(1), 67–74.
171. Das P., Mukherjee S., Sen R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104(6), 1675–1684.
172. Das P., Mukherjee S., Sen R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere.* 2008, 72(9), 1229–1234.
173. Das P., Mukherjee S., Sen R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresour. Technol.* 2009, 100(2), 1015–1019.
174. Maneerat S., Nitoda T., Kanzaki H., Kawai F. Bile acids are new products of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 67(5), 679–683.

175. Peng F., Liu Z., Wang L., Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 102(6), 1603–1611.
176. Pepi M., Cesàro A., Liut G., Baldi F. An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on *n*-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005, 53(1), 157–166.
177. Thavasi R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I. M. Biodegradation of crude oil by nitrogen fixing marine bacteria *Azotobacter chroococcum*. *Res. J. Microbiol.* 2006, 1(5), 401–408.
178. Thavasi R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I. M. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. *Lett. Appl. Microbiol.* 2007, 45(6), 686–691.
179. Thavasi R., Subramanyam Nambaru V. R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I. M. Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 2009, 11(5), 551–556.

МИКРОБНЫЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА. II. ЛИПОПЕПТИДЫ

Т. П. Пирог, А. Д. Конон, А. П. Софилканич

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Представлены классификация и химическая структура липопептидов, их продуцентов (представители родов *Bacillus* и *Pseudomonas*). Описана роль липопептидов в движении клеток и формировании биопленок, связывании металлов и деструкции ксенобиотиков, а также их действие на клетки про- и эукариот. Рассмотрены этапы нерибосомального синтеза липопептидов, освещена роль двухкомпонентных (GacA/GacS, ComA/ComP) и кворумной систем в регуляции этого процесса.

Раскрыт потенциал молочнокислых бактерий и морских микроорганизмов как нетрадиционных перспективных продуцентов поверхностно-активных веществ различной химической природы (гликолипидов, липопептидов, фосфолипидов и жирных кислот, гликолипидов), показаны их продуктивность и преимущества перед традиционными продуцентами. Описаны свойства поверхностно-активных веществ, синтезированных молочнокислыми бактериями (снижение поверхностного натяжения, критическая концентрация мицеллообразования, устойчивость в широком диапазоне pH, температуры, биологическое действие).

Поверхностно-активные вещества пробиотических непатогенных бактерий могут быть использованы как эффективные антиадгезивные и антимикробные агенты, а морские продуценты способны к синтезу уникальных метаболитов, не продуцируемых другими микроорганизмами.

Ключевые слова: микробные поверхностно-активные вещества, липопептиды, молочнокислые бактерии, нетрадиционные продуценты.

MICROBIAL SURFACTANTS. II. LIPOPEPTIDES

T. P. Pirog, A. D. Konon, A. P. Sofilkanich

National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

The classification and the chemical structure of the lipopeptides and their producers (bacteria of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*) are given. The role of the lipopeptides in cells motility, biofilm formation, metal binding and xenobiotics degradation and their action on the cells of pro- and eukaryotes is summarized. The stages of the nonribosomal lipopeptides synthesis and the role of two-component (GacA/GacS, ComA/ComP) and the quorum system regulation of this process are shown.

The potential of lactic acid bacteria and marine microorganisms as alternative surfactants producers (glycolipids, lipopeptides, phospholipids and fatty acids, glycolipopeptides) are discussed. Their productivity and advantages over traditional producers are given as well. The properties of surfactants synthesized by lactic acid bacteria (the reduction of the surface tension, the critical micelle concentration, the stability in a wide range of pH, the temperature, the biological activity) are summarized.

Surfactants of nonpathogenic probiotic bacteria could be used as effective antimicrobial agents and antiadhesive and marine producers which able to synthesize unique metabolites that are not produced by other microorganisms.

Key words: microbial surfactants, lipopeptides, lactic acid bacteria, alternative producers.

МИКРОВОДОРОСЛИ КАК ПРОДУЦЕНТЫ ТОКОФЕРОЛОВ

В. М. МОКРОШОП, Е. К. ЗОЛОТАРЕВА

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

E-mail: membrana@ukr.net

Получено 16.12.2013

Микроводоросли способны накапливать значительные количества токоферолов (до 4 мг/г сухой массы). В отличие от растительных масел, количество α -токоферола в которых невелико, микроводоросли содержат до 97% этого токохроманола, что обеспечивает высокую биологическую активность витамина Е, извлекаемого из этих организмов. Приведены сведения о содержании токоферолов у эукариотических микроводорослей *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Euglena gracilis*, *Tetraselmis suecica*, *Diacronema vlkianum*, а также у цианобактерии *Spirulina platensis*. Накопление токоферолов у микроводорослей зависит от способа культивирования. Наибольшее количество токоферолов синтезируется в клетках *Euglena gracilis* при гетеротрофном выращивании. Такие технологические приемы, как двухстадийное культивирование, лимитирование питательной среды по некоторым биогенным элементам, введение экзогенных источников углерода, используются для повышения выхода α -токоферола у микроводорослей. В обзоре рассмотрена также стратегия генетической модификации растений, ведущая к повышению содержания активного витамина Е.

Ключевые слова: микроводоросли, α -токоферол, двухстадийное культивирование.

Соединения под общим названием «витамин Е» являются биологически активными жирорастворимыми токохроманолами, среди которых выделяют две группы — токоферолы и токотриенолы. Токоферолы имеют насыщенные боковые цепи, а токотриенолы — ненасыщенные, при этом каждая группа включает по четыре природных изоформы (α , β , γ и δ). В природе синтез витамина Е обеспечивают только фотосинтезирующие организмы — растения, эукариотические и прокариотические водоросли [1, 2].

Антиоксидантная функция витамина Е широко известна и достаточно изучена. В организме человека токоферол участвует в неэнзиматических антиоксидантных реакциях и обеспечивает защиту от активных форм кислорода. Учитывая химическую реактивность и действующие концентрации α -токоферола, можно утверждать, что он является важнейшим природным липофильным антиоксидантом *in vivo*. В плазме крови концентрация α -токоферола составляет 20,5–26,8 мкмоль/л, в то время как γ -токоферола — всего 1,5–3 мкмоль/л. Такое преобладание α -изоформы связывают с активностью α -токоферолтранспорти-

рующего протеина (α -ТТБ), избирательно облегчающего ее транспортировку [3]. Установлено, что антиоксидантная активность токоферолов *in vivo* зависит от уровня метилирования токохроманола и соответствует ряду α -Т > β -Т > γ -Т > δ -Т. Благодаря высокой внутримембранной подвижности наибольшую антиоксидантную активность имеют токотриенолы, однако их содержание в растительных продуктах, а следовательно, и роль в антиоксидантной защите животных организмов, существенно уступает токоферолам [3, 4].

Токоферолы встраиваются в мембраны клеток и их органелл, где могут обеспечивать максимальную защиту от свободных радикалов, окисляющих полиненасыщенные жирные кислоты и другие компоненты мембран. Предполагают, что витамин Е снижает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и злокачественных опухолей, участвует в предотвращении индуцированных светом патологий кожи, глаз, дегенеративных заболеваний, в частности атеросклероза [5].

Витамин Е используют в пищевой промышленности для защиты продуктов от окисления. В этом качестве пищевые добав-

ки (E307–E309), содержащие токоферолы, разрешены в Украине и Евросоюзе и применяются для защиты жиров от прогоркания и изменения цвета. Большая часть произведенного витамина Е потребляется животными, тогда как нужды человека удовлетворяет главным образом витамин природного происхождения, составляющий всего около четверти общего производства [6].

На сегодняшний день α -токоферол получают путем химического синтеза и экстракции из растительных масел. Синтезируют витамин Е из нефтепродуктов — изофитола и триметилгидрохинона. Широко используемая синтетическая форма *all-rac*- α -токоферол (*dl*- α -токоферол) состоит из смеси восьми стереоизомеров, где на природный стереоизомер *RRR*- α -токоферол приходится всего 12,5% [7]. Только 3 стереоизомера из 7 ненатуральных могут соответствовать активности *RRR*- α -токоферола, остальные 4 имеют сниженную активность и не узнаются α -ТТВ. Таким образом, природный α -токоферол по физическим свойствам несколько отличается от синтетического α -токоферола [5, 8].

Биологическая активность 1 мг природной формы *d*- α -токоферола соответствует 1,49 интернациональным единицам (ИЕ), в то время как биологическая активность такого же количества синтетического витамина Е составляет 1 ИЕ. Таким образом, натуральный α -токоферол в ~1,5 раза активнее синтетического [9]. Несмотря на доминирование на рынке синтетических токоферолов, в последние десятилетия возрастает потребительский спрос на натуральные антиоксиданты из-за возможного вреда здоровью длительного употребления синтетических витаминов.

В натуральном витамине Е, изолированном из растительных масел, преобладает

γ -токоферол, биологическая активность которого в 10 раз ниже, чем биологическая активность α -токоферола. Другие компоненты витамина Е из растительных масел также уступают α -токоферолу по биологической активности: β -токоферол — в 2 раза, а α -токотриенол — в 3,3 раза [10–15].

Плоды масличных растений, таких как подсолнух, соя, рапс, масличная пальма, грецкий орех, арахис, а также проростки пшеницы содержат большие количества токохроманолов. В табл. 1 приведены данные об их содержании в некоторых растительных маслах.

Наиболее богаты α -токоферолом проростки пшеницы. Основными источниками природного коммерческого витамина Е являются масла сои и подсолнечника [6, 15]. Причем, в рапсовом и кукурузном маслах доля α -токоферола не превышает 36%, а в соевом масле составляет лишь 14%. Из-за невысокого содержания α -токоферола общая активность витамина Е, получаемого из этих источников, невелика [9, 16].

Содержание активного витамина Е в культурных растениях удается повысить с помощью методов генной инженерии. Успешным оказался подход, основанный на регуляции экспрессии структурных генов, кодирующих основные ферменты синтеза токохроманолов. Увеличение активности накапливаемого витамина Е в этом случае достигается за счет либо увеличения содержания всех изоформ токохроманолов, либо превращения их в α -токоферол [17, 18].

Обе стратегии были успешно применены для трансформации растений арабидопсиса, рапса и сои. Семена этих растений содержат в основном γ - и δ -токоферолы из-за сниженной активности γ -токоферолметилтрансферазы (VTE-4), которая превращает

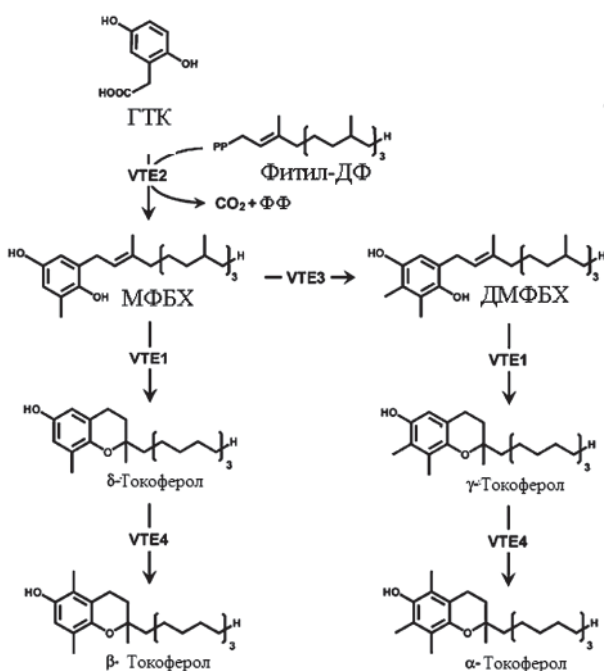
Таблица 1. Содержание токохроманолов (мг/100 г) в маслах культурных растений

Масло растения	α -Т	β -Т	γ -Т	δ -Т	α -ТЗ	β -ТЗ	γ -ТЗ	δ -ТЗ	Источники
Проростки пшеницы	127–192	65	18	0	2,5	8,2	0	0,24	[11, 12]
Подсолнух	59–61	1,7–2,4	1,1–1,4	0,27–2	0	0	0	0	[11, 13, 14]
Соя	11–7,5	3–3,4	61–74	26–36	0	0	0	0	[12, 13, 14, 15]
Рапс	17–26	0	36–43	1–4	0	0	0	0	[12, 13, 15]
Кукуруза	18	1,1	44	2,2	0,94	0	0	0,26	[11]

Примечание: Т — токоферол, ТЗ — токотриенол.

γ - и δ -токоферолы в α - и β -токоферолы соответственно (рисунок). Трансформация растений арабидопсиса, направленная на повышение экспрессии γ -токоферолметилтрансферазы в семенах, привела к превращению $> 95\%$ γ -токоферолов в α -изоформу, а небольшого пула δ -токоферолов — в β -токоферол, при этом общий уровень токохроманолов остался неизменным. Таким образом, активность витамина Е, накапливаемого в семенах арабидопсиса, увеличилась в 9 раз [19]. Сверхэкспрессия гена, кодирующего 2-метил-6-фитилбензохинол метилтрансферазу (VTE-3) у растений *Arabidopsis*, снизила содержание δ - и β -изоформ токоферолов с пропорциональным увеличением количества γ - и α -изоформ. Коммерчески важные масличные культуры, такие как рапс, соя и кукуруза, со сниженным соотношением α/γ -изоформ и невысоким общим количеством активного витамина Е могут быть модифицированы подобным образом [19].

В результате генной трансформации сои со встраиванием генов VTE-4 и VTE-3



Путь биосинтеза токоферолов:

ГТК — гомогентизиновая кислота;
 фитил-ДФ — фитил-дифосфат;
 МФБХ — 2-метил-6-фитилбензохинол;
 ДМФБХ — 2, 3-диметил-5-фитилбензохинол.
 Гены, кодирующие основные ферменты синтеза токоферолов:
 VTE2 — гомогентизиновая фитилтрансфераза;
 VTE1 — токоферолциклаза;
 VTE3 — МФБХ-метилтрансфераза;
 VTE4 — токоферолметилтрансфераза

из арабидопсиса соотношение изоформ токоферолов изменяется, доля α -токоферола возрастает до 96–98%, β -токоферола — до 2–4%, а γ - и δ -изоформ снижается до $< 0,2\%$ [16]. Одновременная сверхэкспрессия генов VTE-4 и VTE-3 способствует превращению практически всех изоформ токоферолов в α -токоферол, тем самым существенно улучшая качество растения как продуцента витамина Е, хотя при этом общее количество токоферолов остается неизменным [17].

Увеличение концентрации всех изоформ токоферолов в 5 раз в листьях и в 2 раза в семенах арабидопсиса достигалось путем встраивания гена из *Synechocystis* sp., кодирующего гомогентизиновую фитилтрансферазу (VTE2). Сверхэкспрессия гена VTE2 в семенах арабидопсиса и сои увеличивает общий уровень токохроманолов в 1,8 и 1,4 раза соответственно. Одновременная экспрессия генов HPPD (*p*-гидроксифенилпируватдиоксигеназы) и TugA (префенат дегидрогеназы), продукты которых увеличивают количество доступного предшественника гомогентизиновой кислоты, приводит к повышению уровня токоферолов в 1,8 у арабидопсиса и в 2,6 раза у сои. Наибольшее содержание витамина Е в семенах модифицированного арабидопсиса (2,710 нг/мг) по сравнению с диким типом наблюдалось у трансгенных растений, у которых были встроены все три гена: VTE2, HPPD и TugA. Накопление токохроманолов в листьях и семенах растений достигалось экспрессией гомогентизиновой геранилгеранилтрансферазы [9].

Таким образом, с помощью генной инженерии частично решается проблема низкого содержания витамина Е и активной его изоформы в растениях. Однако, несмотря на все плюсы генетической трансформации, продвижение трансгенных продуктов на рынок до сих пор сталкивается с потребительским недоверием, в связи с чем поиск альтернативных источников природного витамина Е остается весьма актуальным. Токоферолы, как известно, способны синтезироваться и накапливаться только у фотосинтезирующих организмов и в большом количестве у некоторых микроводорослей, уже зарекомендовавших себя потенциально экономически выгодными продуцентами α -токоферола [20].

Микроводоросли — водные одноклеточные растительные организмы, содержащие хлорофилл и осуществляющие окислительный фотосинтез. К этой группе принадлежат

также цианобактерии *Cyanophyceae* [21]. В последнее время значительно возрос интерес к биотехнологии микроводорослей как источнику витаминов и других ценных биологически активных соединений, используемых для обогащения рациона людей и животных [22]. Коммерческое использование микроводорослей для извлечения специфических химических веществ началось с *Dunaliella salina*, культивируемой с 1970-х гг. для получения β -каротина. Широкое распространение получило культивирование *Haematococcus pluvialis* Flotow и *Cryptocodinium cohnii* Seligo для получения астаксантина и длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, соответственно [23]. Из более чем 25 тыс. известных на сегодняшний день микроводорослей в коммерческих целях используется не более 15–17 видов. Они накапливают в больших количествах разнообразные биологически активные вещества и входят в состав многих пищевых добавок. Водоросли и их экстракты используют в косметике и в производстве кормов для животных. Выделены штаммы микроводорослей для коммерческого получения полиненасыщенных жирных кислот: γ -линолевой (*S. platensis*), арахидоновой (*Porphyridium cruentum*), докозагексановой (*C. cohnii*, *Schizochytrium* sp.), эйкозапентаеновой (*N. oculata*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Nitzschia* sp.), а также пигментов (*D. salina*, *H. pluvialis*) и фикобилипротеинов (*S. platensis*, *P. cruentum*) [24].

Успешное использование микроводорослей в биотехнологии во многом зависит от выбора продуцента и подбора оптимальных условий его культивирования. Определены виды микроводорослей, способных к аккумуляции токоферолов: *S. platensis*, *D. tertiolecta*, *Synechocystis* sp., *N. oculata*, *T. suecica*, *E. gracilis*, *D. salina*, *I. galbana*, *D. vlkianum*, виды *Chlorella*, *Clamydomonas* и *Ochromonas*. Отдельные штаммы пресноводной микроводоросли *E. gracilis* и морской микроводоросли *D. tertiolecta* продуцируют α -токоферол в высших концентрациях, чем в продуктах, которые традиционно используют в качестве источника витамина E [19].

Продуктивность и динамику накопления токоферолов в клетках этих штаммов детально исследовали. Однако из-за различий в условиях культивирования результаты противоречивы. В одном и том же штамме в разных условиях концентрация токоферолов может отличаться многократно, до

семи раз. Например, для *N. oculata* установлено, что концентрация токоферолов существенно изменяется в зависимости от фотопериода, химического состава питательной среды, стадии роста [25]. Для использования в качестве продуцентов токоферолов микроскопические водоросли должны быть способны к быстрому росту на простых и дешевых питательных средах, иметь низкую чувствительность к контаминации другими микроорганизмами, накапливать в клетках большое количество всех изоформ токоферолов и, главным образом, α -токоферола [19].

Внутриклеточное содержание α -токоферола зависит от условий культивирования, поэтому основным способом повышения содержания этого витамина является модификация состава культуральных сред, температурного и светового режимов. Экспериментально установлено влияние возраста культуры, температуры, фотопериода, содержания азота, интенсивности освещения, типа углеродного питания и природы экзогенных органических питательных добавок. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о стимуляции синтеза токоферолов активными формами кислорода, образующимися в клетках в условиях повреждения [19, 26].

D. tertiolecta и *T. suecica* — морские одноклеточные зеленые (*Chlorophyceae*) жгутиковые водоросли с высоким содержанием липидов. Количество α -токоферола в клетках при фотогетеротрофном культивировании достигает 0,5 мг/г сухого веса клеток *D. tertiolecta* и 0,6 мг/г — *T. suecica* [27].

При фотогетеротрофном культивировании одноклеточных зеленых водорослей *D. salina* и *N. oculata* содержание α -токоферола в конце экспоненциальной фазы составляло 0,37 и 0,5 мг/г сухой массы клеток, соответственно. При выращивании этих культур микроорганизмов в условиях дефицита азота содержание α -токоферола возрастало до 3,83 мг/г у *D. salina* и 0,95 — у *N. oculata*. В поздней стационарной фазе роста количество α -токоферола в клетках *N. oculata* увеличилось до 2,33 мг/г сухой массы. При этом уменьшение содержания азота в питательной среде ниже оптимального уровня угнетало рост микроводоросли [28, 29]. Таким образом, условия стимуляции биосинтеза витамина E негативно сказываются на накоплении биомассы микроводорослей, что снижает их продуктивность в единицу времени.

Содержание токоферолов в пересчете на клетку у других представителей зеленых одноклеточных водорослей родов *Chlorella* и *Chlamydomonas*, а также цианобактерии *Spirulina* невысоко, поэтому, несмотря на простоту выращивания и быстрое накопление биомассы, эти культуры не рассматриваются как перспективные продуценты витамина E [30].

Из анализа литературы следует, что наиболее изученным родом микроводорослей из числа потенциальных продуцентов токоферолов является *Euglena* spp. Внутриклеточная концентрация витамина E в некоторых штаммах *E. gracilis* может варьировать в широких пределах в зависимости от условий культивирования и, согласно некоторым данным, достигать показателя 7,35 мг/г клеток с содержанием α -токоферола до 95% [20]. В конце экспоненциальной фазы роста при фотоавтотрофном культивировании концентрация α -токоферола в клетках *E. gracilis* составляет в среднем 1,56 мг/г сухой массы клеток, что больше чем у *S. platensis* (0,063 мг/г), *I. galbana* (0,058 мг/г), *D. tertiolecta* (0,12 мг/г), *T. suecica* (0,42 мг/г), *D. vlkianum* (0,069 мг/г), *N. oculata* (0,51 мг/г) [28, 31, 32]. Согласно данным авторов, сравнивших 285 штаммов микроорганизмов — потенциальных продуцентов токоферолов, *E. gracilis* является наиболее перспективным сырьем для биотехнологического получения витамина E [20, 33]. Оптимизация синтеза α -токоферола культурой *E. gracilis* включает модификацию условий культивирования, двухстадийное выращивание и поиск субстратов, способствующих не только росту, но и накоплению α -токоферола данным организмом [5].

Микроводоросль *E. gracilis* способна ассимилировать разнообразные органические источники углерода (глюкоза, ацетат, глутамат, пируват, малат, этанол и др.), достигая плотности клеток 10,8 г сухой массы на 1 л при культивировании в среде с подобранным комбинированным их содержанием [26]. Этот организм одинаково хорошо растет и в автотрофных, и в гетеротрофных условиях, имеет широкий оптимум pH и температуры роста, не слишком прихотлив к интенсивности освещения, адаптирован к дефициту кислорода.

Одним из простейших и дешевых способов увеличения выхода витамина E из микроводоросли *E. gracilis* является вариация условий культивирования. При фотогете-

ротрофном культивировании достигается высокий прирост биомассы клеток *E. gracilis* за единицу времени при меньшем содержании антиоксидантных витаминов, чем в фотоавтотрофной культуре. Для эффективного продуцирования этих витаминов рекомендовано применять двухстадийное культивирование. На первом этапе культуру выращивают фотогетеротрофно, а на втором — переходят на фотоавтотрофный режим культивирования. Таким образом, сначала происходит накопление биомассы, а затем создаются условия, благоприятные для биосинтеза токоферола. Удачным примером использования двухэтапного культивирования является работа [30]. В условиях этих экспериментов концентрация клеток *E. gracilis* достигала 19 г/л на 6-е сут фотогетеротрофного (или гетеротрофного) культивирования. Это в 7 раз больше, чем максимальное накопление биомассы за такой же период при фотоавтотрофном режиме выращивания. Последующий перевод клеток в фотоавтотрофный режим на трое суток дал возможность увеличить содержание витамина E в 2–3 раза в пересчете на клетку. При этом значительно, более чем в 2 раза, возрастали также концентрации β -каротина и витамина C. В контрольной культуре *E. gracilis*, которую в течение всех 9 сут эксперимента выращивали в фотоавтотрофном режиме, содержание витаминов в пересчете на клетку было таким же, как и в опыте, однако накопление биомассы за этот период составляло лишь 10–15% от общего количества клеток опытного варианта культуры [30].

Применение метода двухстадийного культивирования при выращивании некоторых других водорослей не дал положительного эффекта. Так, хотя микроводоросль *D. tertiolecta* и накапливала несколько большее количество токоферолов на клетку, однако биомасса и общий выход витамина E существенно не увеличивались [30].

Применение циклического фотоавтотрофно-гетеротрофного режима культивирования, при котором клетки на протяжении дня культивируются фотоавтотрофно, а ночью гетеротрофно, решает проблему потери биомассы ночью и непрерывного накопления биомассы в условиях циклов свет-темнота [34].

Синтез токохроманолов в клетках *E. gracilis* можно стимулировать путем внесения в питательную среду экзогенных источни-

ков углерода и азота. Этот организм способен утилизировать разнообразные органические вещества, причем некоторые из них существенно стимулируют рост клеток и увеличивают содержание витамина Е. Накопление биомассы при гетеротрофном культивировании микроводорослей в солевой питательной среде в присутствии этанола на 19-е сут доходило до 39,5 г/л, что больше, чем при фотоавтотрофном или даже фотогетеротрофном культивировании, и может быть экономически целесообразным, поскольку гетеротрофное выращивание не зависит от источников освещения. Содержание токоферолов в этом эксперименте составляло 1,2 мг/г клеток, что немного уступает показателям, полученным при фотоавтотрофном (1,56 мг/г клеток) и двухстадийном фотогетеротрофно-фотоавтотрофном культивировании (1,45 мг/г клеток). Скорость накопления α -токоферола составляла $102,1 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$ [35]. Намного большая концентрация α -токоферола (6,1 мг/г) была получена при использовании мутантного штамма *E. gracilis* с добавлением в питательную среду предшественников синтеза α -токоферола [33]. Существует предположение, что ацетил-КоА, образованный в процессе метаболизма этанола, может быть использован как предшественник синтеза токоферолов. Этанол снижает вероятность заражения культуры другими микроорганизмами и способствует накоплению парамилона, запасного полисахарида *E. gracilis*, который обладает иммуностимулирующим действием и может быть использован в качестве перспективного сырья для получения фармпрепаратов [36, 37].

Еще больший положительный эффект может быть достигнут при использовании комбинации экзогенно внесенных органических

соединений. Так, одновременное внесение этанола и глюкозы уже через 6 сут позволяет достичь накопления биомассы до 19,69 г/л при концентрации α -токоферола 1,19 мг/г клеток [38]. При добавлении этанола вместе с малатом и глутаматом уже на 5-е сут гетеротрофного культивирования содержание токоферола достигает 3,7 мг/г клеток [26]. Данные о содержании α -токоферола в клетках *E. gracilis* при культивировании разными способами, представленные в табл. 2, показывают, что микроводоросль *E. gracilis* способна накапливать α -токоферол в значительно больших количествах, чем семена подсолнуха (0,27 мг/г) и сои (0,2 мг/г) [26].

Следует также отметить, что клетки *E. gracilis* не имеют целлюлозной клеточной стенки, что значительно облегчает экстракцию токоферолов. Биомасса *E. gracilis* съедобна, легко усваивается и ассимилируется в организме человека и животных. Клетки помимо α -токоферола в больших количествах накапливают и другие антиоксиданты, такие как β -каротин, витамин С, глутатион, полиненасыщенные жирные кислоты, все 20 основных аминокислот и иммуностимулирующий разветвленный полисахарид β -гликан (парамилон) [39]. Биомасса *E. gracilis* имеет высокую питательную ценность и может использоваться как корм для животных и в пищевых добавках [40].

Таким образом, данные литературы позволяют сделать вывод, что благодаря простоте и экономичности процесса гетеротрофного культивирования микроводоросль *E. gracilis* рассматривается как перспективный продуцент витамина Е и может быть предложена в качестве выгодной замены природным коммерческим источникам — растительным маслам.

Таблица 2. Содержание α -токоферола в клетках микроводоросли *E. gracilis* при разных способах культивирования

Фаза роста культуры	Условия культивирования	Содержание α -токоферола (мг/г сухой массы)	Литература
Конец экспоненциальной фазы	Фотоавтотрофное	1,56	[35]
—	Фотоавтотрофно-фотогетеротрофное двухстадийное	1,45	
—	Гетеротрофное (этанол)	1,2	
Экспоненциальная фаза	Гетеротрофное (этанол)	1,4	[26]
—	Гетеротрофное (этанол+глутамат)	2,45	
—	Гетеротрофное (этанол+глутамат+малат)	3,7	

REFERENCES

1. Abbasi A. Functional analysis of tocopherol biosynthesis in plants. *Aus Tehran: IRI*. 2007, 171 p.
2. Preedy V., Watson R. The encyclopedia of vitamin E. *London: CABI Publishing*. 2007, 945 p.
3. Müller L., Theile K., Böhm V. In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol. Nutr. Food Res*. 2010, 54(5), 731–742.
4. Niki E., Noguch N. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc. Chem. Rec*. 2004, V. 37, P. 45–51.
5. Survase S., Bajaj I., Singal R. Biotechnological production of vitamins. *Food Technol. Biotech*. 2006, 44(3), 381–396.
6. Natural source vitamin E. A global market overview. *New York*. 2013, 345 p.
7. Weiser H., Riss G., Kormann A. Biodiscrimination of the eight α -tocopherol stereoisomers results in preferential accumulation of the four 2R forms in tissues and plasma of rats. *J. Nutr*. 1996, 126(10), 2539–2549.
8. Jensen S., Lauridsen C. α -Tocopherol stereoisomers. *Vitam. Horm*. 2007, V. 76, P. 281–308.
9. Henry V., Qungang Q. Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotech*. 2005, V. 68, P. 436–444.
10. World Health Organization. Human Vitamin and mineral requirements: report of a joint FAO/WHO expert consultation. *Rome: VTC*. 2001, 341 p.
11. Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *J. Food Comp. Anal*. 2008, 21(2), 152–161.
12. Herting D., Drury E. Vitamin E content of vegetable oils and fats. *J. Nutr*. 1965, N 81, P. 335–341.
13. <http://www.medicinalfoodnews.com/vol01/issue6/vegyoils>
14. Warner K., Mounts T. Analysis of tocopherols and phytosterols in vegetable oils by HPLC with evaporative light-scattering detection. *JAOCs*. 1990, 67(11), 827–831.
15. <http://www.cyberlipid.org/vite/vite0001.htm>
16. Rocheford T., Wong J., Egesel C., Lambert R. Enhancement of vitamin E levels in corn. *J. Amer. Coll. Nutr*. 2002, 21(3), 191–198.
17. Rippert P., Scimemi C., Dubald M., Matringe M. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiol*. 2004, V. 134, P. 92–100.
18. Shintani D., Della Penna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*. 1998, V. 282, P. 2098–2100.
19. Van Eenennaam A. I., Lincoln K., Durrett T. P., Valentin H. E., Sheemaker C. K., Thorne G. M., Svang J., Baszis S. R., Leveering C. K., Aasen E. D., Hao M., Stein J. C., Norris S. R., Last R. L. Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. *Plant Cell*. 2003, V. 15, P. 3007–3019.
20. Ogbonna J. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotech*. 2009, V. 84, P. 217–225.
21. Tomaselli L. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied phycology. *Oxford: Blackwell*. 2004, 566 p.
22. Zolotariova O. K., Shniukova E. I., Sivash O. O., Mikhailenko N. F., Kotinskiy A. V. Prospects of microalgae using in biotechnology. *Kyiv: Alterpres*. 2008, 234 p. (In Ukrainian).
23. Raja R., Hemaiswarya S., Kumar N. A., Sridhar S., Rengasamy R. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol*. 2008, N 34. P. 77–88.
24. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng*. 2006, 101(2), 87–96.
25. Brown M., Mular M., Miller I., Farmer C., Trnnerly C. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J. Appl. Phycol*. 1999, N. 11, P. 247–255.
26. Rodriguez-Zavala J., Ortiz-Cruz M., Mendoza-Hernandez G., Moreno-Sanchez R. Increased synthesis of α -tocopherol by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *J. Appl. Microbiol*. 2010, V. 109, P. 2160–2172.
27. Carballo-Cardenas E., Tuan P., Janssen M., Wijffels R. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol. Eng*. 2003, V. 20, P. 139–147.
28. Durmaz Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture*. 2007, V. 272, P. 717–722.
29. Abd El-Baky H., Farouk K., El Baz G. S., El-Baroty G. S. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *Int. J. Agricult. Biol*. 2004, 6(1), 49–57.
30. Takeyama H., Kanamaru A., Yoshino Y., Kakuta H., Kawamura Y., Matsunaga T. Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotech. Bioeng*. 1997, V. 53, P. 185–190.
31. Yasar D., Sevket G. α -Tocopherol and fatty acids of *Spirulina platensis* biomass in glass panel bioreactor. *Pak. J. Biol. Sci*. 2006, 9(15), 2901–2904.

32. Fabregas J., Herrero C. Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. *J. Indust. Microbiol.* 1990, V. 5, P. 259–264.
33. Tani Y., Osuka S. α -Tocopherol production by an analog-resistant strain of *Euglena gracilis* Z. *Agric. Biol. Chem.* 1989, V. 53, P. 2313–2318.
34. Ogbonna J., Ichige E., Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2002, V. 58, P. 532–538.
35. Ogbonna J. C., Tomiyama S., Tanaka H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. *J. Appl. Phycol.* 1998, V. 10, P. 67–74.
36. Afiukwa C., Ogbonna J. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*. *Afr. J. Biotech.* 2007, 6(22), 2612–2615.
37. Tani Y., Tsumura H. Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. *Agric. Biol. Chem.* 1989, 53(2), 305–312.
38. Fujita T., Aoyagi H., Ogbonna J., Tanaka H. Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 79(3), 371–378.
39. Vismara R., Vestri S., Kusmic C., Barsanti L., Gualtieri P. Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 2003, V. 15, P. 75–80.
40. Matsumoto T., Inui H., Miyatake K., Nakano Y., Murakami K. Comparison of nutrients in *Euglena* with those in other representative food sources. *Eco-Engineering.* 2009, 21(2), 81–86.

МІКРОВОДОРСТІ ЯК ПРОДУЦЕНТИ ТОКОФЕРОЛІВ

V. M. Mokrosnop
O. K. Zolotareva

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ

E-mail: membrana@ukr.net

Мікродорості здатні накопичувати токоферолі у значних кількостях (до 4 мг/г сухої ваги). На відміну від рослинних олій, кількість α -токоферолу в яких невелика, мікродорості містять до 97% цього токохроманолу, що забезпечує високу біологічну активність вітаміну Е, вилученого із цих організмів. Наведено дані щодо вмісту токоферолів у еукаріотичних мікродоростей *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Euglena gracilis*, *Tetraselmis suecica*, *Diacronema vlkianum*, а також у ціанобактерії *Spirulina platensis*. Накопичення токоферолів у мікродоростях залежить від способу культивування. Найбільша кількість токоферолів синтезується у клітинах *Euglena gracilis* за гетеротрофного культивування. Такі технологічні прийоми, як двостадійне культивування, лімітування живильного середовища за деякими біогенними елементами, введення екзогенних джерел вуглецю, використовують для підвищення виходу α -токоферолу у мікродоростей. В огляді розглянуто також стратегію генетичної модифікації рослин, що сприяє підвищенню вмісту активного вітаміну Е.

Ключові слова: мікродорості, α -токоферол, двостадійне культивування.

MICROALGAE AS TOCOPHEROL PRODUCERS

V. M. Mokrosnop
E. K. Zolotareva

Institute of Botany of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: membrana@ukr.net

Microalgae are able to accumulate considerable amounts of tocopherols (up to 4 mg/g dry weight). The content of α -tocopherol to plant oils is low, whereas microalgae contain up to 97% of the tocopherols that provides high bioactivity. The data about the content of tocopherols in eukaryotic microalgae *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Euglena gracilis*, *Tetraselmis suecica*, *Diacronema vlkianum*, as well as in the cyanobacterium *Spirulina platensis* are given in the paper. The largest amounts of tocopherols are synthesized by *Euglena gracilis* cells at mixotrophic cultivation. The level of tocopherols in microalgae depends on cultivation conditions. Two-stage biotech cultivation techniques, limiting nutrition in some biogenic elements, the introduction of exogenous carbon sources are used to increase the yield of tocopherol from microalgae. The approaches to the genetic transformation of plants leading to higher content of active vitamin E are reviewed as well.

Key words: microalgae, α -tocopherol, two-step cultivation.

УДК 577.112: 543.544.17(045)

APPLICATION OF IMMUNOGLOBULIN-BINDING PROTEINS A, G, L IN THE AFFINITY CHROMATOGRAPHY

O. V. SVIATENKO¹, O. B. GORBATIUK², O. A. VASYLCHENKO¹¹National Aviation University, Kyiv, Ukraine²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv*E-mail: svyatenko@hotmail.com*

Received 22.07.2013

Proteins A, G and L are native or recombinant proteins of microbial origin that bind to mammalian immunoglobulins. Preferably recombinant variants of proteins A, G, L are used in biotechnology for affinity sorbents production. Comparative characteristics of proteins A, G, L and affinity sorbents on the basis of them, advantages and disadvantages of these proteins application as ligands in the affinity chromatography are done. Analysis of proteins A, G, L properties is presented. Binding specificities and affinities of these proteins differ between species and antibody subclass. Protein A has high affinity to human IgG1, IgG2, IgG4, mouse IgG2a, IgG2b, IgG3, goat and sheep IgG2, dog, cat, guinea pig, rabbit IgG. Protein G binds strongly to human, mouse, cow, goat, sheep and rabbit IgG. Protein L has ability of strong binding to immunoglobulin kappa-chains of human, mouse, rat and pig. Expediency of application of affinity chromatography with usage of sorbents on the basis of immobilized proteins A, G, L are shown for isolation and purification of antibodies different classes. Previously mentioned method is used as an alternative to conventional methods of protein purification, such as ion-exchange, hydrophobic interactions, metal affinity chromatography, ethanol precipitation due to simplicity in usage, possibility of one-step purification process, obtaining of proteins high level purity, multiuse at maintenance of proper storage and usage conditions. Affinity sorbents on the basis of immobilized proteins A, G, L are used not only for antibodies purification, but also for extraction of different antibodies fractions from blood serum.

Key words: affinity chromatography, *Staphylococcus* protein A, peptostreptococcal protein L, protein G.

Nowadays antibodies are widely used in the medical biotechnology and fundamental research, purity level of antibodies has a great importance for their application. Combinations of separate methods, particularly, ethanol precipitation and different methods of chromatography (ion-exchange, hydrophobic interactions and metal affinity) are used for obtaining of great amounts of antibodies with high level of purity [1]. But these methods are nonspecific, application of them leads to the particular loss of antibodies functional activity. High productivity way for antibodies obtaining is affinity chromatography with application of sorbents on the basis of immobilized immunoglobulin binding proteins, particularly, recombinant protein A *Staphylococcus aureus*, protein G and peptostreptococcal protein L (PpL). This method is widely used for purified antibodies fractions obtaining from cultural and ascitic

liquids, blood sera; and also for immunosorbition of autoantibodies and immune complexes from blood plasma of ill people [2, 3].

Immobilization of protein ligands, for example proteins A, G, L, on the chemically activated matrices can lead to the loss of their functional activity. That's why creation of new affinity sorbents with high activity is very important and is very perspective area of research in pharmaceutical biotechnology. Protein A can be effective for application as ligand in the affinity chromatography due to the fact that each of its five domains can specifically interact with constant domains of antibodies; and this provides specific binding with IgG of different animal species and human [4]. Proteins G and L can be also successfully used as ligands in the affinity chromatography because protein G like protein A binds to the Fc domain of the human IgG, protein L binds through kappa light chain interactions without

interfering with an antibody's antigen-binding site [5, 6].

In the review main advantages of proteins A, G, L application as ligands in the affinity chromatography are determined, those are concerned with the possibility of one-step high level purification of antibodies different classes, or with different antibody fractions from blood serum extraction. Information, concerning affinity sorbents on the basis of immobilized proteins A, G, L and their application, is analyzed.

Properties of immunoglobulin-binding proteins

SPA structure and mechanism of interaction with immunoglobulins

Staphylococcus protein A (SPA) is 42-kDa a cell wall-associated protein of *Staphylococcus aureus*. SPA consists of five highly homologous domains E, D, A, B, and C (Fig. 1), all with IgG-binding activity, and region XM by means of which protein A is anchored to the cell wall, a signal sequence (S) processed during secretion of SPA (Fig. 2) [1, 7].

Each of the five domains in SPA is arranged in an antiparallel three α -helical bundle of approximately 58 amino acids and the three dimensional structure is stabilized through a hydrophobic core.

SPA possesses two distinct immunoglobulin-binding activities: each domain can bind the constant region Fc-region of IgG



Fig. 1. Structure of domain B of SPA, homologous to domains A, C, D, E in ribbon presentation

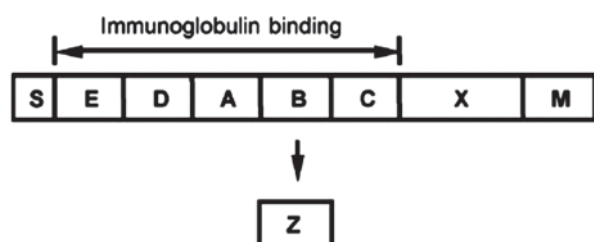


Fig. 2. The schematic structure of SPA

and variable fragment Fab-region that is responsible for antigen recognition. 11 amino acid residues of helix 1 and helix 2 of SPA interact with constant region of IgG molecule. D and E domains of SPA interact mainly with Fab domains of immunoglobulin and have very low affinity to its Fc domain, while A, B, C domains bind strongly to the immunoglobulin Fc domain [8]. SPA interacts strongly with human IgG1, IgG2 and IgG4, mouse IgG2a, IgG2b, IgG3, rabbit IgG, sheep IgG2 (Table 1).

Binding site of immunoglobulins with SPA for most IgG subclasses is localized on the region of heavy chain which includes CH2 and CH3 domains [1, 9]. This property is widely used for antibodies purification. SPA can be used for immunoglobulins fractionation because it has different affinity degree for immunoglobulins different subclasses.

SPA stability. SPA has a high conformational stability, remarkable resistance to physico-chemical stress and proteases action. SPA is stable in a wide pH range (2.0–11.0) and is able to refold after treatment with denaturing solutions such as urea and guanidine salts. The lack of cysteine residues allows SPA cleaning with reducing agents [10].

Protein G. Structure and mechanism of interaction with immunoglobulins

Protein G with molecular weight 30 000 Daltons is a cell-surface protein from *Streptococcus*: it contains in its structure multiple copies of two different small domains (COOH-terminal and NH₂-terminal domains) which can independently bind albumin and IgG. The COOH-terminal domain is responsible for IgG binding, whereas NH₂-terminal domain of the protein binds human serum albumin (HSA) [11, 12]. This property of protein G is used for extraction of albumin from blood serum. Protein G binds all the four subclasses of human IgG [12].

Protein G binds to the Fc fragment of immunoglobulins [13]. Protein G has three immunoglobulin-binding domains (C1, C2 and C3), each of 55 amino acid residues. It has been reported the X-ray crystallographic structure of the C2 fragment of protein G and the Fc domain of human IgG complex. The binding site of protein G is located on the interface between the CH2 and CH3 domains of the Fc domain of IgG (Fig. 3) [5, 12].

Protein G binds stronger than protein A to polyclonal IgGs from cow, horse, and sheep [5]. Protein G has a higher affinity for IgG

Table 1. Binding of different antibodies to SPA

Species	Subclasses	Binding to SPA	Species	Subclasses	Binding to SPA
Human	IgG1	Strong binding	Rat	IgG	Nonbinding
	IgG2	Strong binding		IgM	Nonbinding
	IgG3	Weak or nonbinding	Rabbit	IgG	Strong binding
	IgG4	Strong binding		IgM	Nonbinding
	IgA	Nonbinding	Sheep	IgG1	Nonbinding
	IgM	Nonbinding		IgG2	Strong binding
Mouse	IgG1	Weak or nonbinding	Goat	IgM	Nonbinding
	IgG2a	Strong binding		IgG1	Weak or nonbinding
	IgG2b	Strong binding	IgG2	Weak or nonbinding	
	IgG3	Strong binding	Goat	IgM	Nonbinding
	IgM	Nonbinding			

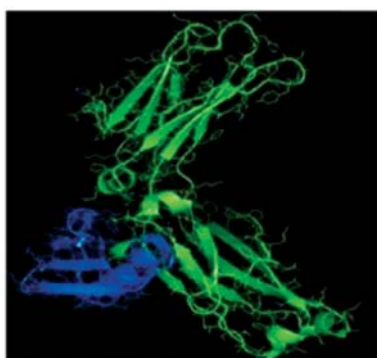


Fig. 3. X-ray crystallographic structure of protein G C2 fragment (blue color) interacting with human IgG Fc domain (green color)

than SPA, binding constants of SPA and G are $8,02 \cdot 10^3$ and $3,29 \cdot 10^4$ respectively. Protein G binds with greater capacity than SPA to several IgG subclasses such as human IgG3, mouse IgG1 and rat IgG2a [6]. Consequently, protein G can be effective in immunoglobulins purification when SPA cannot be used. Both SPA and protein G ligands are useful during antibodies purification and fractionation by affinity chromatography for different classes and subclasses of antibodies isolation [13].

PpL structure and mechanism of interaction with immunoglobulins

PpL is an immunoglobulin-binding protein that was originally derived from the bacteria *Peptostreptococcus magnus*, but now it is produced as recombinant protein. The structure of PpL is comprised of two anti-parallel β -hairpins and one α -helix (Fig. 4). The two hairpins have similar length [14].

The 62-residue immunoglobulin-binding domain of PpL consists of central α -helix packed on four-stranded β -sheet formed by N- and C-terminal β -hairpins. The overall topology of the protein is quite symmetric: the β -hairpins have similar lengths [16].

PpL has the unique property to bind to kappa light chain without interaction with an antibody's antigen-binding site. PpL, unlike SPA and protein G, has the ability to bind a wider range of immunoglobulin classes and subclasses such as human IgG2, IgG4, human and mouse IgM, IgG1, IgG3, human IgA, human IgD, mouse and rat IgG2a, IgG2b, rat IgG2c, IgG1. In addition, PpL binds to single chain variable fragments (scFv) without interfering to antigen binding site. PpL binds kappa I, III and IV human light chains, but not to kappa II in human and kappa I on mouse. PpL recognizes 50% of human and more than 75% of murine immunoglobulins [6, 17, 18]. PpL binds weakly to rabbit immunoglobulins and does not bind to bovine, goat or sheep immunoglobulins [19]. All these properties make PpL an excellent one in application as ligand in the affinity chromatography, giving possibility of recombinant ScFv molecules purification, human and mouse IgM, IgG1, human IgD, IgA,

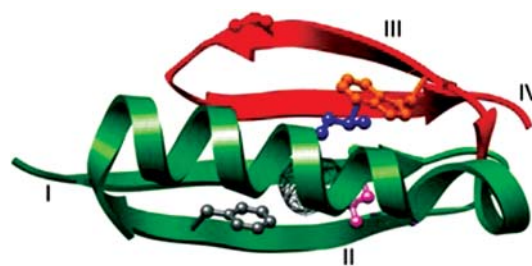


Fig. 4. Three-dimensional of PpL structure, of four β -sheets (I, II, III, IV) and one α -helix V [15]

rat IgG1 isolation from blood serum. So, affinity chromatography with application of sorbents on the basis of immobilized protein L has advantage over other ways of antibodies purification.

Application of SPA in the affinity chromatography

There are many papers concerning IgG classes and subclasses isolation using method of affinity chromatography with application of affinity sorbent with immobilized SPA on the Sepharose. In biotechnology affinity chromatography with application of sorbents on the basis of immobilized SPA is one of the best technique for the purification of monoclonal antibodies to homogeneity, due to its simplicity and high degree of antibody specificity, it is applied for immunosorption of antibodies from blood for diabetes mellitus, rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases treatment.

SPA, immobilized on the Sepharose, provides oriented immobilization of IgG (Fig. 5).

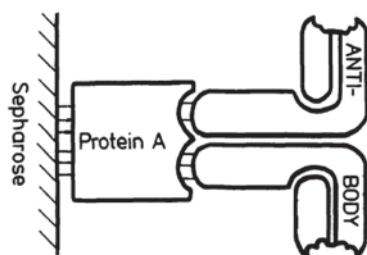


Fig. 5. Schematic drawing of immunoglobulin G, oriented immobilization by usage of SPA, covalently attached to Sepharose: covalent bonds are shown as full lines

Today high performance immunoaffinity chromatography (HPIAC) is applied. SPA is used as a coating to either solid or controlled pore glass beads by cross linking with carbodiimide application. This attachment helps to orient the antigen receptors of the antibody toward the mobile phase of the column. SPA binds to Fc domains of immunoglobulins by means of hydrophobic interaction [1].

Affinity sorbents on the basis of an immobilized SPA

Affinity sorbents on the basis of the immobilized SPA are available from several commercial suppliers and vary with respect to the source of the SPA (natural wild type or recombinant protein), chemistry of immobilization, and beads' characteristics of a sorbent. The two leading manufacturers of affinity

sorbents on the basis of the immobilized SPA are General Electric (GE) Healthcare and Millipore.

In affinity sorbent recombinant SPA is immobilized on the Sepharose. SPA is coupled via the C — terminal cysteine to the cyanogen bromide (CNBr) — activated Sepharose matrix through a single thioether linkage. Thioether coupling allows the ligand to extend farther into the mobile phase than would be possible for a laterally immobilized ligand, and this improves antibody binding [9]. In addition effective coupling of SPA molecule to the sorbent matrix provides absence of sorbent leaking, obtaining of pure antibodies fractions.

By means of genetic engineering techniques B domain of SPA was modified, and on its basis a new ligand was created in the form of a tetramer of four identical modified B domains. The absence of D and E domains of SPA in the given ligand also helps to eliminate variable region interactions, ligand interacts only with antibodies Fc domains. As a result antibodies binding heterogeneity is reduced, i.e. ligand binds only antibodies with high affinity to it. A newly developed sorbent, MabSelect SuRe, withstands strong alkaline conditions allowing the repeated use of 0.1–0.5 M NaOH for cleaning and sanitization.

The sorbent with the immobilized SPA on porous glass (ProSep A), on coated porous polystyrene materials (POROS) are also produced commercially.

Process of affinity chromatography with application of sorbents with the immobilized SPA provides 5- to 10-fold increase of the product concentration [10]. Antibodies purification with application of affinity sorbents on the basis of the immobilized SPA is effective due to its physicochemical stability and low operating expenses associated with sorbent cleaning and re-usage.

Antibodies purification procedure

A typical chromatogram of antibodies purification procedure by the way of usage of affinity chromatography with application of the sorbent on the basis of the immobilized SPA is shown in Fig. 5.

Loading/Binding. Most of the monoclonal antibodies currently being used or investigated for therapeutic applications are human molecules belonging to IgG classes 1, 2, or 4, all of which bind strongly to SPA. To the solution appointed for antibodies dilution before applying to the chromatographic

column packed by the sorbent with immobilized SPA, salt may be added for encouragement of monoclonal antibody binding to the SPA, and ethylene diamine tetraacetate to reduce proteolytic degradation, which leads to ligand loss. Monoclonal antibodies purification process runs several cycles on the above mentioned chromatographic column to purify a single batch. This reduces capital costs for such operation.

Washing procedure. For maximum removal of nonspecifically bound material, pH of washing solution must be low in order to untimely elution of antibodies does not begin. In such way buffer solutions with different combinations of salts and detergents, salts and solvents, salts and polymers, and high concentrations of Tris (hydroxymethylaminomethane) buffer can be used.

Elution. Elution pH is typically set at the highest possible value while maintaining high product yield. Urea is an effective hydrogen donor/acceptor that can outcompete hydrogen bonds, it could possibly be used at low concentrations to facilitate protein elution and keep product stability. Elution process on chromatographic columns packed with the sorbent with the immobilized SPA is conducted at low temperatures in order to avoid proteins aggregation.

Regeneration. The ability of the sorbent with the immobilized SPA to withstand a significant

number of its reuse cycles is an important factor for high effective antibodies purification process for therapeutic and laboratory application in pharmaceutical biotechnology. Regeneration of the sorbent with the immobilized SPA is typically carried out with low NaOH concentrations (typically <100 mM) usage because native or recombinant SPA is stable in slightly alkaline conditions [10].

Thus, antibodies purification process with application of the sorbent on the basis of the immobilized SPA provides ease and simplicity of purification process development and performance, high degree of protein purity because of several cycles performance. Consequently, large purification factor value obtained from this process step helps to simplify the entire downstream process of antibodies purification. Such proteins purification process is also economically beneficial because it doesn't need equipment for antibodies additional purification by other types of chromatography.

Immunoabsorption on affinity sorbents with immobilized SPA application

SPA is used for autoimmune diseases treatment in clinical practice. Immunoabsorption (IA) with application of SPA sorbents columns enables to bind antibodies and immune complexes and causes modification

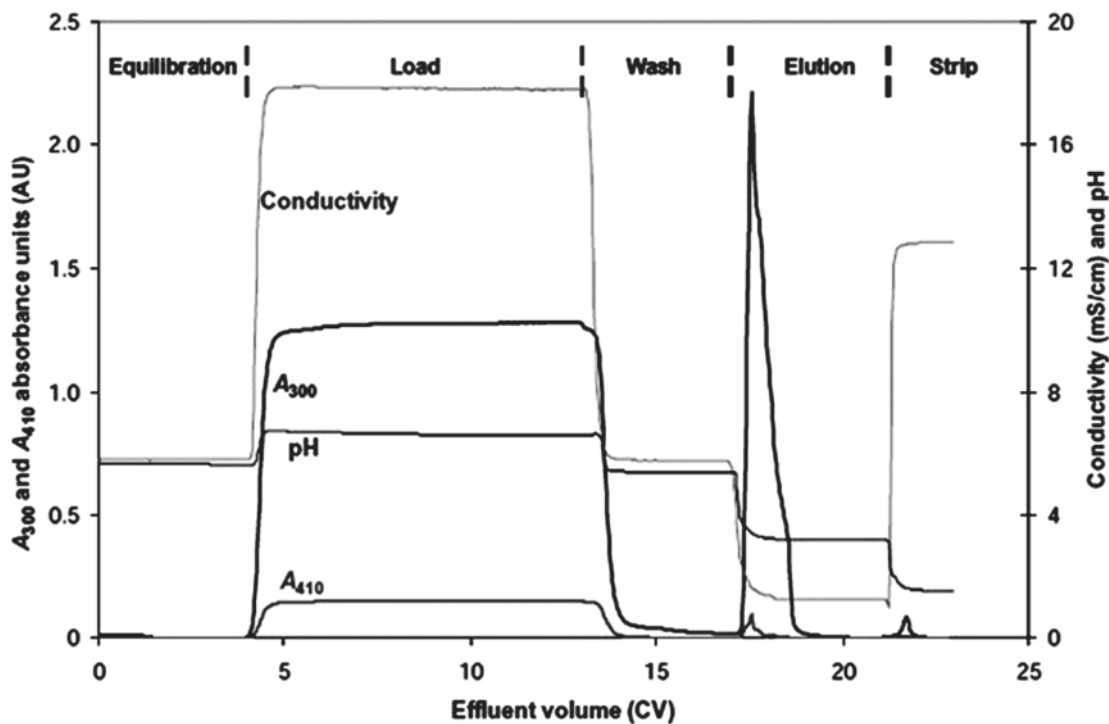


Fig. 6. A chromatogram of antibodies purification procedure by affinity chromatography on the sorbent with immobilized SPA application

of immune response. IA is effective for treatment of glomerulosclerosis, idiopathic thrombocytopenic purpura, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus, and also used in kidney transplantation. According to the clinical studies during treatment the level of immune complexes decreases [20–22].

Dilated cardiomyopathy is a chronic myocardial disease which results in progressive ventricular enlargement, myocardial contractile dysfunction. It causes heart failure, consequently, necessity of heart transplantation arises. Diabetes mellitus is a metabolic disorder resulted in severe systemic consequences: increased levels of IgG, IgG3, significant cardiovascular morbidity and mortality. IA improved myocardial inflammation in patients and decreased antibodies level in blood. IA was conducted applying columns with SPA, immobilized on the agarose (Immunosorba, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany). Consequently, IgG level decreased from 10.7 g/L to 1.1 g/L (by 89.7%) and IgG3 from 0.6 g/L to 0.2 g/L (by 66.7%) [23, 24].

Such dangerous autoimmune disease as systemic lupus erythematosus causes autoantibodies production, for example, anti-double-stranded DNA antibodies, and circulating immune complexes. Clinical trial in 20 systemic lupus erythematosus patients (two groups with 10 patients in each) showed the efficacy of two different adsorption columns and an 80% clinical response after 1 month (Immunosorba and Ig-Therasorb) [25].

Therefore, IA with SPA is very useful tool for diseases therapy, which is concerned with increased levels of antibodies in the blood. IA enables an efficient isolation of antibodies and immune complexes from patients' blood, thus improves their feeling, and prolongs clinical benefits.

Protein G application in affinity chromatography

In the affinity chromatography recombinant form of protein G, molecular weight 22 000 Da, is usually used. In this variant of protein G albumin- and cell surface binding sites have been eliminated in order to reduce nonspecific binding during purification of immunoglobulins. This advantage gives opportunity of recombinant protein G application for albumin separation from crude human immunoglobulin samples.

Immobilized protein G is most commonly used for the purification of mammalian monoclonal and polyclonal antibodies that do

not bind strongly to SPA. Optimal binding for most immunoglobulins to protein G occurs at pH 5.0, although more neutral Tris-HCl or phosphate buffers for binding (pH 7.5) have been used in many studies.

Affinity sorbents with an immobilized protein G, packed into chromatographic columns, are available commercially today. The most popular manufacturers of sorbents on the basis of the immobilized protein G are Pierce and General Electric (GE) Healthcare.

Sorbents on the basis of the immobilized protein G of Pierce manufacturing the recombinant form of protein G immobilized to either 6% cross-linked beaded agarose or UltraLink Biosupport chromatographic matrix are applied. Both types of sorbents with the immobilized protein G are leach-resistant and obtained matrix provides a minimal nonspecific binding. Both affinity sorbents can be regenerated and reused multiple times when stored properly [17]. Such advantages of sorbents on the basis of the immobilized protein G provide obtaining pure immunoglobulin fractions without contaminant proteins, time expenses reduction and application of such inexpensive reagent as NaOH for the sorbent regeneration and cleaning.

GE Healthcare produces affinity sorbent on the basis of the recombinant protein G. Protein G is immobilized on the sepharose, activated by the cyanogens bromide (CNBr). Such oriented immobilization of protein G provides higher exposure of mobile phase to this ligand, which gives possibility of obtaining of high yield of separated IgG (Table 2).

The sorbent on the basis of the immobilized protein G from manufacturer GE Healthcare has such advantages: maintaining of the IgG binding capacity and recovery after storage in all commonly used aqueous buffers

Table 2. The dynamic IgG capacity of the sorbent on the basis of the immobilized protein G on sepharose for various species (evaluation performed at GE Healthcare)

Species	Total IgG capacity (mg/ml)
Human	17
Rat	7
Sheep	18
Rabbit	19
Goat	19
Guinea-pig	17
Cow	23
Mouse	6

and denaturants such as 6 M guanidine hydrochloride and 8 M urea, and chaotropic salts such as 3 M sodium isothiocyanate; binding of IgG over a wide pH range. The affinity sorbent may be sanitized by washing with 70% ethanol.

Some of the most important application areas for this affinity sorbent are the isolation and purification or the removal of IgG from serum, the purification of monoclonal antibodies. In cases when IgG binds more strongly to the protein G than to the SPA (or binds little or doesn't bind to SPA), the sorbent on the basis of the immobilized protein G becomes a valuable tool to increase yield of immunoglobulins.

Purification of IgG from serum can be carried out effectively in a single step with the sorbent on the basis of the immobilized protein G. IgG from human, cow, horse, sheep, guinea-pig, dog, rabbit, mouse, and rat can be successfully purified. Because of its binding characteristics, the affinity sorbent on the basis of the immobilized protein G (GE Healthcare) is a valuable tool for the separation of antibodies from biological liquids, cell cultures. In fact, affinity chromatography with application of this sorbent is suitable for separations from cell culture fluid, where it is necessary to purify rapidly large volumes [26].

There are many scientific articles in the field of pharmaceutical biotechnology that describe application of affinity chromatography using affinity sorbents on the basis of the immobilized protein G for antibodies purification.

The recombinant human anti-Rhesus D antibodies of IgG1-subtype, produced by a Chinese Hamster Ovary cell line, were purified using affinity sorbent on the basis of the immobilized protein G. Yield of antibodies was 57% [27].

Recombinant human monoclonal IgG1 antibodies produced by a transfected Chinese hamster ovary (CHO) cell line were purified by application of affinity sorbent "Poros G" on the basis of the immobilized protein G using elution buffer of composition 0.1 M acetic acid and 0.15 M sodium chloride at a pH of 2.5. Yield of antibodies was 4.64 mg/l [28–31]. Monoclonal antibodies IgG1 to progesterone, obtained from hybridoma cell line, were purified also using the affinity sorbent on the basis of the immobilized protein G [32].

Affinity chromatography with application of sorbents on the basis of the immobilized protein G for isolation of antibodies can

be used in medical biotechnology, e. g. for isolation of autoantibodies to cytokines from human serum. Autoantibodies to cytokines can contribute to disease predisposition or pathogenesis. To describe the role of anti-cytokine autoantibodies in disease pathogenesis, it is important to quantitate accurately the levels of such autoantibodies in different patient groups. This can be made using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Isolation of IgG autoantibodies to tumor necrosis factor (TNF) from human serum was performed by the method of affinity chromatography with application of sorbent with the immobilized protein G on the Sepharose (GE Healthcare). Antibodies were eluted applying elution buffer (0.1 M Glycine-HCl, pH 2.5). Affinity chromatography with application of sorbents on the basis of the immobilized protein G enables to isolate of all four subclasses of immunoglobulin G to TNF and to conduct further analysis of their content applying ELISA [33–36].

Thus method of affinity chromatography with immobilized protein G has great number of advantages over other methods of proteins purification because it enables to purify antibodies for different purposes (e.g., in industrial biotechnology purification of recombinant antibodies from cell cultures, antibodies purification for application in medical diagnostics of diseases), high level of antibodies can be achieved without any particular losses.

Recently, high-performance magnetic affinity particles with immobilized genetically engineered fused protein A/G are applied for antibody purification. Such manufacturers as Thermo Scientific Pierce, BioVision etc. are produced such particles with immobilized Protein A/G. Protein A/G is a recombinant fusion protein which combines four Fc-binding domains from SPA and two domains from protein G. It can bind antibodies of a great variety from a wider range of animal species and a wider range of isotypes than either protein alone. These magnetic beads with the immobilized protein A/G have such advantages: low non-specific binding, sorbent losses elimination, obtaining of clean separate immunoglobulin fractions. They allow rapid antibody fractions obtaining of different classes and subclasses. Such method is very valuable for both fundamental research and laboratory clinical tests [37].

PpL application in affinity chromatography and immunoassays

PpL is very useful for purification of monoclonal antibodies containing kappa light chains from culture supernatant because it doesn't bind bovine immunoglobulins, which are present in the media serum supplement. Also, in contrast to proteins A and G, PpL is very effective at binding IgM. Although it binds to the Fab portion of the immunoglobulin monomer, PpL does not interfere with the antigen-binding site of the antibody, in contrast to SPA, which binds both Fab and Fc domains of immunoglobulin during purification procedure. Therefore, PpL is used in immunoprecipitation procedures and as a ligand in the affinity chromatography [17].

In 2007 Roque et al. described the application of an affinity sorbent on the basis of an immobilised PpL of trademark ImmunoPure for purification of goat serum and human serum. The percentages of human IgG and Fab fragments obtained from this affinity sorbent with the immobilized PpL were 75% and 70%, respectively. 0.1M glycine-HCl buffer, pH 2.0, was used [38].

PpL interacts mainly with region 1 (FR1) of kappa light chain without interfering with the antigen-binding site of the antibody. That's why, PpL could be used not only for the purification of human scFvs but also as a secondary reagent to detect antigen-scFv complexes in immunoassays. So this is one of the advantages of PpL that marks it out proteins A and G [39].

Thus in 2009 Muzard et al. reported a quick, easy, and efficient method that involves substituting a consensus sequence for the N-terminal sequence of the antibody VL domain that does not react with PpL. As this sequence mimics the antibody pattern recognized by PpL, so such substitution allows the detection and purification of murine label-free scFvs, obtained from *E. coli* culture, and the immunodetection of antigens using untagged antibody fragments [40].

Proteins scFvs were purified from periplasmic preparations extracted from bacterial culture onto an affinity sorbent with the immobilized PpL on the agarose (chromatographic column volume — 0.5 ml, Pierce Biotechnology, USA). During the purification process scFv molecules were eluted at pH 3.0. Preparations of purified scFvs were homogeneous, no contaminants were detected.

PpL is a potentially valuable tool for the purification, immobilization, and detection of unlabeled scFvs even when they are associated with their antigen [41]. The work of Muzard et al. shows that DNA sequence introduction of a PpL-binding site to the ScFv by means of genetic engineering methods does not alter antibody expression as a functional molecule in genetically modified bacteria of *Escherichia coli* HB2151. The sequence grafted onto the scFvs is an ideal affinity tag which allowed a single-step purification of each antibody fragment [42].

One else example of PpL application for antibodies purification is Cossins et. al. research. The last obtained recombinant PpL, at high yield, and this protein was used to produce the affinity sorbent with the immobilized PpL on the sepharose. PpL was shown to be over 95% pure after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis. PpL was coupled to a solid matrix at an efficiency of 94–98%. Typical yields of pure antibodies (>95% purity) were in the range of 35–65 mg/L [43, 44].

There is also one example of PpL application in the affinity chromatography but in fusion with protein G, particularly their DNA sequences of single light-chain binding domain of PpL and single Fc-binding domain of protein G. This study shows that despite a small size of the protein (molecular weight is 16.5 kDa) each domain behaves independently from each other with respect to the binding characteristics. The PpL domain was able to bind two equivalents of kappa light chains and the protein G domain binds to Fc domain of IgG. LG protein was expressed in *E. coli* cells with yield 75 mg/l.

In order to obtain an affinity sorbent with an immobilized protein LG it was immobilized onto thiopropyl-activated agarose through its C-terminal Cys residue and packed in 1 ml chromatographic column. This chromatographic column was used in experiments for purification of human Fc fragments, kappa chains, human Fc fragments combined with kappa chains, yields were released approximately 94.1% of bound human Fc fragments, 87.8% of bound kappa chains and 96.4% of combined bound human Fc + kappa chains. This fact confirms that the immobilized protein LG has the ability to bind both human Fc fragments and kappa chains simultaneously so it can be potential stable and multi-valent affinity ligand [45, 46]. Protein

LG ligand allows purification and isolation of immunoglobulins with high affinity to both protein G and PpL from blood serum, ascite fluids, and pure fractions obtaining of ScFv molecules due to their binding by kappa chains to PpL.

Due to its unique properties PpL has great advantages as affinity ligand, because protein L allows isolation of immunoglobulins wide row, including human and mouse IgM, IgG1, IgG3, human IgG2, IgG4, IgA, IgD, rat IgG2c, IgG1, mouse and rat IgG2a, IgG2b. What's more, PpL doesn't interact with antigen-binding site of antibodies, it interacts only with kappa light chains of immunoglobulins. Proteins A and G have not high affinity to human IgM, IgA, IgD, ScFv fragments, don't bind to mouse IgM, but PpL is successfully used to isolate and purify these antibodies.

Nowadays proteins A, G, L are used in the affinity chromatography as ligands and are applied for purification and isolation of immunoglobulin different classes.

SPA binds strongly to human IgG1, mouse IgG3, rabbit IgG, sheep IgG2. But both SPA and PpL interact strongly with human IgG2 and IgG4, mouse IgG2a, IgG2b. SPA is effective ligand for the affinity chromatography due to its high conformational stability, resistance to physicochemical stress and proteases action, stability in the wide pH range (pH 2,0–11,0). In addition, affinity sorbents with the immobilized SPA are applied in the procedure of immunosorption for autoimmune and other diseases therapy.

Protein G is also successfully used as ligand in the affinity chromatography due to presence in its structure multiple copies of two different small domains (COOH-terminal and NH₂-terminal domains). It can independently bind albumin and IgG, immunoglobulins Fc fragments. Protein G binds stronger than SPA

to polyclonal IgGs from cow, horse, and sheep; to human IgG3, mouse IgG1 and rat IgG2a. It is active in wider pH range, in a wider variety of buffers than SPA. So, in some cases protein G can be used for antibody purification instead of SPA, for albumin isolation, for complex antibody mixtures division on several fractions. Affinity sorbents with immobilized protein G or PpL can be used for human IgG3, rat IgG2a purification, because the last have high affinity to these ligands.

PpL binds to kappa light chains of antibodies, that's why it is effectively used as ligand for affinity chromatography. In contrast to proteins A and G, PpL has affinity to wider range of immunoglobulin classes and subclasses (human and mouse IgM, IgG1, IgG3, human IgG2, IgG4, IgA, IgD, rat IgG2c, IgG1, mouse and rat IgG2a, IgG2b). Affinity chromatography with PpL is used for ScFv fragments purification, unlike SPA and protein G ligands, which cannot be used for this purpose.

So due to the different affinity of proteins A, G, L to immunoglobulin divergent classes and subclasses they are used as ligands in the affinity chromatography for diverse purification purposes.

In the area of pharmaceutical biotechnology the proteins A, G, L application is very useful and beneficial, it is fulfilled by means of immunoglobulin-binding proteins properties improving, genetic engineering fusion of DNA sequences encoded PpL and protein G, SPA and protein G. Affinity chromatography on the basis of immobilized proteins A, G, L can be used instead of conventional methods of protein purification as ethanol precipitation and different chromatography methods due to simplicity in usage, opportunity of purification in a single step, high level purity proteins receiving, multiuse at upholding of proper disposal conditions.

REFERENCES

1. Turkovi J. Bioaffinity chromatography. Turkovi J. (Ed.). *Netherlands: Elsevier Science Publishers*. 1993, P. 56–66.
2. Boi C., Dimartino S., Sarti G. C. Performance of a new protein a affinity membrane for the primary recovery of antibodies. *Biotechnol. Progr.* 2008, 24(3), 640–647.
3. Hickstein H., Korten G., Bast R., Barz D., Tempelin R., Schneidewind J. M., Kittner C., Nizze H., Schmidt R. Protein A immunoadsorption (i. a.) in renal transplantation patients with vascular rejection. *Transfus. Sci.* 1998, 19(1), 53–57.
4. Graille M., Stura E. A., Corper A. L., Sutton B. J., Taussig M. J., Charbonnier J.-B., Silverman G. J. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein. A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 2000, 97(10), 5399–5404.

5. Qian J., Khoury G. E., Issa H., Al-Qaoud K., Shihab P., Lowe C. R. A synthetic Protein G adsorbent based on the multi-component Ugi reaction for the purification of mammalian immunoglobulins. *J. Chromatogr. B.* 2012, V. 898, P. 15–23.
6. Pierce Biotechnology. Instructions: Pierce™ Ig Binding Proteins (Protein A, G, A/G and L). Rockford: *Thermo Fisher Sci. Inc.* 2013, P. 1–6.
7. Pat. 6,548,639 B1 USA PCT/SE98/02036. IgG binding protein from *Staphylococcus* and nucleotide sequence encoding this protein. Frykberg L.; Uppsala. N 09/554,080, decl. 12.05.00, publ.15.04.03.
8. Nord K., Hober S., Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification. *J. Chromatogr. B.* 2007, 848(1), 40–47.
9. Svyatenko O. V., Vasylychenko O. A., Vasilchenko K. K. Application of *Staphylococcus* protein A in the affinity chromatography and immunoadsorption. *Problems of Environmental biotechnology*. Available at <http://jml.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/issue/current/showToc> (accessed, February, 2013).
10. Gottschalk U. Process scale purification of antibodies. Gottschalk U. (Ed.). Hoboken: *Wiley & Sons*. 2009, P. 79–90.
11. Sjobring U., Bjorck L., Kastern W. Streptococcal Protein G Gene structure and protein binding properties. *J. Biol. Chem.* 1991, 366(1), 399–405.
12. Nitsche-Schmitz D. P., Johansson H. M., Sastalla I., Reissmann S., Frick I.-M., Chhatwal G. S. Group G Streptococcal IgG Binding Molecules FOG and Protein G Have Different Impacts on Opsonization by C1q. *J. Biol. Chem.* 2007, 282(24), 17530–17536.
13. Saha K., Bender F., Gizeli E. Comparative study of IgG binding to proteins g and a: nonequilibrium kinetic and binding constant determination with the acoustic waveguide device. *Anal. Chem.* 2003, 75(4), 835–842.
14. Karanicolas J., Brooks III C. L. The origins of asymmetry in the folding transition states of protein L and protein G. *Prot. Sci.* 2002, 11(10), 2351–2361.
15. Sadler D. P., Petrik E., Taniguchi Y., Pullen J. R., Kawakami M., Radford S. E., Brockwell D. J. Identification of a Mechanical Rheostat in the Hydrophobic Core of Protein L. *J. Mol. Biol.* 2009, 393(1), 237–248.
16. Kim D. E., Fisher C., Baker D. A Breakdown of Symmetry in the Folding Transition State of Protein L. *J. Mol. Biol.* 2000, 298(5), 971–984.
17. Pierce Antibody purification Available at: www.piercenet.com.
18. Roquea C. A., Taipaa M. A., Lowe C. R. An artificial protein L for the purification of immunoglobulins and Fab fragments by affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1064(2), 157–167.
19. Pierce Biotechnology. Instructions: Pierce® Protein L Agarose. Rockford: *Thermo Fisher Sci. Inc.* 2008, P. 1–4.
20. Snyder H. W., Cochran S. K., Balint J. P., Bertram J. H., Mittelman A., Guthrie T. H., Jones F. R. Experience With Protein A-Immunoadsorption in Treatment-Resistant Adult Immune Thrombocytopenic Purpura. *Blood.* 1992, 79(9), 2237–2245.
21. McMillan R. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Engl. J. Med.* 1981, 304, 1135–1147.
22. Clair St. W. E., Pisetsky D. S., Haynes B. F. Rheumatoid Arthritis. Clair St. W. E. (Ed.). Lippincott: *Williams & Wilkins*. 2004, P. 394–398.
23. Doesch A. O., Mueller S., Konstandin M., Celik S., Frankenstein L., Zugck C., Dengler T. J., Fleming T., Bierhaus A., Katus H. A. Effects of protein A immunoadsorption on methylglyoxal levels in patients with chronic dilated cardiomyopathy and diabetes mellitus. *Appl. Cardiopulm. Pathophysiol.* 2011, V. 15, P. 3–13.
24. Doesch A. O., Mueller S., Konstandin M., Celik S., Kristen A., Frankenstein L., Goeser S., Kaya Z., Zugck C., Dengler T. J., Katus H. A. Effects of Protein A Immunoadsorption in Patients with Chronic Dilated Cardiomyopathy. *J. Clin. Apheresis.* 2010, 25(6), 315–322.
25. Schwenger V., Morath C. Immunoadsorption in nephrology and kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2010, 25(8), 2407–2413.
26. Östervåla E. Protein G Sepharose 4 Fast Flow. Uppsala: *GE Healthcare Bio-Sci. AB*, 2007, P. 2–6.
27. Schubert S., Freitag R. Comparison of ceramic hydroxy- and fluoroapatite versus Protein A/G-based resins in the isolation of a recombinant human antibody from cell culture supernatant. *J. Chromatogr. A.* 2007, 1142(1), 106–113.
28. Gaza-Bulsecu G., Hickman K., Sinicropi-Yao S., Hurkmans K., Chumsae C., Liu H. Effect of the conserved oligosaccharides of recombinant monoclonal antibodies on the separation by protein A and protein G chromatography. *J. Chromatogr.* 2009, 1216(12), 2382–2387.
29. Shields R. L., Lai J., Keck R., O'Connell L. Y., Hong K., Meng Y. G., Weikert S. H., Presta L. G. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγR1 and antibody dependent cellular toxicity. *J. Biol. Chem.* 2002, 277(30), 26733–26740.
30. Davies J., Jiang L., Pan L. Z., LaBarre M. J., Anderson D., Reff M. Expression of GnTIII

- in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol. Bioeng.* 2001, 74(4), 288–294.
31. Gaza-Bulsecu G., Faldu S., Hurkmans K., Chumsae C., Liu H. Effect of methionine oxidation of a recombinant monoclonal antibody on the binding affinity to protein A and protein G. *J. Chromatogr. B.* 2008, 870(1), 55–62.
 32. Schenka J. A., Fettkec J., Lenza C., Albersd K., Mallwitzd F., Gajovic-Eichelmann N., Ehrentreich-Furster E., Kuschf E., Sellrie F. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) might contaminate murine monoclonal antibodies after purification on protein G. *J. Biotechnol.* 2012, 158(1-2), 34–35.
 33. Sennikov S. V., Golikova E. A., Kireev F. D., Lopatnikova J. A. Purification of human immunoglobulin G autoantibodies to tumor necrosis factor using affinity chromatography and magnetic separation. *The Journal of Immunol. Meth.* 2013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2013.01.012>.
 34. Patel S.Y., Ding L., Brown M. R., Lantz L., Gay T., Cohen S., Martyak L. A., Kubak B., Holland S. M. Anti-IFN-gamma autoantibodies in disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *J. Immunol.* 2005, 175(7), 4769–4776.
 35. Puel A., Picard C., Lorrot M., Pons C., Chrabieh M., Lorenzo L., Mamani-Matsuda M., Jouanguy E., Gendrel D., Casanova J. L. Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. *J. Immunol.* 2008, 180(1), 647–654.
 36. Uchida K., Nakata K., Trapnell B. C., Terakawa T., Hamano E., Mikami A., Matsushita I., Seymour J. F., Oh-Eda M., Ishige I., Eishi Y., Kitamura T., Yamada Y., Hanaoka K., Keicho N. High affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Blood.* 2004, 103(3), 1089–1098.
 37. Pierce Protein AG Magnetic Beads Available at: <http://www.piercenet.com/product/protein-ag-magnetic-beads>.
 38. Roque A. C. A., Taipaa M. A., Lowe C. R. An artificial protein L for the purification of immunoglobulins and Fab fragments by affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1064(2), 157–167.
 39. Graille M., Stura E. A., Housden N. G., Beckingham J. A., Bottomley S. P., Beale D., Tausig M. J., Sutton B. J., Gore M. G., Charbonnier J.-B. Complex between Peptostreptococcus magnus protein L and a human antibody reveals structural convergence in the interaction modes of Fab binding proteins. *Structure.* 2001, 9(8), 679–687.
 40. Muzard J., Adi-Bessalem S., Juste M., Larabadijari F., Aubrey N., Billiald P. Grafting of protein L-binding activity onto recombinant antibody fragments. *Anal. Biochem.* 2009, 388(2), 331–338.
 41. Nilson B. H. K., Solomon A., Bjurck L., Ekerstrum B. Protein L from Peptostreptococcus magnus binds to the K light chain variable domain. *J. Biol. Chem.* 1992, 267(4), 2234–2239.
 42. Housden N. G., Harrison S., Housden H. R., Thomas K. A., Beckingham J. A., Roberts S. E., Bottomley S. P., Graille M., Stura E., Gore M. G. Observation and characterization of the interaction between a single immunoglobulin binding domain of protein L and two equivalents of human k-light chains. *J. Biol. Chem.* 2004, 279(10), 9370–9378.
 43. Cossins A. J., Harrison S., Popplewell A. G., Gore M. G. Recombinant production of a VL single domain antibody in *Escherichia coli* and analysis of its interaction with peptostreptococcal protein L. *Prot. Expr. Purif.* 2007, 51(2), 253–259.
 44. Murphy, J. P. Duggleby C. J., M. A. Atkinson, Trowern A. R., Atkinson T., Goward C. R. The functional unit of Peptostreptococcal protein L. *Mol. Microbiol.* 1994, 12(6), 911–920.
 45. Bottomley S. P., Beckingham J. A., Murphy J. P., Atkinson M., Sutton B. J., Gore M. G. Cloning, expression and purification of PpL-1, a kappa-chain binding protein, based upon protein L from Peptostreptococcus magnus. *Bioseparation.* 1995, 5(6), 359–367.
 46. Harrison S. L., Housden N. G., Bottomley S. P., Cossins A. J., Gore M. G. Generation and expression of a minimal hybrid Ig-receptor formed between single domains from proteins L and G. *Prot. Expr. Purif.* 2008, 58(1), 12–22.

ВИКОРИСТАННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНЗВ'ЯЗУВАЛЬНИХ ПРОТЕЇНІВ А, G, L В АФІННІЙ ХРОМАТОГРАФІЇ

О. В. Святенко¹
О. Б. Горбатюк²
О. А. Васильченко¹

¹Національний авіаційний університет,
Київ, Україна

²Інститут генетичної та регенеративної
медицини НАМН України, Київ

E-mail: svyatenko@hotmail.com

Протеїни А, G, L — це нативні та рекомбінантні протеїни бактеріального походження, що зв'язуються з імуноглобулінами ссавців. У біотехнології для виробництва афінних сорбентів використовують переважно рекомбінантні варіанти протеїнів А, G та L. Наведено порівняльну характеристику цих протеїнів, афінних сорбентів на їхній основі, переваги та недоліки застосування як лігандів в афінній хроматографії. Подано аналіз властивостей протеїнів А, G та L. Специфічність зв'язування й афінність цих протеїнів розрізняються залежно від виду тварин та підкласу антитіл. Протеїн А має високу афінність до IgG1, IgG2, IgG4 людини, IgG2a, IgG2b, IgG3 миші, IgG2 кози та вівці, IgG собаки, kota, кролика, морської свинки. Протеїн G міцно зв'язується з IgG людини, миші, корови, кози, вівці та кролика. Протеїн L має здатність до міцного зв'язування з легкими каппа-ланцюгами імуноглобулінів людини, миші, щура та свині. Показано доцільність застосування афінної хроматографії з використанням сорбентів на основі іммобілізованих протеїнів А, G і L для виділення та очищення антитіл різних класів. Вищезазначений метод застосовують як альтернативу традиційним методам очищення протеїнів, таким як іонообмінна, гідрофобних взаємодій, метало-афінна хроматографія, осаження етанолом, завдяки простоті, можливості одностадійного процесу очищення, одержання протеїнів з високим рівнем чистоти, багаторазового використання за дотримання правильних умов зберігання та експлуатації. Афінні сорбенти на основі іммобілізованих протеїнів А, G та L застосовують не лише для очищення антитіл, але й для виділення різних їхніх фракцій із сироватки крові.

Ключові слова: афінна хроматографія, стафілококковий протеїн А, пептострептококковий протеїн L, протеїн G.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИН СВЯЗЫВАЮЩИХ ПРОТЕИНОВ А, G, L В АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

О. В. Святенко¹
О. Б. Горбатюк²
О. А. Васильченко¹

¹Национальный авиационный университет,
Киев, Украина

²Институт генетической и регенеративной
медицины НАМН Украины, Киев

E-mail: svyatenko@hotmail.com

Протеины А, G, L — это нативные и рекомбинантные протеины бактериального происхождения, которые связываются с иммуноглобулинами млекопитающих. В биотехнологии для производства аффинных сорбентов используют преимущественно рекомбинантные варианты протеинов А, G и L. Приведена сравнительная характеристика этих протеинов, аффинных сорбентов на их основе, преимущества и недостатки использования в качестве лигандов в аффинной хроматографии. Представлен анализ свойств протеинов А, G и L. Специфичность связывания и аффинность данных протеинов различаются в зависимости от вида животных и подкласса антител. Протеин А имеет высокую аффинность к IgG1, IgG2, IgG4 человека, IgG2a, IgG2b, IgG3 мыши, IgG2 козы и овцы, IgG собаки, kota, кролика, морской свинки. Протеин G прочно связывается с IgG человека, мыши, коровы, козы, овцы и кролика. Протеин L обладает способностью к прочному связыванию с легкими каппа-цепями иммуноглобулинов человека, мыши, крысы и свиньи. Показана целесообразность применения аффинной хроматографии с использованием сорбентов на основе иммобилизованных протеинов А, G и L для выделения и очистки антител разных классов. Вышеуказанный метод используется как альтернатива традиционным методам очистки протеинов, таким как ионообменная, гидрофобных взаимодействий, метало-аффинная хроматография, осаждение этанолом, благодаря простоте, возможности одностадийного процесса очистки, получения протеинов с высоким уровнем чистоты, многократного применения при соблюдении правильных условий хранения и эксплуатации. Аффинные сорбенты на основе иммобилизованных протеинов А, G и L используют не только для очистки антител, но и для выделения различных их фракций из сыворотки крови.

Ключевые слова: аффинная хроматография, стафилококковый протеин А, пептострептококковый протеин L, протеин G.

УДК 577(112+25+354.9)+57(085.2+086.2)

ОДЕРЖАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ПОХІДНИХ РЕКОМБІНАНТНОГО АНАЛОГА СЕКРЕТОРНОЇ ФОРМИ НВ-EGF ЛЮДИНИ

Н. В. Короткевич

А. Ю. Лабинцев

Д. В. Колибо

С. В. Комісаренко

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

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Отримано 21.11.2013

Гепаринзв'язувальний фактор росту, подібний до епідермального ростового фактора — НВ-EGF (Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor), належить до родини епідермальних ростових факторів і синтезується у вигляді мембранно-заякореного попередника pro-НВ-EGF. Зв'язування секреторної форми фактора sНВ-EGF (soluble НВ-EGF) з рецепторами EGFR і HER-4 приводить до утворення відповідних лігандрецепторних комплексів та активації сигнальних шляхів, які відіграють важливу роль у регулюванні проліферації, диференціації та міграції клітин.

Метою роботи було одержання рекомбінантних флуоресцентних похідних на основі повнорозмірної форми sНВ-EGF людини (mCherry-sНВ-EGF) та вкороченої форми sНВ-EGF Δ 84-106 (mCherry-sНВ-EGF Δ 84-106), яка б не містила гепаринзв'язувальної ділянки.

Показано здатність обох флуоресцентних похідних специфічно зв'язуватись із EGFR-рецептором клітин та рецепторопосередковано інтерналізуватися всередину клітини, а також посилювати проліферацію клітин миші лінії 3T3. При цьому відсутність гепаринзв'язувальної ділянки в структурі mCherry-sНВ-EGF 84-106 суттєво не впливала на його здатність зв'язуватись із рецептором, проте знижувала його мітогенну активність майже у два рази. Одержані флуоресцентні похідні sНВ-EGF можуть бути зручним інструментом для дослідження молекулярних механізмів реалізації біологічної активності sНВ-EGF та ролі гепаринзв'язувальної активності у процесах взаємодії sНВ-EGF з рецептором і подальшого внутрішньоклітинного транспортування лігандрецепторного комплексу.

Ключові слова: гепаринзв'язувальний EGF-подібний фактор росту (НВ-EGF), рецептор епідермального фактора росту.

Гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактора росту — НВ-EGF (від англ.: Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor) належить до родини епідермальних ростових факторів. НВ-EGF має високу афінність до гепарину та гепарансульфатпротеогліканів (ГСПГ) [1]. НВ-EGF синтезується у вигляді мембранно-заякореного попередника — pro-НВ-EGF, який під дією мембранних металопротеїназ може переходити в розчинну форму фактора — sНВ-EGF (від англ.: soluble НВ-EGF). Рецепторами для sНВ-EGF є гомодимери рецепторів родини епідермальних ростових факторів першого (HER-1, EGFR, Human Epidermal Growth Factor Receptor)

і четвертого (HER-4) типу, а також їхні гетеродимери з HER-2 та HER-3. Зв'язування sНВ-EGF з рецептором призводить до утворення лігандрецепторного комплексу sНВ-EGF/EGFR і активації сигнальних шляхів, які відіграють вирішальну роль у регулюванні проліферації, диференціації, міграції та інгібуванні апоптозу клітин, що є вкрай важливим за злоякісних перетворень [2].

Відомо, що утворений після зв'язування sНВ-EGF із рецептором лігандрецепторний комплекс sНВ-EGF/EGFR у подальшому зазнає лізосомальної деградації або «ресайклингу» (receptor recycling), тобто повторної появи рецептора на поверхні плазматичної мембрани [3]. З другого боку, дослідження

останніх років виявили здатність EGF, TGF- α після зв'язування з EGFR стимулювати транслокацію лігандрецепторного комплексу в ядро, де останній за наявності кіназної активності EGFR виконує функції регулятора транскрипції шляхом фосфорилювання низки ядерних протеїнів, що сприяє посиленню проліферативного статусу клітини [4]. Отже, після утворення лігандрецепторного комплексу sHB-EGF/EGFRГ можуть реалізуватись декілька сценаріїв його внутрішньоклітинного транспортування. Так, можлива повна лізосомальна деградація ліганду та рецептора або часткова деградація лише ліганду з наступним «ресайклінгом» рецептора на поверхню клітини. Не менш цікавим є дослідження можливих шляхів транспортування власне лігандрецепторного комплексу до ядра клітини. Наразі немає фактичних відомостей щодо здатності sHB-EGF індукувати ядерну транслокацію EGFR, проте рго-HB-EGF виявляє ядерну локалізацію у клітинах пухлин і тканин, що активно проліферують [5].

Таким чином, створення молекулярних інструментів є важливим для дослідження здатності розчинної форми HB-EGF людини індукувати ядерну транслокацію EGFR та виявлення шляхів транспортування sHB-EGF/EGFR лігандрецепторного комплексу. Оскільки суттєвою відмінністю sHB-EGF від інших ростових факторів є його здатність взаємодіяти із поверхневими ГСПГ, що може впливати на його здатність індукувати ядерну транслокацію EGFR та на внутрішньоклітинне транспортування sHB-EGF/EGFR лігандрецепторного комплексу, для проведення досліджень можна застосувати такий методичний підхід, як створення «вкороченої» форми sHB-EGF, яка була би позбавлена здатності взаємодіяти з гепарином та ГПСГ.

Метою роботи було одержання функціонально активних флуоресцентних похідних на основі повнорозмірної розчинної форми sHB-EGF людини та «вкороченої» sHB-EGF Δ_{84-106} , яка б не містила гепаринзв'язувальної ділянки. Також було проведено дослідження можливості використання їх для вивчення молекулярних механізмів реалізації біологічної активності секреторної форми HB-EGF людини, порівняльного аналізу експресії рецепторів EGFR і HER-4 на поверхні клітин різних типів та походження, а також внутрішньоклітинних шляхів транспортування лігандрецепторного комплексу sHB-EGF/EGFR та участі гепаринзв'язувальної ділянки у цих процесах.

Матеріали і методи

Матеріали. У роботі було використано такі реактиви: культуральне середовище RPMI-1640 з L-глутаміном, фетальна сироватка великої рогатої худоби, пеніцилін, стрептоміцин, амфотерицин В (антимікотик), моноклональні антитіла проти EGFR людини, FITC-кон'юговані вторинні антитіла до Fc-фрагментів атитіл миші, кон'юговані з пероксидазою хрому, вторинні антитіла до Fc-фрагментів атитіл миші (Sigma, США), праймери, імідазол, живильне середовище LB, диметилформамід (DMФА), MgCl₂, Taq-полімераза, вільна від нуклеаз вода, ендонуклеази рестрикції BamHI, XhoI, EcoRI, PstI, ДНК-лігаза T4, лужна фосфатаза, набір для виділення ДНК, ізопропіл- β -D-тіо-галактопіранозид (IPTG), протеїнові маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 180 кДа, ДНК-маркери молекулярної маси в діапазоні від 100 до 10000 п. н. (Fermentas, Литва), Ni-NTI-агароза (Qiagen, ФРН), дезоксирибонуклеотидтрифосфати (dNTPs), нітроцелюлоза Hibond C-Extra (Amersham, США), вектор pET-28a(+) (Novagen, ФРН), вектор pmCherry (ClonTech, США), нітроцелюлоза Hibond C-Extra (Amersham, США).

Обладнання. У роботі застосовували таке обладнання: конфокальний мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, ФРН), протоковий цитофлуориметр Coulter Epics XL (Beckman Coulter, США), ламінарні шафи П рівня біобезпеки (ESCO, Сінгапур), термоциклер AB2720 (Applied Biosystems, США), електропоратор Electroporator 2510 (Eppendorf, ФРН), транслюмінатор Vilber Lourmat TFX-20.LM та пристрій для документації гелів Vilber Lourmat DP-001.FDC (Vilber Lourmat, Франція), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, ФРН), центрифуга MLW T23D (ELMI, ФРН), пристрій для вертикального електрофорезу Mini-Protein II Electrophoretic Cell (Bio-Rad, США), пристрій для горизонтального електрофорезу (Helicon, Росія), електроблотер Hoefer TE77 (Amersham, США).

Штами-продуценти і клітинні лінії. У дослідженнях використано одержаний нами рекомбінантний аналог розчинної форми sHB-EGF людини зі створеного раніше штаму-продуцента *E. coli* [6]. Виділення sHB-EGF та аналітичну експресію протеїнових продуктів проводили як описано у [6]. Клітинні культури ембріональних фібробластів миші 3T3 та епідермоїдної карциноми піхви людини A431 отримали з банку клітинних ліній Інституту експеримен-

тальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Культивування клітин еукаріотів. Клітини культивували за стандартних умов у культуральному середовищі RPMI-1640 з додаванням 5–10% -ї сироватки ембріонів телят за 5% концентрації CO₂.

Створення генетичних конструкцій pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF та pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} на основі експресійного вектора та отримання клонів-продуцентів відповідних флуоресцентних похідних. Для створення вищезазначених генетичних конструкцій як джерело нуклеотидної послідовності, яка кодує мономерний червоний флуоресцентний протеїн mCherry, було обрано плазмідний вектор *pmCherry*. Як джерело нуклеотидної послідовності повнорозмірної (*sHB-EGF*) та вкороченої (*sHB-EGF Δ_{84-106}*) форми sHB-EGF людини обрали раніше одержану нами генетичну конструкцію *pUC-19-sHB-EGF* [7]. Напрацювання нуклеотидних послідовностей, які кодують флуоресцентний протеїн mCherry, повнорозмірну (*sHB-EGF*) та вкорочену (*sHB-EGF Δ_{84-106}*) форми sHB-EGF людини проводили за допомогою ПЛР з використанням специфічних пар праймерів (таблиця). Одержані в результаті проведення ПЛР нуклеотидні послідовності *sHB-EGF* та *sHB-EGF Δ_{84-106}* об'єднали з нуклеотидною послідовністю *mCherry* через сайт рестрикції EcoRI для *sHB-EGF* та PstI для *sHB-EGF Δ_{84-106}* . Для одержання об'єднаних нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* ПЛР проводили із праймерами *Sence mCherry* та *Antisence sHB-EGF*.

Нуклеотидні послідовності *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* об'єднували з нуклеотидною послідовністю експресійного вектора *pET-28a(+)*, обробляючи ендонуклеазами рестрикції BamHI та XhoI з подальшим лігуванням. Під час проведення вищезазначених маніпуляцій з ДНК дотримувались рекомендацій виробника ен-

зимів. За трансформації клітин *E. coli* штаму *DH10B* одержаними генетичними конструкціями *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* застосовували метод електропорації з наступним висіванням на тверде живильне середовище LB (триптон — 10 г/л, дріжджового екстракту — 5 г/л, NaCl — 10 г/л) з 15 г/л агару, яке містило 0,005% канаміцину, що слугував селективним агентом [8]. Колонії клітин перевіряли на наявність нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* у складі вектора за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів, що фланкують ген *mCherry* на 5'-кінці та ген *sHB-EGF/sHB-EGF Δ_{84-106}* — на 3'-кінці. Результатом проведення ПЛР був продукт, який мав у своєму складі нуклеотидні послідовності обох генів. Колонії, що містили вектор *pET-28a(+)* зі вставками нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* , нарощували у рідкому живильному середовищі LB з додаванням селективного агента і застосовували у подальшому для напрацювання отриманих генетичних конструкцій. Для одержання клонів-продуцентів протеїнових продуктів рекомбінантних флуоресцентних похідних sHB-EGF та sHB-EGF Δ_{84-106} проводили електропорацію експресійного штаму *E. coli Rosetta DE3* генетичними конструкціями *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* .

Аналітична експресія протеїнових продуктів флуоресцентних похідних mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} . Клітини клонів-продуцентів *E. coli Rosetta DE3* висівали у рідке живильне середовище LB з додаванням 2% глюкози та інкубували за 37 °C в умовах інтенсивної аерації до досягнення культурою оптичної густини 0,5–0,7 за OD₆₀₀. Для індукції експресії рекомбінантних протеїнів додавали ізопропіл- β -D-тіо-галактопіранозид (IPTG) у концентрації 1мМ. Індукцію експресії проводили протя-

Одержання нуклеотидних послідовностей, які кодують флуоресцентний протеїн mCherry, повнорозмірну (sHB-EGF) та вкорочену (sHB-EGF Δ_{84-106}) форми sHB-EGF людини за допомогою ПЛР з використанням специфічних пар праймерів

<i>Sence sHB-EGF</i>	5'– <u>GGATCC</u> ATGGACTTGC AAGAGGCAGATC –3'
<i>Sence sHB-EGF Δ_{84-106}</i>	5'– CTGCAGTTCTCTCGGCACTGGT –3'
<i>Antisence sHB-EGF</i>	5'– CTGAGTCAGAGGCTCAGCCCATG –3'
<i>Sence mCherry</i>	5'– <u>GAAGGATCC</u> ACCATGGTGAGCAAGGG –3'
<i>Antisence mCherry</i>	5'– <u>CCAGACGTCTTTGT</u> ACAGCTCGTCCATGCC –3'

Примітка: * — підкреслено сайти щеплення ендонуклеаз рестрикції.

гом 3 год при 30 °С. Для проведення аналізу експресії протеїнів готували розчинну й нерозчинну фракції з подальшим електрофорезом у ПААГ. Після напрацювання 2 мл клітинної біомаси осаджували центрифугуванням при 10 000 g. Осад ресуспендували у забуференому фосфатному розчині (ЗФР), концентруючи його в 20 разів, і обробляли ультразвуковим дезінтегратором. Залишки клітин відокремлювали центрифугуванням при 10 000 g. Супернатант містив розчинну фракцію протеїнів *E. coli*, зокрема й цільового протеїну, а осад — нерозчинну. Клітинний осад промивали 1% Triton-X100 та ресуспендували у ЗФР. Аналіз протеїнових фракцій здійснювали за допомогою електрофорезу в 10% ДСН-ПААГ з використанням трис-НСІ буферної системи та додаванням трицину [9]. Застосовували маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 180 кДа. Проби для електрофорезу готували з додаванням буфера для зразків (40 мг ДСН, 0,48 г сечовини, 50 мкл β-меркаптоетанолу, 1–2 мкл бромфенолового синього на 1 мл буферного розчину), які попередньо прогрівали за температури 70–75 °С протягом 20–30 хв.

Виділення рекомбінантних протеїнів sHB-EGF, mCherry-sHB-EGF і mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} та їх очищення. Нарощення клітинної біомаси та індукцію експресії проводили за описаною вище методикою. Після цього клітинну біомасу осаджували центрифугуванням при 10 000 g, осад ресуспендували в 5 мл буферного розчину, що містив 0,3 М NaCl, 20 мМ Tris-НСІ, 1 мМ DTT та 6 М сечовини, рН 8,0. Отриману клітинну біомасу обробляли ультразвуковим дезінтегратором. Залишки клітин відокремлювали центрифугуванням при 13 000 об/хв протягом 25 хв. Супернатант наносили на попередньо врівноважену колонку з Ni-NTI-агарозою. Для виконання процедури рефолдингу колонку із сорбованим протеїном промивали буферним розчином того самого складу, але з градієнтом сечовини (8, 6, 4, 2 та 1 М), додаючи 10 мМ імідазолу. Елюцію протеїну проводили 400 мМ імідазолом. З метою створення умов для формування дисульфідних зв'язків до елюйованого протеїну додавали відновлений та окиснений глутатіон у концентрації 6 мМ і 1,2 мМ відповідно. Для подальшого використання протеїн діалізували проти ЗФР (0,8% NaCl, 0,25% KCl, 0,144% Na₂HPO₄ та 0,024% KH₂PO₄, рН 7,2). Аналіз протеїнових фракцій у 10% ДСН-ПААГ здійснювали за описаною вище методикою.

Одержання імунної сироватки мишей проти sHB-EGF людини. Імунізацію мишей лінії Balb/c проводили одержаним раніше рекомбінантним аналогом sHB-EGF людини з використанням повного і неповного ад'юванту Фрейнда [10].

Вестерн-блот-аналіз. Перенесення протеїнів із ПААГ на нітроцелюлозу здійснювали за допомогою електроблотера. Нітроцелюлозну мембрану попередньо витримували у буферному розчині для перенесення (25 мМ Tris, 0,1% ДСН, 20% метилового спирту, 192 мМ гліцину) протягом кількох хвилин. Після перенесення мембрану витримували в 1%-му розчині знежиреного молока в ЗФР за температури 37 °С упродовж 1 год. Після промивання нітроцелюлозну мембрану витримували за тих самих умов у розчині поліклональної сироватки миші в розведенні 1:400 у твін-фосфатному буфері (ТФБ), що являв собою ЗФР з додаванням 0,04% Tween 20. Як вторинні антитіла використовували моноклональні антитіла проти Fc-фрагментів імуноглобулінів миші в розведенні 1:10 000. Проявлення нітроцелюлозної мембрани здійснювали протягом кількох хвилин у розчині для забарвлення, що містив 0,07% діамінобензидинтетрагідрохлориду (ДАБ) та 0,035% H₂O₂ в ЗФР.

Конфокальна мікроскопія. Клітини вирощували до досягнення 70–90% конфлюентного стану, потім пересівали на попередньо знежирені покривні скельця та культивували ще 24 год. Перед забарвленням клітини промивали розчином RPMI-1640. Зразки забарвлювали у RPMI-1640, додаючи відповідні флуоресцентні похідні (mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}) у концентрації 10 мкг/мл або моноклональні антитіла проти рецептора EGFR (1:2 000), попередньо інкубовані з FITC-міченими антитілами кози проти Fc-фрагментів імуноглобулінів миші (1:1 000), після цього інкубували при 37 °С протягом 15 хв. Перед фіксацією зразки двічі промивали ЗФР. Фіксацію зразків проводили 5%-м параформальдегідом у натрійфосфатному буфері. Після цього зразки промивали ЗФР та дистильованою водою. На кожен препарат клітин наносили 25 мкл DABCO-PVA для подальшого збереження та аналізу. До проведення конфокальної мікроскопії зразки зберігали в темряві при 4 °С. Колокалізацію флуоресцентних міток FITC (зелений канал) та mCherry (червоний канал) визначали із застосуванням програмного забезпечення Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>).

МТТ-тест. Клітини ЗТЗ нарощували до конфлуентного стану в 96-лункових планшетах. Перед внесенням рекомбінантних флуоресцентних похідних клітини промивали ЗФР та замінювали на безсироваткове середовище із додаванням рекомбінантних протеїнів у концентрації 1 мкг/мл та культивували за стандартних умов упродовж відповідних проміжків часу. Далі культуральне середовище замінювали на нове, додавали МТТ-реагент [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] у відповідній до рекомендацій виробника концентрації та інкубували протягом 4 год за стандартних умов. Після цього середовище обережно відбирали, додавали буфер для лізису (90% -й диметилсульфоксид — ДМСО, 0,1% додецилсульфат натрію — ДСН) та інкубували ще 5 хв за умов інтенсивного струшування. Оптичне поглинання розчину вимірювали за довжини хвиль 545 (тест) і 630 нм (контроль).

Результати та обговорення

Створення генетичних конструкцій *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* і *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* та одержання клонів-продуцентів відповідних флуоресцентних похідних. Для створення генетичних конструкцій *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* було одержано ПЛР-продукти об'єднаних нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* і *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* з використанням відповідних пар праймерів (рис. 1, А). Після цього нуклеотидні послідовності *mCherry-sHB-EGF* і *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* об'єднували за сайтами рестрикції *Bam*HI та *Xho*I із послідовністю експресійного вектора *pET-*

28a(+). У результаті було одержано генетичні конструкції *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* для подальшої трансформації клітин *E. coli* штаму DH10B (рис. 1, Б).

Експресія, виділення та очищення рекомбінантних протеїнів *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* . Після трансформування клітин *E. coli* штаму *Rosetta (DE3)* генетичними конструкціями *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF* та *pET-28a(+)-mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* серед трансформантів було відібрано окремі клони для проведення експресії відповідних рекомбінантних протеїнів та подальшого вестерн-блот-аналізу з метою підтвердження наявності в лізаті бактеріальних клітин цільового продукту. Результати проведення вестерн-блот-аналізу з використанням поліклональної сироватки мишей, імунізованих *sHB-EGF* людини, підтвердили наявність у складі бактеріальних клітин-продуцентів цільового протеїнового продукту (рис. 2).

За даними літератури, *sHB-EGF* має аномальну електрофоретичну рухливість, що пов'язано з наявністю багатой на лізин гепаринз'язувальної ділянки у структурі *sHB-EGF*, яка за нейтральних значень рН несе позитивний заряд [11]. Рекомбінантний аналог *sHB-EGF* людини внаслідок аномальної електрофоретичної рухливості мав на 4,5 кДа «вищу молекулярну масу», за даними електрофорезу та імуноблотингу, що становила ≈ 18 кДа замість теоретично розрахованої 13,5 кДа. Аномальну електрофоретичну рухливість також мали флуоресцентні похідні: 55 кДа для *mCherry-sHB-EGF* замість теоретично розрахованої 50 кДа та 45 кДа для *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* , замість 40 кДа.

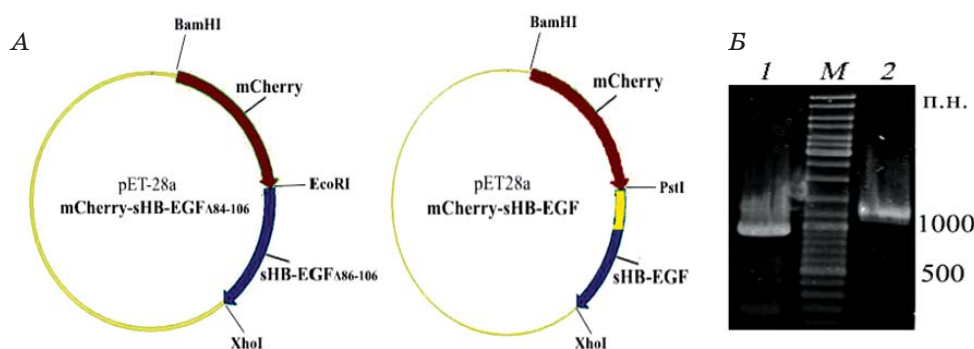


Рис. 1. А — схематичне зображення генетичних конструкцій на основі бактерійного експресійного вектора *pET-28a(+)*, що кодують рекомбінантні флуоресцентні похідні *sHB-EGF* людини: *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* ; Б — електрофореграма ПЛР-продуктів об'єднаних нуклеотидних послідовностей *mCherry-sHB-EGF* та *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* : 1 — *mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}* ; М — маркери довжини нуклеотидних фрагментів; 2 — *mCherry-sHB-EGF*

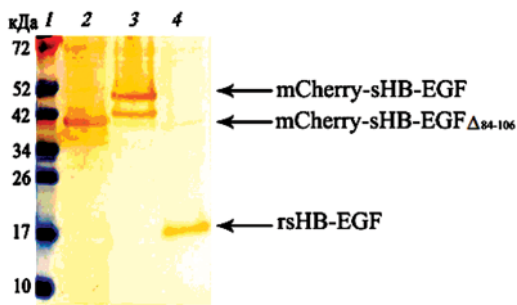


Рис. 2. Вестерн-блот-аналіз лізатів бактеріальних клітин клонів-продуцентів рекомбінантних флуоресцентних похідних mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} (детекція поліклональною сироваткою миші, імунізованою рекомбінантним sHB-EGF): 1 — маркери молекулярної маси; 2 — mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} ; 3 — mCherry-sHB-EGF; 4 — рекомбінантний аналог sHB-EGF людини

Для подальшого використання рекомбінантні протеїни виділяли з розчинної фракції за допомогою афінного сорбенту Ni-NTI-агарози. Дисульфідні зв'язки у складі EGF-подібного домену молекул sHB-EGF та sHB-EGF Δ_{84-106} відновлювали з використанням суміші окисненого і відновленого глутатіону, яку додавали до препарату протеїну після попереднього етапу виділення. Чистоту отриманого препарату перевіряли електрофоретично.

Вихід розчинних рекомбінантних протеїнів mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} становив 2,1 мг і 3,5 мг відповідно у перерахунку на 1 л бактеріальної культури.

Дослідження біологічної активності одержаних флуоресцентних похідних рекомбінантного аналога sHB-EGF людини. Флуоресцентні похідні можна застосовувати для дослідження здатності секреторної форми HB-EGF людини індукувати процеси ядерної транслокації рецептора EGFR, процесів внутрішньоклітинного транспортування лігандрецепторного комплексу sHB-EGF/EGFR та ролі гепаринзв'язувальної ділянки в механізмах реалізації біологічної активності sHB-EGF. З огляду на це перевіряли біологічну активність mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} , зокрема їхню здатність специфічно зв'язуватись із рецептором EGFR на поверхні клітин A431. Клітини епідермоїдної карциноми людини A431 експресують рецептор EGFR у великій кількості і є класичною моделлю для дослідження біологічної дії ростових факторів, що слугують лігандами для EGFR, та механізмів їх участі у процесах канцерогенезу. Для підтвердження здатності флуоресцентних похідних mCherry-sHB-EGF та mCherry-

sHB-EGF Δ_{84-106} специфічно взаємодіяти із рецептором EGFR було використано моноклональні антитіла миші проти позаклітинного домену EGFR. Слід зазначити, що згідно з інструкцією виробника зв'язування антитіл із позаклітинним доменом EGFR не перешкоджає прояву його здатності зв'язувати позаклітинні ліганди. Вторинними антитілами слугували мічені FITC антитіла проти Fc-фрагментів імуноглобулінів миші. Отже, є можливість візуалізувати лігандрецепторний комплекс mCherry-sHB-EGF/EGFR або mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} /EGFR, який утворився після зв'язування флуоресцентних похідних із рецептором. Після додавання до культурального середовища антитіл та флуоресцентних похідних sHB-EGF клітини інкубували протягом 15 хв при 37 °C за 5% -ї концентрації CO₂ в атмосфері з метою створення сприятливих умов для життєдіяльності. Препарати для конфокальної мікроскопії готували як описано в розділі «Матеріали і методи». Аналіз препаратів дав змогу виявити колокалізацію двох міток: зеленої (FITC) мітки рецептора та червоної (mCherry) — ліганда у внутрішньоклітинних везикулярних структурах (жовтий колір, утворений колокалізацією двох міток), що свідчить про здатність mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} специфічно зв'язуватись із рецептором EGFR (рис. 3). Як показують конфокальні знімки, утворений лігандрецепторний комплекс мав здатність інтерналізуватись у клітину. Таким чином, результати конфокальної мікроскопії вказують на наявність біологічної активності отриманих рекомбінантних флуоресцентних похідних, зокрема їхню здатність специфічно зв'язуватись із рецептором EGFR та індукувати його подальшу інтерналізацію в клітину. Слід зазначити, що відсутність гепаринзв'язувального домену в складі mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} не впливала на здатність флуоресцентного похідного взаємодіяти з рецептором EGFR.

Відомо, що sHB-EGF є активним мітогеном та хемоатрактантом для багатьох типів клітин. Тому наступним етапом роботи було дослідження здатності одержаних рекомбінантних флуоресцентних похідних стимулювати проліферацію клітин. Із цією метою нами було проведено дослідження з використанням МТТ-тесту і клітин ЗТЗ. За культивування клітин до ростового середовища додавали рекомбінантні флуоресцентні похідні mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} у концентрації 1 мкг/мл відповідно. Результати МТТ-тесту свід-

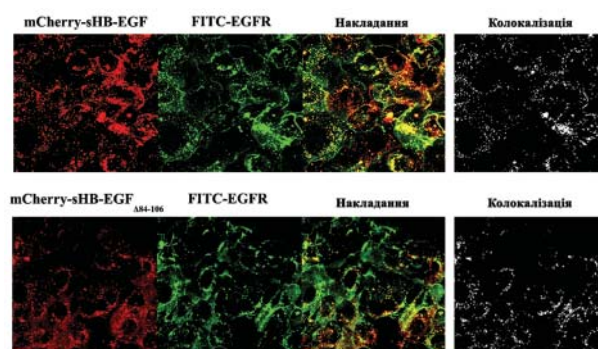


Рис. 3. Конфокальні знімки препаратів клітин A431, забарвлених флуоресцентними похідними sHB-EGF:

mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} — червоний канал; FITC-EGFR — зелений канал; накладання — об'єднане зображення по зеленому та червоному каналах; колокалізація — накладання флуоресцентних міток по зеленому та червоному каналах (білий колір)

чать про мітогенну активність флуоресцентних похідних (рис. 4). Проте флуоресцентне похідне mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} , імовірно, має значно меншу мітогенну активність, ніж mCherry-sHB-EGF. Можна припустити, що відсутність гепаринзв'язувальної ділянки у складі sHB-EGF призводить до зниження його мітогенного потенціалу. На підставі даних МТТ-тесту можна зробити висновок про можливість використання рекомбінантних флуоресцентних похідних

REFERENCES

- Higashiyama S., Abraham J. A., Miller J., Fiddes J. C., Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*. 1991, 251(251), 936–939.
- Higashiyama S., Nanba D. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1751(1), 110–117.
- Roepstorff K., Grandal M. V., Henriksen L., Knudsen S. L., Lerdrup M., Grøvdal L., Willumsen B. M., van Deurs B. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic*. 2009, 10(8), 1115–1127.
- Lin S.Y., Makino K., Xia W., Matin A., Wen Y., Kwong K. Y., Bourguignon L., Hung M. C. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*. 2001, 3(9), 802–808.
- Kim J., Adam R. M., Freeman M. R. Trafficking of nuclear heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor into an epidermal growth factor receptor-dependent autocrine loop in response to oxidative stress. *Cancer Res*. 2005, 65(18), 8242–8249.
- Korotkevych N. V., Kolybo D. V., Labyntsev A. Ju., Romaniuk S. I., Komisarenko S. V.

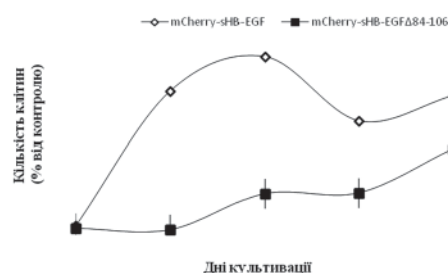


Рис. 4. Залежність кількості клітин від часу культивування з рекомбінантними флуоресцентними похідними за результатами МТТ-тесту з використанням клітин 3Т3

mCherry-sHB-EGF і mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} в експериментах, спрямованих на дослідження механізмів реалізації біологічної активності sHB-EGF людини та ролі гепаринзв'язувальної ділянки у цих процесах.

Таким чином, у результаті проведеної роботи створено біологічно активні рекомбінантні флуоресцентні похідні секреторної форми sHB-EGF людини mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} і показано можливість їх використання у дослідженнях молекулярних механізмів реалізації біологічної активності sHB-EGF і ролі гепаринзв'язувальної активності у процесах зв'язування sHB-EGF з рецептором та внутрішньоклітинного транспортування лігандрецепторного комплексу.

Obtaining of recombinant human heparin-binding EGF-like growth factor and perspectives of its application in biotechnology. *Biotechnologiya*. 2010, 5(4), 44–54. (In Ukrainian).

- Korotkevych N. V., Labyntsev A. Ju., Kaberniuk A. A., Oliinyk O. S., Romaniuk S. I., Kolybo D. V., Komisarenko S. V. Cytotoxicity of the B subunit of diphtheria toxin to human histiocytic lymphoma U937. *Ukr. Biokhim. Zh.* 2009, 81(4), 69–80. (In Ukrainian).
- Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16(13), 6127–6145.
- Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987, 166(2), 368–379.
- Harlow E., Lane D. Antibodies: a laboratory manual. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988, 726 p.
- Higashiyama S., Lau K. E., Besner G. A., Abraham J., Klagsbrun M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J. Biol. Chem.* 1992, 267(9), 6205–6212.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА
СЕКРЕТОРНОЙ ФОРМЫ HB-EGF
ЧЕЛОВЕКА**

*Н. В. Короткевич
А. Ю. Лабынцев
Д. В. Колибо
С. В. Комисаренко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Гепаринсвязывающий фактор роста, подобный эпидермальному ростовому фактору — HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor), относится к семейству эпидермальных ростовых факторов и синтезируется в виде мембранно-заякоренного предшественника pro-HB-EGF. Связывание секреторной формы фактора — sHB-EGF (soluble HB-EGF) с рецепторами EGFR и HER-4 приводит к образованию соответствующих лигандрецепторных комплексов и активации сигнальных путей, которые играют важную роль в регулировании пролиферации, дифференциации и миграции клеток.

Целью работы было получение рекомбинантных флуоресцентных производных на основе полноразмерной секреторной формы sHB-EGF человека (mCherry-sHB-EGF) и укороченной формы sHB-EGF Δ_{84-106} (mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106}), которая не содержала бы гепаринсвязывающей области.

Показана способность обоих флуоресцентных производных специфически связываться с EGFR-рецептором клеток и рецепторопосредованно интернализироваться внутрь клетки, а также усиливать пролиферацию клеток мыши линии 3T3. При этом отсутствие гепаринсвязывающего участка в структуре mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} существенно не влияло на его способность связываться с рецептором, однако снижало его митогенную активность почти в два раза. Полученные флуоресцентные производные sHB-EGF могут быть удобным инструментом для исследования молекулярных механизмов реализации биологической активности sHB-EGF и роли гепаринсвязывающей активности в процессах взаимодействия sHB-EGF с рецептором, а также дальнейшего внутриклеточного транспортирования лигандрецепторного комплекса.

Ключевые слова: гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), рецептор эпидермального фактора роста.

**OBTAINING AND CHARACTERIZATION
OF RECOMBINANT FLUORESCENT
DERIVATIVES OF SOLUBLE HUMAN
HB-EGF**

*N. V. Korotkevich
A. Ju. Labyntsev
D. V. Kolibo
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) belongs to the epidermal growth factor receptor family and is synthesized as a transmembrane precursor proHB-EGF. Binding of sHB-EGF with receptors EGFR and HER-4 results in formation of ligand-receptor complexes and activation of signaling pathways and thereby promotes survival, proliferation and migration of cells.

The aim of the study was to obtain the recombinant fluorescent derivatives of full-length soluble sHB-EGF — mCherry-sHB-EGF and truncated sHB-EGF Δ_{84-106} (without heparin-binding domain) — mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} . The recombinant fluorescent derivatives may be used to investigate the sHB-EGF binding with receptors EGFR and HER-4, intracellular transportation of ligand-receptor complexes and the role of sHB-EGF heparin-binding domain in sHB-EGF biological activity.

It was shown the ability of both fluorescent derivatives specifically bind to EGFR, to internalize in receptor-mediated pathway and to enhance the proliferation of 3T3 cells. Absence of heparin-binding domain in structure of mCherry-sHB-EGF Δ_{84-106} significantly did not effect on its ability to bind with receptor, but decreased twice its mitogenic activity. Thus, obtained fluorescent derivatives of sHB-EGF could be a convenient tool for investigation of molecular mechanisms of sHB-EGF biological activity and role of heparin-binding domain in these processes.

Key words: heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), epidermal growth factor receptor.

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ, ДНК-ИНТЕРКАЛЯТОРОВ, C₆₀-ФУЛЛЕРЕНА И КОФЕИНА НА КЛЕТКИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

Г. Б. Скамрова¹

Ю. И. Прилуцкий²

М. П. Евстигнеев^{1,3}

¹Севастопольский национальный технический университет, Украина

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина

³Белгородский государственный университет, Россия

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

Получено 03.02.2014

В последние десятилетия значительно возросло количество физических и химических биологически активных повреждающих факторов. Пути нейтрализации их действия исследованы недостаточно. В работе использованы методы визуальной оценки грануляции хроматина и электроотрицательности ядер клеток буккального эпителия человека с целью изучения комбинированного влияния низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона и ДНК-интеркаляторов: антибиотика доксорубицина, мутагенов бромистого этидия и профлавина, а также кофеина и C₆₀-фуллерепа, непосредственно не взаимодействующих с ДНК. При действии электромагнитного излучения с исследуемыми ДНК-связывающимися веществами обнаружен синергетический эффект, заключающийся в уменьшении клеточного ответа, обусловленного электромагнитным излучением и препаратами. Во время облучения клеток в присутствии C₆₀-фуллерепа или кофеина наблюдали протекторный эффект этих веществ относительно электромагнитного излучения. Полученные результаты являются основанием для использования C₆₀-фуллерепа и кофеина в качестве ДНК-протекторов при действии электромагнитного излучения.

Ключевые слова: ДНК-интеркаляторы, C₆₀-фуллерен, электромагнитное излучение, буккальный эпителий человека.

Изучение совместного действия электромагнитного излучения (ЭМИ) микроволнового диапазона и биологически активных соединений (БАС) на живой организм представляет большой интерес, обусловленный перспективой использования комбинированного воздействия лекарственных препаратов и ЭМИ в терапии различных заболеваний. Существуют основания полагать, что первичной мишенью действия слабого ЭМИ микроволнового диапазона на клеточном уровне является ядерный хроматин [1, 2]. Взаимодействие ЭМИ с хроматином может изменять степень электростатических взаимодействий ДНК-протеин и вызывать изменение функционального состояния клеток, проявляющееся в разнообразных клеточных эффектах, регистрируемых различными методами [3–6]. Учитывая это, особое внима-

ние следует уделить комбинированному взаимодействию слабого ЭМИ микроволнового диапазона с соединениями, механизм действия которых обусловлен нековалентным комплексобразованием с ядерной ДНК. Наиболее распространенной группой БАС, действующих по этому механизму, являются ароматические ДНК-интеркаляторы [7, 8]. В связи с этим в работе изучены типичные и ДНК-связывающиеся БАС: противоопухолевый антибиотик доксорубин (DOX) и ароматические мутагены профлавин (PF) и бромистый этидий (EB).

Вклад ЭМИ в повреждение ДНК, индуцированного DOX, и кинетику ее восстановления был рассмотрен в работе [9]. Результаты исследования *in vitro* на В-лимфобластоидных клетках человека показали, что ЭМИ на частоте 1,8 ГГц непосредственно не вызыва-

ло повреждения ДНК, но могло в некоторой степени влиять на процессы репарации ее повреждений, вызванных DOX. Однако при исследовании возможного взаимодействия ЭМИ миллиметрового диапазона с DOX в работе [10] подобного эффекта обнаружено не было. Также не выявлен синергизм во взаимном действии микроволнового излучения (2,45 ГГц) и ароматического мутагена RF в серии экспериментов на лейкемических клетках мышей [11].

В работе [12] исследован комбинированный эффект EB (1 мг/мл) и микроволнового излучения круговой поляризации на хроматин клеточных ядер. При облучении без EB левополяризованное излучение приводило к изменениям в конформации хроматина *E. coli*, в то время как правополяризованное излучение не вызывало никаких видимых изменений. Так, при инкубации клеток с EB правополяризованное ЭМИ становилось более эффективным, чем левополяризованное.

Существующие немногочисленные данные о комбинированном взаимодействии БАС и ЭМИ противоречивы. Наблюдаемый эффект может зависеть как от выбора объекта исследования, так и от параметров облучения ЭМИ, что затрудняет выявление механизма взаимодействия.

В работе исследовано комбинированное действие слабого ЭМИ миллиметрового диапазона и препаратов, связывающихся с ДНК — DOX, EB и RF, на клетки буккального эпителия человека. Размер этих клеток позволяет наблюдать структурные изменения хроматина в ядре и состояние мембраны при помощи оптического микроскопа с минимальным воздействием на исследуемую систему и хорошей воспроизводимостью результатов [6, 13]. В качестве тест-системы изучены соединения, не оказывающие действия непосредственно на ДНК, — кофеин (CAF) и C₆₀-фуллерен.

Материалы и методы

Эпителиальные клетки. Клетки буккального эпителия были собраны у трех взрослых доноров тупым стерильным шпателем и осаждались центрифугированием при 3000 об/мин в течение 2 мин в фосфатном буфере следующего состава: 3,03 мМ фосфатный буфер, pH 7,0, с добавлением 2,89 мМ хлорида кальция. Затем надосадок удаляли и доводили объем фосфатным буфером до 1 мл. Промывку проводили 3 раза, после

чего суспензию клеток разбавляли буферным раствором и распределяли по пробиркам по $5 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ клеток в каждую. В течение всего времени эксперимента у клеток не наблюдалось видимых изменений структуры ядра и клеточной мембраны, а также показателей электроотрицательности клеточных ядер и состояния хроматина. Забор клеток проводили у двух доноров женского пола: доноры А — 24 года и В — 20 лет, и одного донора мужского пола: донор С — 21 год. Все доноры были практически здоровы, не курящие.

Оценка количества гранул гетерохроматина (КГГ). Исследования процесса гетерохроматинизации дает возможность оценить изменения функциональной активности клеточного ядра [14]. Оценку КГГ осуществляли с помощью метода, подробно описанного в работе [6]. Облученные клетки и контрольный образец были окрашены 2%-м раствором орсеина в 45%-й уксусной кислоте. Ядра клеток визуально изучали под микроскопом MICROmed XS-3330 при увеличении 1000. В каждом образце КГГ было определено для 30 случайно выбранных клеток [6].

Оценку электроотрицательности ядер (ЭОЯ, %) проводили по методу, предложенному в [15]. Клетки буккального эпителия помещали в камеру для микроэлектрофореза между двумя покровными стеклами. Камеру заполняли фосфатным буфером и помещали под микроскоп. Исследования выполняли при напряженности поля 10–12 В/см, электрическом токе 0,2–0,4 мА и фиксированной частоте 0,1 Гц. На протяжении эксперимента (на пиках напряженности) производили снимки образца. Ядра в клетках буккального эпителия в данных условиях эксперимента либо проявляли отрицательный заряд, либо не смещались в электрическом поле, т. е. не имели заряда. Показателем ЭОЯ служил процент клеточных ядер, смещающихся в сторону анода, т. е. несущих отрицательный заряд. Для каждого образца проводили 3 измерения ЭОЯ по 100 ядер в каждом, а затем рассчитывали его среднюю величину.

Вещества. Раствор доксорубицина (Doxorubicin Teva, Нидерланды) при концентрации 2 мг/мл ($3,448 \cdot 10^{-3}$ моль/л) получали путем растворения точной навески (10 мг) вещества в 5 мл буферного раствора. Затем 0,058 мл этого раствора разбавили 0,942 мл фосфатного буферного раствора до концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Раствор бромистого этидия (Sigma, США) концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л был получен растворением 1,97 мг навески вещества в 5 мл фосфатного буфера. Далее 0,4 мл исходного раствора разбавили 0,6 мл буфера до концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Раствор профлавина (Sigma, США) концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л получили, растворив 1,05 мг навески вещества в 5 мл фосфатного буфера. Затем 0,4 мл исходного раствора разбавляли 0,6 мл буфера до концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Водный раствор немодифицированного C_{60} -фуллерена был приготовлен согласно методике [16, 17]. Насыщенный раствор C_{60} -фуллерена (чистота 99,5%) в толуоле смешивали с таким же количеством дистиллированной воды. На полученную двухфазную систему воздействовали ультразвуком до полного испарения толуола. Далее раствор фильтровали для удаления нерастворенного C_{60} -фуллерена. Таким образом получили стабильный коллоидный водный раствор C_{60} -фуллерена при концентрации 0,1 мг/мл ($1,39 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Раствор кофеина (Sigma, США) концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л был получен путем растворения 9,71 мг навески вещества в 5 мл буфера.

Метод определения токсичности БАС. К 0,5 мл клеточной суспензии добавляли 0,5 мл раствора препаратов в фосфатном буфере. В таблице представлена концентрация используемых растворов.

Концентрация растворов биологически активных соединений

Препарат	Концентрация, моль/л
Доксорубин (DOX)	$5 \cdot 10^{-6}$
Бромистый этидий (EB)	$1 \cdot 10^{-5}$
Профлавин (PF)	$1 \cdot 10^{-5}$
C_{60} -фуллерен	$6,65 \cdot 10^{-5}$
Кофеин (CAF)	$4,75 \cdot 10^{-3}$

Клетки буккального эпителия человека инкубировали с растворами БАС в фосфатном буфере в течение 10 мин при комнатной температуре. Для каждого вещества были приготовлены 2 образца, один из которых подвергался облучению в процессе воздействия БАС.

Источник излучения. Клетки облучали ЭМИ на частоте беспроводной связи WiMAX 3,7 ГГц. Беспроводная сеть WiMAX предоставляет связь на больших расстояниях и в

настоящее время активно развивается. Для генерирования ЭМИ с частотой 3,7 ГГц применяли установку, схема и принцип действия которой подробно описаны в работе [18]. Образец облучали в течение 10 мин в пробирках Eppendorf (1,5 мл) при значении плотности потока мощности, равной 40 мкВт/см². Ранее на клетках буккального эпителия было показано, что при этой мощности и времени экспозиции наблюдается статистически значимое увеличение КГГ относительно контрольного необлученного образца [18].

Статистическая обработка данных. Расчеты средних значений и стандартных ошибок среднего производили в программе Microsoft Office Excel и SigmaPlot. Достоверность различий между средними значениями полученных показателей и контролем оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Влияние ЭМИ миллиметрового диапазона на хроматин и ядра клеток буккального эпителия человека. Ранее в рамках изучения влияния ЭМИ с различными характеристиками на клетки буккального эпителия человека был опубликован ряд исследований, результаты которых позволили выявить ответ клеток на ЭМИ [6, 18–23]. В частности, обнаружено, что микроволновое излучение может вызывать переходы из эухроматина в гетерохроматин, т. е. приводить к увеличению КГГ в ядрах клеток человека [6, 18, 21–23]. Кроме того, установлено, что это явление связано с видом поляризации электромагнитной волны [6] и зависит от мощности [18] и времени экспозиции [19]. Выявлено также, что действие электрического поля на хроматин выражено сильнее, чем магнитного [20]. По результатам исследований выдвинута гипотеза о том, что изменения структуры хроматина (процесс гетерохроматинизации) могут быть связаны с электростатическими индуцированными ЭМИ взаимодействиями между ДНК и протеинами в ядре. Следует также упомянуть об электрокинетических свойствах клеточных ядер, тесно связанных с процессами регуляции активности клеток. Изменение ЭОЯ клеток буккального эпителия человека под воздействием ЭМИ выявлено в работах [22–25]. Также было продемонстрировано, что слабое ЭМИ миллиметрового диапазона приводило к увеличению проницаемости мембран клеток буккального эпителия для витальных

красителей индигокармина и трипанового синего [23, 24, 26, 27]. Однако изменения проницаемости клеточных мембран выражено менее интенсивно, чем КГГ, что может указывать на большую чувствительность хроматина к ЭМИ в миллиметровом диапазоне.

В работе в качестве предварительного этапа изучения комбинированного действия ЭМИ и БАС исследовано влияние ЭМИ на частоте 3,7 ГГц при 10-минутной экспозиции на грануляцию хроматина и изменение ЭОЯ клеток буккального эпителия человека. Результаты представлены на рис. 1. Из них следует, что для всех доноров при воздействии ЭМИ наблюдается значительное увеличение КГГ относительно контроля. При этом у донора А обнаружена наибольшая чувствительность к действию ЭМИ. В то же время для всех доноров при данных условиях облучения наблюдалось снижение величины ЭОЯ. Подобная корреляция между электроотрицательностью клеточного ядра и состоянием хроматина была установлена ранее [28] и указывает на единообразный характер проявления механизма действия ЭМИ на функциональное состояние ядра. Выше было упомянуто, что и грануляция гетерохроматина, и уменьшение показателя ЭОЯ свидетельствуют об уменьшении активности клеток. Следует отметить, что показатель ЭОЯ, согласно результатам данной работы, оказался менее чувствительным к воздействию ЭМИ, чем КГГ.

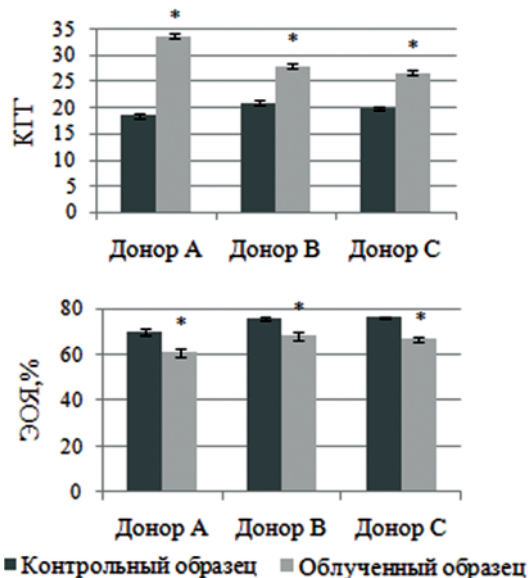


Рис. 1. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека под воздействием электромагнитного излучения.

Здесь и далее приведены значения $M \pm m$;
* — $P < 0,05$ по сравнению с контролем

Таким образом, на клетках буккального эпителия человека наблюдается выраженный эффект воздействия низкоинтенсивного ЭМИ на хроматин и электрокинетические свойства клеточных ядер, хорошо согласующийся с результатами предыдущих исследований, описанных выше, и косвенно подтверждающий гипотезу, что клеточный хроматин и, в частности, ДНК могут играть роль первичных рецепторов ЭМИ миллиметрового диапазона.

Влияние БАС на хроматин и ядра клеток буккального эпителия человека. Результаты эксперимента по воздействию антибиотика DOX и мутагенов EB и PF на хроматин и ЭОЯ буккального эпителия человека представлены на рис. 2. Эффект исследуемых БАС является подобным для всех доноров и веществ и проявляется в увеличении КГГ относительно контроля. Так же, как и для ЭМИ, наблюдается уменьшение показателя ЭОЯ, коррелирующее с КГГ, однако в некоторых случаях изменения ЭОЯ, согласно t-тесту, не являются статистически значимыми. Как и в предыдущем эксперименте с ЭМИ, показатель ЭОЯ менее чувствителен, чем КГГ.

Для дополнительного подтверждения того факта, что исследуемые препараты DOX/EB/PF при введении в клеточную суспензию действуют непосредственно на уровне хроматина (т. е. интеркалируют в ДНК), а не косвенно, в частности воздействием на другие клеточные компоненты, был проведен подобный эксперимент с C_{60} -фуллереном и САФ, которые не воздействуют на ДНК и *in vitro* оказывают на ДНК лишь косвенное влияние путем комплексообразования с другими БАС [29–32]. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 3.

Для каждого донора, согласно t-тесту, не было выявлено статистически значимого изменения КГГ при добавлении в биосистему C_{60} -фуллерена и САФ. Изменения ЭОЯ, наблюдаемые у доноров В и С, также весьма незначительны по сравнению с изменением данного параметра под действием ДНК-интеркаляторов. Таким образом, полученные данные косвенно указывают на отсутствие взаимодействия C_{60} -фуллерена и САФ с хроматином и ядром клеток буккального эпителия человека. Этот результат согласуется с распространенным мнением о нетоксичности чистого C_{60} -фуллерена и САФ по отношению к клеточным органеллам [33, 34]. Принимая во внимание изменения в структуре хроматина и электроотрицательности ядер

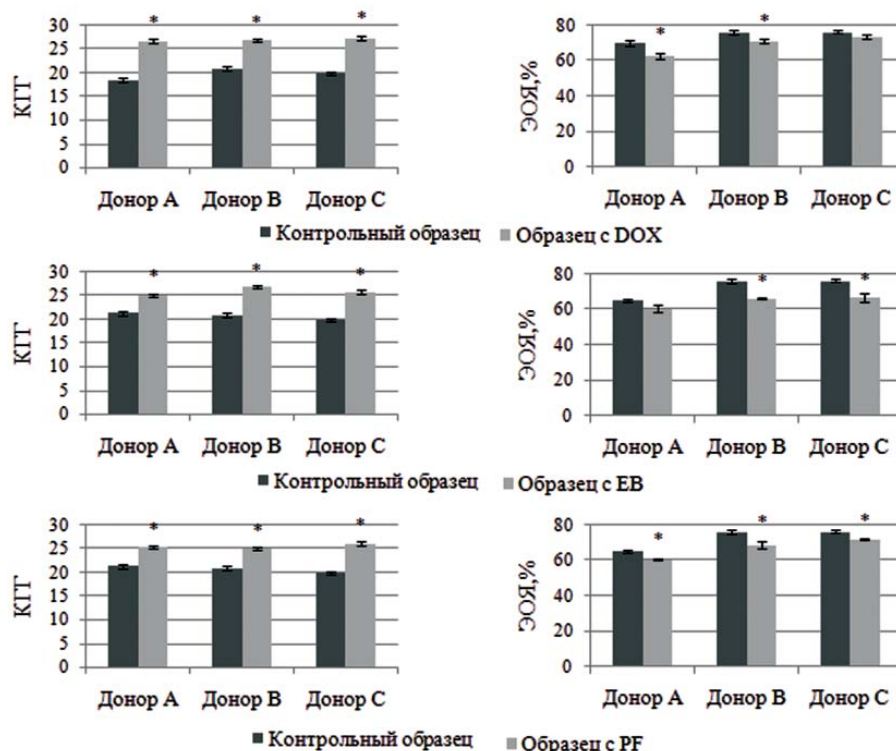


Рис. 2. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека под воздействием ароматических БАС

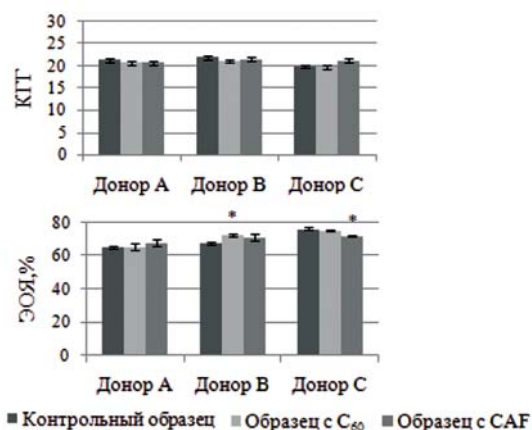


Рис. 3. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека под воздействием C₆₀-фуллера и САФ

под воздействием DOX/EB/PF (рис. 2), можно предположить, что исследуемые ДНК-интеркаляторы при введении в клеточную суспензию действуют непосредственно на ДНК, при этом C₆₀-фуллерен и САФ не оказывают на ДНК видимого прямого воздействия.

Полученные результаты соответствуют сведениям о ДНК-повреждающем действии используемых в данной работе ДНК-интеркаляторов. В частности, известно, что DOX

вызывает хромосомные aberrации в лейкоцитах человека [35], в соматических и герминальных клетках мышей [36], а также приводит к апоптозу посредством оксидативного повреждения [37]. Под действием EB наблюдались конденсация хроматина в лимфоцитах человека [38] и положительная суперспирализация ДНК в клетках *E. coli* [12]. PF вызывает мутации по типу сдвига рамки в вирусах, бактериофагах и бактериях, а также приводит к повреждению ДНК в клетках млекопитающих [39].

Действие ЭМИ миллиметрового диапазона и исследуемых ароматических БАС, в соответствии с полученными результатами, имеет однонаправленный характер, проявляющийся в увеличении числа гранул гетерохроматина и уменьшении электроотрицательности клеточных ядер; это дает основания предположить, что первичной мишенью указанных воздействий может быть ДНК, что согласуется с [1, 3–5, 7, 8, 12]. При этом, в отличие от ЭМИ, механизм взаимодействия препаратов DOX, EB и PF с ДНК изучен достаточно полно [40].

Комбинированное влияние ЭМИ и БАС на хроматин и ядра клеток буккального эпителия человека. На рис. 4 представлены результаты комбинированного влияния низкоин-

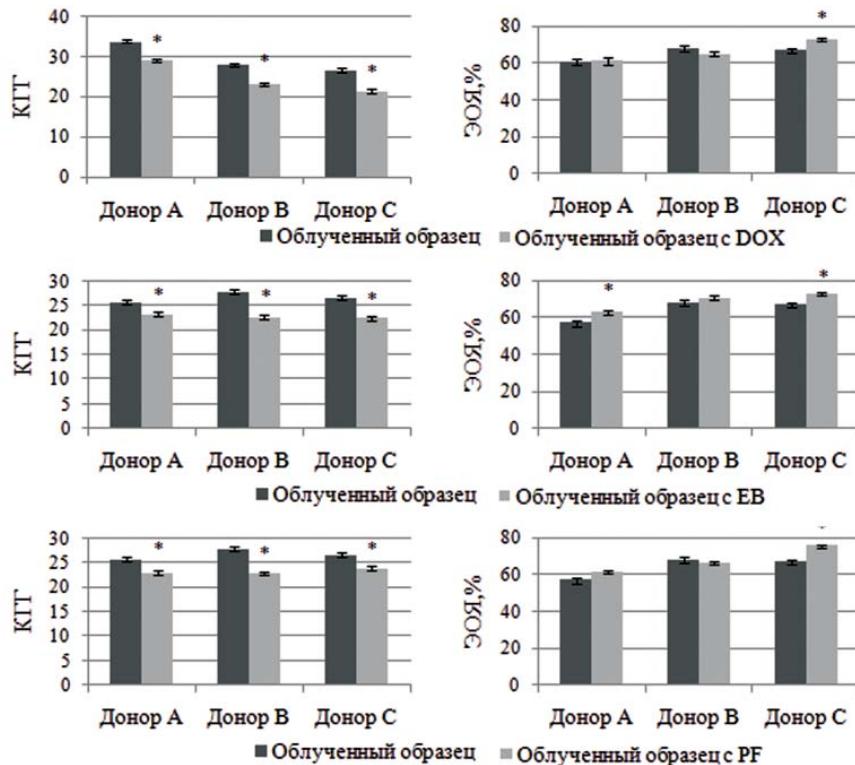


Рис. 4. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека при комбинированном воздействии БАС и электромагнитного излучения. Здесь и на рис. 5 * — $P < 0,05$ по сравнению с облученным образцом

тенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона и ароматических БАС, из которых следует однотипное для всех доноров снижение КГГ при облучении в случае добавления препарата. За исключением реакции клеток донора А в растворе с DOX, значения КГГ при совместном воздействии ЭМИ и БАС также значительно ниже показателей КГГ при воздействии препаратов. В то же время изменение показателя ЭОЯ в случае добавления DOX, EB или PF статистически значимо лишь для донора С, а также для донора А при добавлении EB.

Как отмечалось выше, действие ЭМИ и БАС на клетки буккального эпителия характеризуется изменением хроматина и клеточных ядер в целом. Однако при совместном действии миллиметрового излучения и препаратов наблюдается синергетический эффект, т. е. снижение гранулирования хроматина и увеличение процента ЭОЯ. Подобно исследуемым препаратам ЭМИ, очевидно, действует непосредственно на ДНК. При этом БАС и ЭМИ проявляют сходный эффект на хроматин и ядра, следовательно, механизмы их действия могут быть противоположными, т. е. либо ЭМИ защищает клетки от ДНК-повреждающего действия рассмотренных в данной работе БАС, либо ДНК-интер-

калаторы экранируют действие ЭМИ. Подобное явление было описано группой ученых из Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины. Изучение биологических эффектов излучения при действии стрессового фактора в виде фунгицидных антибиотиков на клетки различных культур дрожжей позволило авторам выявить протекторный характер влияния слабого ЭМИ, который проявляется в повышении устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков при предварительном облучении [41–43]. Подобная защитная роль слабого ЭМИ разных диапазонов частот уже упоминалась ранее в ряде работ [44, 45].

Таким образом, впервые на непролиферирующих клетках буккального эпителия человека обнаружен протекторный эффект при взаимодействии низкоинтенсивного ЭМИ миллиметрового диапазона и ароматических БАС. Выявить молекулярный механизм наблюдаемого эффекта пока не представляется возможным.

Из приведенных на рис. 5 гистограмм следует, что C_{60} -фуллерен и САФ оказывают протекторное действие, подобное тому, что наблюдалось для DOX, EB и PF, т. е. наблюдается восстановление КГГ при облучении клеток в присутствии данных веществ.

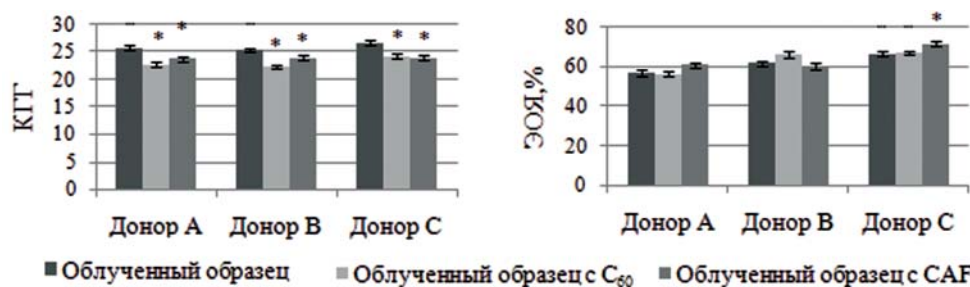


Рис. 5. Изменение количества гранул гетерохроматина и электроотрицательности ядер в клетках буккального эпителия человека при комбинированном воздействии C₆₀-фуллерена/САФ и электромагнитного излучения

Таким образом, в данной работе на клетках буккального эпителия человека с использованием визуальной оценки грануляции хроматина и электроотрицательности ядер был продемонстрирован синергетический эффект частичного восстановления функциональной активности клеток при комбинированном воздействии низкоинтен-

сивного ЭМИ миллиметрового диапазона и ароматических ДНК-интеркаляторов (DOX, EB и PF), а также протекторный эффект C₆₀-фуллерена и САФ по отношению к действию ЭМИ. Полученные результаты указывают на перспективу использования C₆₀-фуллерена и САФ в качестве биопрепаратов-протекторов ДНК-повреждающего воздействия ЭМИ.

REFERENCES

- Belyaev I. Y., Shcheglov V. S., Alipov E. D., Ushakov V. D. Nonthermal effects of extremely high-frequency microwaves on chromatin conformation in cells in vivo-dependence on physical, physiological, and genetic factors. *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*. 2000, 48(11), 2172–2179.
- Bernhardt J. Non-ionizing radiation safety: radiofrequency radiation, electric and magnetic fields. *Phys. Med. Biol.* 1992, 37(4), 807.
- Belyaev I. Y., Hillert L., Protopopova M., Tamm C., Malmgren L. O., Persson B. R., Selivanova G., Harms-Ringdahl M. 915 MHz microwaves and 50 Hz magnetic field affect chromatin conformation and 53BP1 foci in human lymphocytes from hypersensitive and healthy persons. *Bioelectromagnetics*. 2005, 26(3), 173–184.
- Lai H. Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996, 69(4), 513–521.
- Tice R. R., Hook G. G., Donner M., McRee D. I., Guy A. W. Genotoxicity of radiofrequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics*. 2002, 23(2), 113–126.
- Shckorbatov Y. G., Pasiuga V. N., Kolchigin N. N., Grabina V. A., Batrakov D. O., Kalashnikov V. V., Ivanchenko D. D., Bykov V. N. The influence of differently polarised microwave radiation on chromatin in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009, 85(4), 322–329.
- Graves D. E., Velea L. M. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Cur. Org. Chem.* 2000, 4(9), 915–929.
- Pullman B. Molecular mechanisms of specificity in DNA-antitumor drug interactions. *Springer*. 1989, 123–144 p.
- Zhijian C., Xiaoxue L., Yezhen L., Shijie C., Lifan J., Jianlin L., Deqiang L., Jiliang H. Impact of 1.8-GHz radiofrequency radiation (RFR) on DNA damage and repair induced by doxorubicin in human B-cell lymphoblastoid cells. *Mut. Res.* 2010, 695(1), 16–21.
- Ciaravino V., Meltz M. L., Erwin D. N. Absence of a synergistic effect between moderate-power radio-frequency electromagnetic radiation and adriamycin on cell-cycle progression and sister-chromatid exchange. *Bioelectromagnetics*. 1991, 12(5), 289–298.
- Meltz M. L., Eagan P., Erwin D. N. Proflavin and microwave radiation: absence of a mutagenic interaction. *Bioelectromagnetics*. 1990, 11(2), 149–157.
- Ushakov V. L., Shcheglov V. S., Belyaev I. Y., Harms-ringdahl M. Combined effects of circularly polarized microwaves and ethidium bromide on *E. coli* cells. *Elect. Biol. Med.* 1999, 18(3), 233–242.
- Shckorbatov Y., Pasiuga V., Kolchigin N., Batrakov D., Kazansky O., Kalashnikov V. Changes in the human nuclear chromatin induced by ultra wideband pulse irradiation. *Cent. Eur. J. Biol.* 2009, 4(1), 97–106.
- Therman E., Susman M. Human chromosomes: structure, behavior, and effects. *New York: Springer-Verlag*. 1993, 91 p.
- Shakhbazov V. G., Colupaeva T. V., Nabokov A. L. A new method for determining the biological age. *Lab delo*. 1986, 7, 404–406. (In Russian).
- Scharff P., Carta-Abelmann L., Siegmund C., Matyshevska O. P., Prylutska S. V., Koval T. V., Golub A. A., Yashchuk V. M., Kushnir K. M., Prylutskiy Yu. I. Effect of X-ray and UV irradiation of the C₆₀ fullerene aqueous solution on biological samples. *Carbon*. 2004, 42(5–6), 1199–1201.

17. Prylutska S., Matyshevska O., Grynyuk I., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Scharff P. Biological effects of C₆₀ fullerenes *in vitro* and in a model system. *Mol. Cryst. Liquid Cryst.* 2007, 468(1), 265–274.
18. Boiko O. V., Lantushenko A. O., Lukyanchuk G. A., Salamatin V. V., Shkhorbatov Y. G. The effect of mobile phone microwave radiation and influence of electromagnetic radiation (EMR) of different intensities of WiMAX radio frequency on chromatin in human cells. *Scientific Notes of Taurida National Vernadsky University. Series: Biology and Chemistry.* 2010, 23(62), 56–64. (In Russian).
19. Skamrova G. B., Lantushenko A. O., Shkhorbatov Y. G., Evstigneev M. P. Influence of mobile phone radiation on membrane permeability and chromatin state of human buccal epithelium cells. *Biochem. Biophys.* 2013, 1(2), 22–28.
20. Skamrova G. B., Evstigneev M. P., Trushkin A. N., Shkhorbatov Y. G. The effect of mobile phone and WiMAX network microwave radiation on membrane permeability of human buccal epithelium cells. *Scientific Notes of Taurida National Vernadsky University. Series: Biology and Chemistry.* 2012, 25(64), 187–195. (In Russian).
21. Shkhorbatov Y., Shakhbazov V., Navrotska V., Zhuravliova L., Gorobets N., Kiyko V., Fisun A., Sirenko S. Changes in the state of chromatin in human cells under the influence of microwave radiation. *Sixteenth International Wroclaw Symposium and Exhibition on Electromagnetic Compatibility. (11–13 June 2002, Wroclaw, Poland).* 2002, V. 1, P. 87–88.
22. Shkhorbatov Y., Grigoryeva N., Shakhbazov V., Grabina V., Bogoslavsky A. Microwave irradiation influences on the state of human cell nuclei. *Bioelectromagnetics.* 1998, 19(7), 414–419.
23. Shkhorbatov Y. G., Shakhbazov V. G., Navrotskaya N. N., Zhuravleva L. A., Gorobets N. N., Kiyko V. I. Changes in cell membrane properties, chromatin state, and electrokinetic properties of human cell nuclei under the influence of low level microwave irradiation. *Microwave and Telecommunication Technology (CriMiCo), 11th International Crimean Conference.* 2001, 92–950 p. (In Russian).
24. Shkhorbatov Y. G., Shakhbazov V. G., Navrotskaya V. V., Grabina V. A., Sirenko S. P., Fisun A. I., Gorobets N. N., Kiyko V. I. Electrokinetic properties of nuclei and membrane permeability in human buccal epithelium cells influenced by the low-level microwave radiation. *Electrophoresis.* 2002, V. 23, P. 2074–2079.
25. Shkhorbatov Y. G., Shakhbazov V. G., Navrotskaya V. V., Grabina V. A., Sirenko S. P., Fisun A. I., Gorobets N. N., Kiyko V. I. Application of intracellular microelectrophoresis to analysis of the influence of the low-level microwave radiation on electrokinetic properties of nuclei in human epithelial cells. *Electrophoresis.* 2002, 23(13), 2074–2079.
26. Shkhorbatov Y. G., Navrotskaya V. V., Zhuraveleva L. A., Gorobets N. N., Kiyko V. I., Sirenko S. P. The influence of microwave irradiation on human epithelial cells. *Phys. and Engineering of Millimeter and Sub-Millimeter Waves, 2001. The Fourth International Kharkov Symposium.* 2001, 2, 937–938.
27. Shkhorbatov Y. G., Pasiuga V. N., Grabina V. A., Artemenchuk O. V., Kolchigin N. N., Bykov V. N., Ivanchenko D. D. Changes in human cell membrane permeability after irradiation by microwaves with different elliptical polarization. *Microwave and Telecommunication Technology (CriMiCo), 20th International Crimean Conference.* 2010, P. 1138–1139.
28. Shkhorbatov Y. G., Shakhbazov V. G., Gorenskaya O. V., Dmitruk T. V., Montvid P. Y. Changes in the state of nucleus and chromatin in human cells under the influence of hormonal factors *in vitro.* *Cytology and Genetics.* 1999, 33(5), 64–71. (In Russian).
29. Buchelnikov A., Kostyukov V., Evstigneev M., Prylutskiy Yu. I. Mechanism of complexation of the phenothiazine dye methylene blue with fullerene C₆₀. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2013, 87(4), 662–667.
30. Evstigneev M. P., Buchelnikov A. S., Voronin D. P., Rubin Yu. V., Belous L. F., Prylutskiy Yu. I., Ritter U. Complexation of C₆₀ fullerene with Aromatic Drugs. *Chem. Phys. Chem.* 2013, 14(3), 568–578.
31. Mchedlov-Petrosyan N., Klochkov V., Andrievsky G., Ishchenko A. Interaction between colloidal particles of C₆₀ hydrosol and cationic dyes. *Chem. Phys. Lett.* 2001, 341(3), 237–244.
32. Evstigneev M. P., Khomich V. V., Davies D. B. Complexation of anthracycline drugs with DNA in the presence of caffeine. *Eur. Biophys. J.* 2006, V. 36, P. 1–11.
33. Shi X., Dalal N., Jain A. Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.* 1991, 29(1), 1–6.
34. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Matyshevska O. P., Prylutskiy Yu. I., Ritter U., Scharff P. Antioxidant properties of C₆₀ fullerenes *in vitro.* *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures.* 2008, 16(5–6), 698–705.
35. Vig B. Chromosome aberrations induced in human leukocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin. *Cancer Res.* 1971, 31(1), 32–38.
36. Au W. W., Hsu T. The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mut. Res.* 1980, 79(4), 351–361.
37. Müller I., Jenner A., Bruchelt G., Niethammer D., Halliwell B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin—apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 230(2), 254–257.
38. Belyaev I. Y., Eriksson S., Nygren J., Torudd J., Harms-Ringdahl M. Effects of ethidium bromide on DNA loop organisation in human lymphocytes measured by anomalous viscosity time dependence and single cell

- gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta (General Subjects)*. 1999, 1428(2), 348–356.
39. Kozurková M., Sabolová D., Janovec L., Mikes J., Koval J., Ungvarský J., Stefanisinová M., Fedorocko P., Kristian P., Imrich J. Cytotoxic activity of proflavine diureas: synthesis, antitumor, evaluation and DNA binding properties of 10, 100-(acridin-3, 6-diyl)-30, 300-dialkyldiureas. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, V. 16, P. 3976–3984.
40. Evstigneev M. P. DNA-binding aromatic drug molecules: physico-chemical interactions and their biological roles. *LAP Lambert Academic Publishing*. 2010, 96 p.
41. Voichuk S., Gromozova E. Effect of radio-frequency of electromagnetic radiation on yeast sensitivity to fungicide antibiotics. *Mikrobiol. J.* 2003, 66(4), 69–77.
42. Voychuk S., Gromozova E., Lytvyn P., Podgorsky V. Changes of surface properties of yeast cell wall under exposure of electromagnetic field (40.68 MHz) and action of nystatin. *Environmentalist*. 2005, 25(2–4), 139–144.
43. Podgorskii V., Voichuk S., Gromozova E., Gordienko A. Protective action of electromagnetic (40.68 MHz) on *Saccharomyces cerevisiae* UCM Y-517. *Mikrobiol. J.* 2004, 66(5), 48.
44. Tambiev A., Kirikova N., Betsky O., Gulyaev Y. Millimeter wave and photosynthetic organisms. *Moscow: Radiotekhnika*. 2003, 175 p. (In Russian).
45. Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Ann. Review Immunol.* 1997, 15(1), 351–369.

КОМБІНОВАНА ДІЯ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ, ДНК-ІНТЕРКАЛЯТОРІВ, C₆₀-ФУЛЕРЕНУ ТА КОФЕЇНУ НА КЛІТИНИ БУКАЛЬНОГО ЕПІТЕЛІЮ ЛЮДИНИ

Г. Б. Скамрова¹
Ю. І. Прилуцький²
М. П. Євстигнєєв^{1,3}

¹Севастопольський національний технічний університет, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

³Белгородський державний університет, Росія

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

За останнє десятиліття значно зросла кількість фізичних і хімічних біологічно активних ушкоджувальних факторів.

Шляхи нейтралізації їхньої дії досліджено недостатньо. У роботі використано методи візуальної оцінки грануляції хроматину та електронегативності ядер клітин букального епітелію людини з метою вивчення комбінованого впливу низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання міліметрового діапазону і ДНК-інтеркаляторів: антибіотика доxorубіцину, мутагенів бромистого етидію і профлавіну, а також кофеїну і C₆₀-фулерену, які безпосередньо не взаємодіють з ДНК. За дії електромагнітного випромінювання з досліджуваними ДНК-зв'язувальними речовинами виявлено синергетичний ефект, який полягає у зменшенні клітинної відповіді, зумовленої електромагнітним випромінюванням і препаратами. За опромінення клітин у присутності C₆₀-фулерену або кофеїну спостерігали протекторний ефект цих речовин стосовно електромагнітного випромінювання. Одержані результати можуть слугувати основою для використання C₆₀-фулерену і кофеїну як ДНК-протекторів за дії електромагнітного випромінювання.

Ключові слова: ДНК-інтеркалятори, C₆₀-фулерен, електромагнітне випромінювання, букальний епітелій людини.

COMBINED EFFECT OF ELECTROMAGNETIC RADIATION, DNA-INTERCALATORS, C₆₀-FULLERENE AND CAFFEINE ON HUMAN BUCCAL EPITHELIUM CELLS

G. B. Skamrova¹
Yu. I. Prylutskyi²
M. P. Evstigneev^{1,3}

¹Sevastopol National Technical University, Ukraine

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

³Belgorod State University, Russia

E-mail: max_evstigneev@mail.ru

Now the number of physical and chemical biologically active damage factors dramatically increased. The ways to neutralize such effects have not been studied enough. In this work the techniques of visual assessment of chromatin granulation and electronegativity of human buccal epithelium cell nuclei were used in order to study the combined effects of the exposure to low-intensity electromagnetic radiation of the millimeter range electromagnetic radiation and DNA-binding compounds, such as antibiotic doxorubicin, mutagens ethidium bromide and proflavine, as well as caffeine and C₆₀-fullerene which are not directly interact with DNA. When the action of electromagnetic radiation and DNA-binding compounds is combined, a synergistic effect of reducing the cell response was observed in contrast to the effects caused by electromagnetic radiation and drugs separately. When cells were irradiated in the presence of C₆₀-fullerene or caffeine, a protective effect of compounds against electromagnetic radiation influence was observed. The obtained results enable to provide perspectives for C₆₀ fullerene and caffeine using as DNA-protectors under electromagnetic radiation.

Key words: DNA-intercalators, C₆₀-fullerene, electromagnetic radiation, human buccal epithelium.

УДК [602.4:543.428.3]:582.123.4:549.743

VARIABILITY OF COORDINATION COMPLEXES OF COPPER ACCUMULATED WITHIN FUNGAL COLONY IN THE PRESENCE OF COPPER-CONTAINING MINERALS

*M. O. Fomina*Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*E-mail: M.Fomina@ukr.net*

Received 04.11.2013

The aim of work was to elucidate the mechanisms of bioaccumulation of copper leached from minerals by fungus *Aspergillus niger* with great bioremedial potential due to its ability to produce chelating metabolites and transform toxic metals and minerals. The special attention was paid to the chemical speciation of copper bioaccumulated within fungal colony in the process of fungal transformation of copper-containing minerals.

Chemical speciation of copper within different parts of the fungal colony was studied using solid-state chemistry methods such as synchrotron-based X-ray absorption spectroscopy providing information about the oxidation state of the target element, and its coordination environment. The analysis of the obtained X-ray absorption spectroscopy spectra was carried out using Fourier transforms of Extended X-ray Absorption Fine Structure regions, which correspond to the oscillating part of the spectrum to the right of the absorption edge.

Results of this study showed that fungus *A. niger* was involved in the process of solubilization of copper-containing minerals resulted in leaching of mobile copper and its further immobilization by fungal biomass with variable coordination of accumulated copper within fungal colony which depended on the age and physiological/reproductive state of fungal mycelium. X-ray absorption spectroscopy data demonstrated that copper accumulated within outer zone of fungal colony with immature vegetative mycelium was coordinated with sulphur-containing ligands, in contrast to copper coordination with phosphate ligands within mature mycelium with profuse conidia in the central zone of the colony.

The findings of this study not only broaden our understanding of the biogeochemical role of fungi but can also be used in the development of various fungal-based biometallurgy technologies such as bioremediation, bioaccumulation and bioleaching and in the assessment of their reliability.

The main conclusion is that coordination environment of copper bioaccumulated within fungal biomass via the process of transformation of copper minerals is heterogeneous varying from sulphhydryl to phosphate.

Key words: bioremediation, metal bioaccumulation, fungi, copper, mineral transformation, chemical speciation, coordination complexes, X-ray absorption spectroscopy.

Toxic impacts of heavy metals in the environment have led to intensive research on various methods of toxic metal bioremediation, and the central thrust of bioremediation depends on microbiology [1–3].

The ability of such microorganisms as fungi to survive and flourish in metal-rich environments, coupled with their capacity to transform a huge variety of metal species, makes them ideal candidates for both bioleaching and bioremedial systems. These metal-resistant characteristics depend upon their intra- and extracellular detoxification strategies, which can be manipulated to ensure either the solubilisation or sequestration of a specific element. Intracellular resistance

depends on the immobilization of the metal to prevent damage to essential cellular machinery. This is achieved by the action of metal-binding proteins, or sequestration of the metal in the fungal vacuole [2, 4–6]. Extracellular responses meanwhile, depend upon the action of protons or organic acids that are excreted into the surrounding medium, or bound in the extracellular polysaccharide matrix [4, 7–9].

Determination of metal speciation in such biological systems has been a challenging problem because of the amorphous state or poor crystallinity of metal complexes within biomass and relatively low metal concentrations. There were a few studies for

fungal biomass that mainly clarify the nature of metal adsorption sites on cell walls [10–13]. However, synchrotron-based element-specific X-ray absorption spectroscopy (XAS) provides a means for studying element complexation in environmental samples varying from biological to mineralogical in nature [11–16]. XAS is an element specific technique which gives information about the oxidation state of the target element, and its coordination environment, including the number and identity of neighbouring atoms [17]. It allows studies involving fast data collection, small samples, low concentrations, both crystalline and amorphous solids and even solutions. XAS is also a non-destructive, non-invasive method that could probe metal transformations at the mineral-microbe interface directly studying samples in their natural, often hydrated, states which makes it an ideal approach for investigating metal transformations at the mineral-microbe interface in biogeochemical systems [16, 17].

This work was focused on XAS-studies of the chemical speciation of copper bioaccumulated within fungal colony in the process of fungal transformation of copper-containing minerals.

Materials and methods

The fungal strain *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC 201373) from the collection of microorganisms of the Division of Molecular Microbiology, College of Life Sciences, University of Dundee, UK was used in this study.

A. niger was exposed to model copper-containing minerals azurite and malachite in the Petri-dish microcosms previously designed for studies of fungal ability for mineral transformations [18, 19].

Azurite [$\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$] and malachite [$\text{Cu}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$] were crushed and ground using a mortar and pestle and sieved to ensure a final grain size of less than 400 μm . The resulting powder was sterilized by rinsing with deionised water for at least 8 h with intermittent agitation on an orbit shaker. The samples were then immersed in 70% ethanol for at least 24 h, after which the solution was decanted and the samples left to dry in a sterile flow hood. Once dry, they were oven-sterilized at 80 °C for at least 24 h.

Malt extract agar (MEA, Oxoid, UK) was prepared with malachite or azurite by adding

sterilized portions of the relevant mineral to create a concentration of 10 mM in the final plates. Dialysis membrane was used to cover the agar and separate the fungus from the medium, but allow the colony easy access to nutrients. Inocula consisted of one 7 mm diameter core cut from a colony of *A. niger* grown overnight on MEA medium. Plates were sealed with parafilm and incubated at 25 °C for the duration of the experiments.

Fungal biomass was harvested after 7 days of growth. Different parts of fungal colony were cut out with sterile razor blade.

Freshly harvested biomass was enclosed into cellotape and quenched in liquid nitrogen, was used for further X-ray absorption spectrometry.

X-ray absorption spectra at the Cu K-edges were collected on Station 7.1 at the CCLRC Daresbury SRS operating at 2 GeV with an average current of 140 mA, using a vertically collimating plane mirror and a sagittally bent focusing Si(111) double crystal monochromator detuned to 80% transmission to minimize harmonic contamination. Sample data were collected with the station operating in fluorescence mode using a 9-element solid state Ge diode detector with high count-rate XPRESS processing electronics; spectra of model compounds were collected in the transmission mode. The monochromator was calibrated using a 5 mm Cu foil. Experiments were performed using a liquid nitrogen cooled cryostat. Single scans were collected for the model compounds, and 3–4 scans were collected and summed for each sample. Model compounds used were Cu-acetate, Cu-gluconate, Cu-malate, Cu-oxalate, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ and Cu_2O .

Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS) regions of the obtained XAS spectra, which corresponded to the oscillating part of the spectrum to the right of the absorption edge, were used in spectra analysis. Background-subtracted EXAFS spectra were analyzed in EXCURV98 using full curved wave theory [20, 21]. Phaseshifts were derived in the program from *ab initio* calculations using Hedin–Lundqvist potentials and von Barth ground states [22]. Fourier transforms of the EXAFS spectra were used to obtain an approximate radial distribution function around the central copper atom (the absorber atom); the peaks of the Fourier transform can be related to «shells» of surrounding back scattering atoms characterized by atom type, number of atoms

in the shell, the absorber-scatterer distance, and the Debye-Waller factor, $2\sigma^2$ (a measure of both the thermal motion between the absorber and scatterer and of the static disorder or range of absorber-scatterer distances). The data were fitted for each sample by defining a theoretical model and comparing the calculated EXAFS spectrum with the experimental data. Shells of backscatterers were added around the copper and by refining an energy correction E_f (the Fermi energy), the absorber-scatterer distance, and Debye-Waller factor for each shell, a least squares residual (the R -factor [22, 23] was minimized). Where appropriate, multiple scattering effects were included in the fits [24].

Results and Discussion

Copper is a trace element essential to life, yet, at high doses it can be toxic. Copper makes a significant contribution to global pollution [25]. The origin of copper pollution is very diverse. In addition to natural origins, mainly from rock weathering and atmospheric deposition, its wide human use in many fields (transportation, manufacturing, currency, construction and agriculture as fungicide and herbicide) generates releases into the environment.

Both processes of metal mobilization (e.g., *in situ* soil washing, extraction and filtration techniques) and immobilization (e.g., *in situ* stabilization techniques) may be applied to remediate contaminated matrices [2, 29]. Many fungi can be highly efficient biogeochemical agents with capability for both metal mobilization and immobilization [4].

Fungi are able to solubilize minerals and weather rocks in the course of «heterotrophic leaching» as a result of protonation (acidolysis), chelation (complexolysis) and metal accumulation by the biomass [7, 30]. Fungal and plant cell walls can act as a cation exchanger due to their negative charge originating from functional groups, e.g. carboxylic, phosphate, amine or sulfhydryl, in different wall components (hemicelluloses, pectin, lignin, chitin, etc.) [4, 11, 13]. Mechanisms for metal immobilization within plant and fungal biomass also include intracellular uptake with complexation to ligands such as S-containing peptides (metallothioneins, phytochelatins), carboxylic acids (citrate, malate, oxalate), and phenolic acids [4, 6, 8, 12, 14, 15, 31].

A ubiquitous fungus *Aspergillus niger* is one of the most efficient transformers of minerals

due, first of all, to its ability to over-excrete citric, oxalic and other low molecular weight carboxylic acids [32]. Various strains of *A. niger* are used in the industrial preparation of citric acid (E 330). The ability of this fungus to produce chelating metabolites, combined with its resilience to challenging environment and its uncomplicated and inexpensive nutritional requirements, makes it ideal candidate for bioremediation treatment. Both its solubilizing and metal-immobilization characteristics can be exploited to improve the condition of solid waste, contaminated soil and polluted water. *A. niger* has been previously shown to solubilize various copper-containing minerals [32].

In order to elucidate the mechanisms of bioaccumulation of copper leached from minerals by *A. niger*, we used synchrotron-based element-specific X-ray absorption spectroscopy technique which gives information about the oxidation state of the target element, and its coordination environment, including the number and identity of neighbouring atoms [17]. XAS allows studies involving fast data collection, small samples, low concentrations, both crystalline and amorphous solids and even solutions.

In the experiments with *A. niger*, grown on malt extract agar medium containing azurite or malachite, coordination of bioaccumulated copper by sulphur-containing ligands was found for samples with new vegetative mycelium taken from the outer zone of the fungal colony (Table; Fig. 1, A, C). A typical example of the best fit to the inner coordination sphere was with 3 sulphurs at 2.26 Å which was significantly improved by the addition of 2 copper scatterers at 2.68 Å clearly indicating the formation of a copper sulphide phase.

In contrast, on both azurite- and malachite-containing media the samples from the central part of *A. niger* colonies with mature aging mycelium and abundant dark-coloured conidiophores with conidia demonstrated phosphate coordination of copper (Table; Fig. 1, A, D).

Thus, the age and therefore the physiological and reproductive state of fungal mycelium was found to play a crucial role in the formation of coordination environment of metal within the biomass.

The observed variation in coordination complexes of copper in *A. niger* demonstrates that the relative significance of copper resistance mechanisms may vary with the age of the colony. We suggest that the sulfhydryl

Cu K-edge EXAFS parameters for copper compounds observed in the biomass of *A. niger* colonies grown on MEA containing 10 mM azurite or malachite

Sample	Scatterers	$r/\text{\AA}$	$2\sigma^2/\text{\AA}^2$	Residual
Fungal colony grown on azurite medium				
Outer zone	3 x S	2.23	0.033	33.6
	2 x Cu	2.60	0.040	
Inner zone	4 x O	1.95	0.022	34.4
	2 x O	2.53	0.022	
	2 x P	2.89	0.018	
	2 x Cu	3.70	0.018	
Fungal colony grown on malachite medium				
Outer	3 x S	2.26	0.017	37.5
	2 x Cu	2.68	0.028	
Inner zone	4 x O	1.94	0.032	31.9
	2 x O	2.48	0.022	
	2 x P	3.00	0.046	

Notions. Table shows the values obtained from the EXAFS analysis of copper in the biomass of *A. niger* where r is the copper-scatterer distance in Angstroms ($\pm 0.02 \text{\AA}$ inner shells, $\pm 0.05 \text{\AA}$ outer shells), $2\sigma^2$ is the Debye–Waller type factor ($\pm 15\%$ inner shells, $\pm 30\%$ outer shells), which is a measure of both the thermal motion between the absorber and scatterer and of the static disorder or range of absorber–scatterer distances. The residual is a least squares residual from fitting the spectrum of the model to the experimental data.

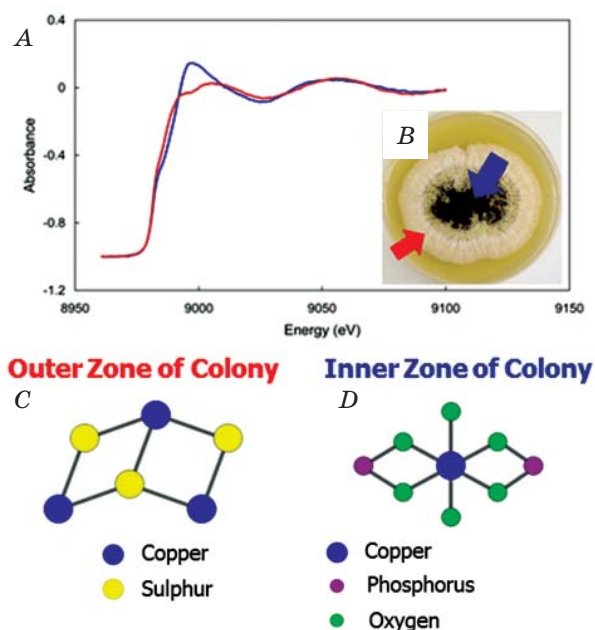


Fig. 1. Copper coordination in *A. niger* grown on MEA with 10 mM malachite:

(A) XAS spectra displayed entirely different characteristics for (B) outer non-sporulating (red arrow) and inner sporulating (blue arrow) areas of the fungal colony. EXAFS analysis suggested that (C) copper in the outer zone of the colony was present as copper sulphide, while (D) copper in the inner region of the colony was coordinated by phosphate ligands

coordination of copper in the immature outer mycelia originates from the association of copper with metallothioneins. These are small cysteine-rich proteins which are often produced in response to heavy metals introduction and are thought to play an important role in their homeostasis and sequestration [33, 34]. The metallothioneins were first reported in the equine kidney and named because of their extremely high content of sulphur — 4.1% (DW) and cadmium — 2.9% (DW) [35]. These metal-binding proteins have since been found throughout the animal, plant and fungal kingdoms [6]. Metallothioneins have been shown to be particularly important for copper homeostasis in yeast [36], while more recently the presence of copper has been shown to be the controlling factor in metallothionein synthesis in *Neurospora crassa* [34].

There is no current evidence that metallothioneins are found in the extracellular environment so it seems likely that the majority of copper chelation in the young parts of the colony occurs intracellularly. This suggests that the external components of the copper resistance pathway may not be fully developed in immature areas of the fungal colony. Proteins are not ideal for long-term sequestration of copper, as they must be constantly replaced, so efflux or incorporation of the toxic metals into insoluble forms is essential. We propose that it is this shift to a more permanent mode of storage that causes the copper coordination by phosphate ligands in the mature parts of the colony. The activity of acid phosphatases, which have been linked to heavy metal resistance in fungi, increases with increased copper concentration and varies with colony age [37, 38]. These enzymes could mediate the transferal of the polypeptide-bound copper to a more stable form such as polyphosphates.

It has been reported that the different groups of microorganisms accumulate inorganic phosphates intracellularly. Confocal laser scanning microscopy studies revealed single and aggregated cigar-shaped polyphosphate granules present in both vacuoles and cytoplasm of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as well as in fungal hyphae and macroconidia of *Fusarium solani* [39]. Polyphosphates are used by ectomycorrhizal fungi to immobilize metals within their vacuoles [40] which would provide the long-term metal storage and protection from the toxic effects.

Thus, these findings can be summarized in the diagram illustrating the overall transformation of copper-containing minerals by *A. niger* where the process of mineral solubilization through heterotrophic leaching of copper from minerals mediated by fungus is followed by the process of immobilization of mobile copper species within fungal biomass via bioaccumulation and copper speciation which varies depending on the age and reproductive state of fungal mycelium (Fig. 2).

The results of this study demonstrated heterogeneity of the toxic metal speciation within microbial biomass and should be taken into account in the development of the effective technologies of fungal-based remediation techniques.

The author would like to acknowledge the funding of CCLRC Daresbury Synchrotron Radiation Source, UK (SRS user grant 40107, 43079) and personally Prof. Geoffrey M. Gadd for the opportunity to perform this work and scientific supervision, Dr. Andrew Bowen for helpful discussions and practical assistance, and Dr. John Charnock for his valuable help with EXAFS spectra analysis.

REFERENCES

1. Malik A. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 2004, V. 30, P. 261–278.
2. Gadd G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 2007, V. 111, — P. 3–49.
3. Shukla K. P., Singh N. K., Sharma S. Bioremediation: Developments, Current Practices and Perspectives. *Genet. Engineer. Biotechnol. J.* 2010, V. 3, P. 1–20.
4. Gadd G. M. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 1993, V. 124, P. 25–60.
5. Blaudez D., Botton B., Chalot M. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, 2000, V. 146, P. 1109–1117.
6. Bellion M., Courbot M., Jacob C., Blaudez D., Chalot M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, V. 254, P. 173–181.
7. Burford E. P., Fomina M., Gadd G. M. Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Mineral. Mag.* 2003, V. 67, P. 1127–1155.
8. Fomina M. A., Alexander I. J., Hillier S., Gadd G. M. Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant-symbiotic fungi. *Geomicrobiol. J.* 2004, V. 21, P. 351–366.
9. Fomina M., Burford E. P., Gadd G. M. The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem. *Boca Raton: CRC Taylor & Francis* (Dighton J., White J. F., Oudemans P., eds.). 2005. P. 733–758.
10. Fourest E., Serre A., Roux J. C. Contribution of carboxylic groups to heavy metal binding sites in fungal cell walls. *Toxicol. Environ. Chem.* 1996, V. 54, P. 1–10.
11. Sarret G., Manceau A., Spadini L., Roux J.-C., Hazemann J.-L., Soldo Y., Laurent E.-B., Menthonnex J.-J. Structural determination of Zn and Pb binding sites in *Penicillium chrysogenum* cell walls by EXAFS spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 1998, V. 32, P. 1648–1655.
12. Sarret G., Manceau A., Cuny D., Haluwyn C. V., Déruelle S., Hazemann J.-L., Soldo Y., Laurent E.-B., Menthonnex J.-J. Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution. *Environ. Sci. Technol.* 1998, V. 32, P. 3325–3330.
13. Sarret G., Manceau A., Spadini L., Jean-Claude Roux, Jean-Louis Hazemann, Yvonne Soldo, Laurent Eybert-Berard, Jean-Jacques Menthonnex. Structural determination of Pb binding sites in *Penicillium chrysogenum* cell

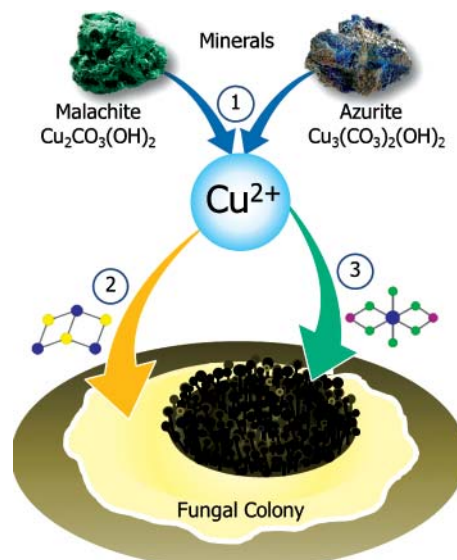


Fig. 2. Simplified diagram of the transformation of copper-containing minerals by fungus *A. niger*:

- 1 — mineral solubilization via the processes of heterotrophic leaching including ligand- and proton-promoted mechanisms. It results in the release of the mobile copper;
- 2 — mobile copper is bioaccumulated by immature mycelium in the outer part of the fungal colony resulting in the sulphur coordination of copper;
- 3 — copper bioaccumulation by mature mycelium with abundant conidia results in the copper coordination by phosphate ligands

- walls by EXAFS spectroscopy and solution chemistry. *J. Synch. Radiat.* 1999, V. 6, P. 414–416.
14. Sarret G., Saumitou-Laprade P., Bert V., Proux O., Hazemann J. L., Traverse A., Marcus M. A., Manceau A. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.* 2002, V. 130, P. 1815–1826.
 15. Sarret G., Schroeder W. H., Marcus M. A., Geoffroy N., Manceau A. Localization and speciation of Zn in mycorrhized roots by μ SXRF and μ EXAFS. *J. Phys. IV France.* 2003, V. 107, P. 1193–1196.
 16. Kemner K. M., O'Loughlin E. J., Kelly S. D., Boyanov M. I. Synchrotron X-ray investigations of mineral-microbe-metal interactions. *Elements.* 2005, V. 1, P. 217–221.
 17. Gardea-Torresdey J. L., de la Rosa G., Peralta-Videa J. R. Use of phytoremediation technologies in the removal of heavy metals: A review. *Pure Appl. Chem.* 2004, V. 76. — P. 801–813.
 18. Sayer J. A., Raggett S. L., Gadd G. M. Solubilization of insoluble compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycol. Res.* 1995, V. 99, P. 987–993.
 19. Fomina M. A., Alexander I. J., Colpaert J. V., Gadd G. M. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 2005, V. 37, P. 851–866.
 20. Gurman S. J., Binsted N., Ross I. A rapid, exact, curved-wave theory for EXAFS calculations. *J. Phys. Chem.* 1984, V. 17, P. 143–151.
 21. Binsted N. *Daresbury Laboratory EXCURV98 Program.* 1998.
 22. Hedin L., Lundqvist S. Effects of electron-electron and electron-phonon interactions on the one-electron states of solids. *Sol. State Phys.* 1969, V. 23, P. 1–181.
 23. Binsted N., Strange R. W., Hasnain S. S. Constrained and restrained refinement in EXAFS data analysis with curved wave theory. *Biochemistry.* 1992, V. 31, P. 12117–12125.
 24. Gurman S. J., Binsted N., Ross I. A rapid, exact, curved-wave theory for EXAFS calculations. 2. The multiple-scattering contributions. *J. Phys. Chem.* 1986, V. 19, P. 1845–1861.
 25. Nriagu J. O. A history of global metal pollution. *Science.* 1996, 272(5259), 223–224.
 26. Cotter-Howells J. D., Caporn S. Remediation of contaminated land by formation of heavy metal phosphates. *Appl. Geochem.* 1996, V. 11, P. 335–342.
 27. Knox A. S., Seaman J. C., Mench M. J., Vangronsveld J. Remediation of metal- and radionuclides-contaminated soils by in situ stabilization techniques. *Environmental Restoration of Metals-Contaminated Soil.* Boca Raton: Lewis Publishers (Iskander I. K., ed.), 2000, P. 21–61.
 28. Prasad M. N. V., De Oliveira Freitas H. M. Metal hyperaccumulation in plants — Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Elect. J. Biotechnol.* 2003, V. 6, P. 285–321.
 29. Brown S., Chaney R., Hallfrisch J., Ryan J. A., Berti W. R. In situ soil treatments to reduce the phyto- and bioavailability of lead, zinc, and cadmium. *J. Environ. Qual.* 2004, V. 33, P. 522–531.
 30. Burgstaller W., Schinner F. Leaching of metals with fungi. *J. Biotechnol.* 1993, V. 27, P. 91–116.
 31. Fomina M., Hillier S., Charnock J. M., Melville K., Alexander I. J., Gadd G. M. Role of oxalic acid over-excretion in toxic metal mineral transformations by *Beauveria caledonica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, V. 71, P. 371–381.
 32. Sayer J. A., Gadd G. M. Solubilisation and transformation of insoluble metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. *Mycol. Res.* 1997, V. 101, P. 653–661.
 33. Jaeckel P., Krauss G., Menge S., Schierhorn A., Rücknagel P., Krauss G. J. Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, V. 333, P. 150–155.
 34. Kumar K. S., Dayananda S., Subramanyam C. Copper alone, but not oxidative stress, induces copper-metallothionein gene in *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, V. 242, P. 45–50.
 35. Margoshes M., Vallee B. L. A cadmium protein from the equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, V. 79, P. 4813–4814.
 36. Howe R., Evans R. L., Ketteridge S. W. Copper-binding proteins in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 1997, V. 135, P. 123–131.
 37. Tsekova K., Galabova D., Todorova K., Ilieva S. Phosphatase activity and copper uptake during the growth of *Aspergillus niger*. *Proc. Biochem.* 2002, V. 37, P. 753–758.
 38. Tsekova K., Galabova D. Phosphatase production and activity in copper (II) accumulating *Rhizopus delemar*. *Enz. Microb. Technol.* 2003, V. 33, P. 926–931.
 39. Gromozova O. M., Voychuk S. I., Kachur T. L., Gorchev V. F., Karakhim S. A. Structural peculiarities of volutin grains in the cells of the lowest polyphosphate-accumulating eukaryotes. *Biothechnology.* 2010, V. 3, P. 55–61.
 40. Bucking H., Heyser W. Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi- and X-ray micro-analytical study. *Mycol. Res.* 1999, V. 103, P. 31–39.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕДИ, АККУМУЛИРОВАННЫХ В ГРИБНЫХ КОЛОНИЯХ В ПРИСУТСТВИИ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ МИНЕРАЛОВ

М. А. Фомина

Институт микробиологии и вирусологии
НАН Украины, Киев

E-mail: M.Fomina@ukr.net

Целью работы было выяснение механизмов биоаккумуляции меди, выщелоченной из минералов грибом *Aspergillus niger*, обладающим высоким потенциалом для использования в биоремедиации благодаря способности выделять хелатирующие метаболиты и трансформировать токсичные металлы и минералы. Особое внимание уделяли химическому связыванию меди, биоаккумуляции грибовой колонией в процессе трансформации медьсодержащих минералов.

Химическое связывание меди в различных частях грибовой колонии изучали с применением методов твердофазной химии, в частности синхротронной рентгеноабсорбционной спектроскопии для получения информации о валентности исследуемого элемента и его координационном окружении. Анализ полученных спектров проводили с использованием преобразований Фурье для данных области спектроскопии протяженной тонкой структуры рентгеновского поглощения, которая соответствует осциллирующей части спектра вправо от края поглощения.

Результаты свидетельствуют о том, что грибок *A. niger* участвовал в процессах растворения медьсодержащих минералов, приводивших к выщелачиванию подвижной меди и ее последующей иммобилизации грибовой биомассой с переменной координацией меди, аккумуляцией грибовой колонией, которая зависела от возраста, физиологического и репродуктивного состояния грибового мицелия. Эти данные продемонстрировали, что медь, аккумуляция которой незрелым вегетативным мицелием во внешней зоне грибовой колонии, была координирована серосодержащими лигандами, в отличие от координирования меди фосфатными лигандами внутри зрелого конидиеобразующего мицелия в центральной зоне колонии.

Полученные результаты не только расширяют наши представления о биогеохимической роли грибов, но и могут использоваться в разработках грибовых биометаллургических технологий, в частности биоремедиации, биоаккумуляции и биовыщелачивания, и определении их надежности. Координационное окружение меди, биоаккумуляции грибовой биомассой в процессе трансформации минералов меди, является гетерогенным, изменяясь от сульфгидрильного до фосфатного.

Ключевые слова: биоремедиация, биоаккумуляция металлов, трансформация минералов, рентгеноабсорбционная спектроскопия.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ КООРДИНАЦІЙНИХ СПОЛУК МІДІ, ЩО АКУМУЛЬОВАНІ В ГРИБНИХ КОЛОНІЯХ ЗА ПРИСУТНОСТІ МІДЬВМІСНИХ МІНЕРАЛІВ

М. О. Фомина

Інститут мікробіології і вірусології
НАН України, Київ

E-mail: M.Fomina@ukr.net

Метою роботи було з'ясувати механізми біоаккумуляції міді, вилуженої з мінералів грибом *Aspergillus niger*, який має високий потенціал для використання у біоремедіації завдяки здатності виділяти хелатувальні метаболіти і трансформувати токсичні метали та мінерали. Особливу увагу приділено хімічному зв'язуванню міді, що була біоаккумуляована грибовою колонією в процесі трансформації мідьвмісних мінералів.

Хімічне зв'язування міді в різних місцях грибової колонії вивчали із застосуванням методів твердофазної хімії, зокрема синхротронної рентгеноабсорбційної спектроскопії для одержання інформації про валентність досліджуваного елемента та його координаційне середовище. Аналіз отриманих спектрів проводили, використовуючи трансформації Фур'є для даних ділянки спектроскопії протяжної тонкої структури рентгенівського поглинання, що відповідає осцилювальній частині спектра вправо від краю поглинання.

Результати свідчать про те, що грибок *A. niger* брав участь у процесах розчинення мідьвмісних мінералів, що спричинювало вилуження рухливої міді та її подальшу іммобілізацію грибовою біомасою з переменною координацією міді, аккумуляцією грибовою колонією, яка залежала від віку та фізіологічного й репродуктивного стану грибового міцелію. Ці дані продемонстрували, що аккумуляція незрілим вегетативним мицелієм у зовнішній зоні грибової колонії мідь була координувана сірковмісними лігандами, на відміну від координації міді фосфатними лігандами всередині зрілого конідієпродукувального міцелію в центральній зоні колонії.

Одержані дані не тільки розширюють уявлення про біогеохімічну роль грибів, але й можуть бути використані під час розроблення грибових біометалургічних технологій, зокрема біоочищення, біоаккумуляції й біовилуження, та визначенні їхньої надійності. Координаційне середовище міді, біоаккумуляції грибовою біомасою в процесі трансформації мінералів міді, є гетерогенним, змінюючись від сульфгидрильного до фосфатного.

Ключові слова: біоремедіація, біоаккумуляція металів, трансформація мінералів, рентгеноабсорбційна спектроскопія.

ЭМУЛЬСИФИКАЦИЯ РАСТВОРОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПОЛИДИМЕТИЛСИЛОКСАНЕ ПДМС-1000

А. Н. Рубан¹
А. И. Казанец¹
Т. В. Крупская²
В. В. Туров²

¹Клиническая офтальмологическая больница
«Центр микрохирургии глаза», Киев, Украина
²Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев

E-mail: v_turov@ukr.net

Получено 21.11.2013

С целью создания биологически инертных материалов, пригодных для применения в широком диапазоне температур, а также в агрессивных средах методами оптической микроскопии и ЯМР-криометрии изучено эмульгирование водных растворов сывороточного альбумина человека и гиалуроновой кислоты в полидиметилсилоксане ПДМС-1000. Показано, что сывороточный альбумин человека, в отличие от гиалуроновой кислоты, может формировать в силиконовой матрице стойкие эмульсии, размер капель в которых изменяется от 100 до 10000 нм. Присутствие дисперсной фазы (сывороточный альбумин человека или гиалуроновая кислота) существенно повышает температуру таяния полидиметилсилоксана, что, вероятно, обусловлено упорядоченным влиянием микро- и наночастиц биополимеров на локализованные между ними кристаллы полидиметилсилоксана.

В случае диспергирования раствора гиалуроновой кислоты в жидком силиконе наблюдаются только микрокапли водной фазы, а наноразмерные капли либо не образуются, либо присутствуют в количестве, недостаточном для регистрации методом ЯМР-криометрии.

Установлена возможность существенного влияния эмульгированного раствора сывороточного альбумина человека на температуру размораживания ПДМС-1000, что отражается на его оптических параметрах. Этот эффект регистрируется как в области низких температур, так и температуры, близкой к температуре человеческого тела, что может влиять на состояние силикона при использовании его в качестве импланта.

Ключевые слова: ¹H-ЯМР-спектроскопия, силикон, сывороточный альбумин человека, гиалуроновая кислота, кластеры воды.

Полимерные продукты на основе полидиметилсилоксанов широко применяются в медицине в качестве гидрофобных адсорбентов, обладающих высокими адсорбционными свойствами к протеиновым молекулам. Эти материалы биологически инертны и пригодны для применения в широком диапазоне температур, а также в агрессивных средах [1–3]. В последние годы полидиметилсилоксаны (силиконы) активно используют и в качестве биологически инертного, гидрофобного, нетоксичного материала для имплантации, в том числе и в витреоретинальной хирургии при исправлении дефектов, связанных с отслоением сетчатки и другими серьезными заболеваниями [4, 5]. В процес-

се эксплуатации такие импланты контактируют с тканями организма и биологически жидкостями, содержащими кроме воды растворенные полисахариды (гиалуроновая кислота) и протеины (альбумин, коллаген). При этом возможно взаимопроникновение водной и органической фаз с образованием эмульсионных систем типа «вода–масло» или «масло–вода». Эмульгированию могут способствовать произвольные движения мышц, в частности мышц глаза, частота сокращений которых в период короткого сна может достигать нескольких Гц. Механические и оптические свойства имплантов, содержащих микро- и наночастицы воды, могут существенно отличаться от свойств

исходного полимера, что может повлечь за собой послеоперационные осложнения, а это, в некоторых случаях, приводит к необходимости повторных операций.

Если размер капель дисперсной фазы в эмульсии измеряется микронами, их можно регистрировать с помощью оптической микроскопии, которая, в сочетании с компьютерной регистрацией оптического сигнала, позволяет получать увеличение больше тысячекратного. Для капель меньшего размера может быть использована ЯМР-криоскопия [6–12], основанная на изменении температуры фазового перехода «вода–лед» в зависимости от размера капель дисперсной (водной) фазы. В большинстве случаев этот метод используется для определения распределения по размерам пор или капель с радиусом 20–1 000 Å [6–11], что отвечает понижению температуры замерзания воды на 1–30 градусов. Однако незамерзающая вода в спектрах ^1H ЯМР может быть зарегистрирована и при более низких температурах [12–14]. Учитывая, что избыточная энергия кластеров воды, содержащих 100 и более молекул, как и для капель большего размера, сосредоточена на их внешней границе, диапазон измерения радиусов пор (или наночапель воды) может быть расширен вплоть до десятых долей нанометра. Измерения, выполненные на нанопористых кремнеземных и углеродных адсорбентах [12–14], показали удовлетворительное согласование данных, полученных методами низкотемпературной адсорбции азота и ЯМР-криометрии в диапазоне 0,2–100 нм.

Целью работы было изучение эмульгирования растворов сывороточного альбумина человека (САЧ) и гиалуроновой кислоты (ГК) в полидиметилсилоксане ПДМС-1000. В качестве методов исследования использовали оптическую микроскопию и ЯМР-криометрию; первый метод позволяет надежно регистрировать формирование эмульсий с размерами капель 0,1–10 мкм, а второй — 1–100 нм.

Материалы и методы

Исходными материалами служили ПДМС-1000 (Кремнийполимер, Украина) и Oxane 1000 (Bausch+Lomb, Великобритания), которые спектрально не различимы; водные растворы САЧ (10% -й раствор для инъекций); 1,5% -й водный раствор ГК, приготовленный из лиофилизированной ГК (Китай) путем растворения ее точной навески

в дистиллированной воде. Эмульгирование проводили в стеклянных бюксах объемом 10 мл, куда помещали навеску водного раствора САЧ (ГК) и 1 мл ПДМС. Полученную смесь подвергали ультразвуковой обработке (5–7 мин, 293 К). Перед спектральными и микроскопическими измерениями эмульсии выдерживали 2 сут при комнатной температуре. Эмульсии, содержащие САЧ, оставались стабильными, если их концентрация ($C_{\text{САЧ}}$) не превышала 2% мас, а ГК — при $C_{\text{ГК}} < 2\%$ мас. При больших количествах водной фракции наблюдалось расслоение эмульсий на водную и водно-органическую фазы. При этом в нижней части сосуда появлялся слой, обогащенный водой, более тяжелый, чем жидкий силикон. В случае ГК объем водной фракции был небольшим — меньше объема добавляемого водного раствора ГК. При расслоении эмульсий САЧ ($C_{\text{САЧ}} > 2\%$ мас) объем водной фазы существенно увеличивался и превосходил объем добавляемого раствора протеина, что свидетельствовало о формировании в нижней части сосуда эмульсии силикона в водном растворе САЧ.

Микрофотографирование эмульсий проводили с помощью микроскопа Primi Star (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 1000$ с использованием иммерсии.

Спектры ЯМР получали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian Mercury, США) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали 90° -зондирующий импульс длительностью 3 мкс. Температура в датчике регулировалась термоприставкой Bruker VT-1000 с точностью ± 1 град. Интенсивность сигналов определяли, измеряя площадь пиков в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации его нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов была не ниже 5%. Для предотвращения переохлаждения воды и силикона в исследуемых объектах концентрацию незамерзающей воды ($C_{\text{ув}}$) и ПДМС ($C_{\text{ПДМС}}$) измеряли при нагревании образцов, предварительно охлажденных до температуры 200 К. Время установки температуры в каждой точке составляло 5 мин, после чего образец выдерживали 10 мин при постоянной температуре. Методика ЯМР-измерений и определения термодинамических характеристик и радиуса кластеров межфазной воды подробно описана в [11–14]. Замерзшая вода (лед) и ПДМС (в виде ван-дер-ваальсовых молекулярных кристаллов) не наблюдаются в спектрах из-за значительного (на 2–4 по-

рядка) уменьшения времени поперечной релаксации твердых тел по сравнению с жидкостью [15].

Для определения геометрических размеров наночапель воды использовали уравнение Гиббса–Томсона, связывающее радиус каплей (R) со снижением температуры замерзания воды в них:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_s T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

где $T_m(R)$ — температура плавления льда, локализованного в порах радиуса R ; $T_{m,\infty}$ — температура плавления объемного льда; ρ — плотность твердой фазы; σ_s — энергия взаимодействия твердого тела (макромолекулы, лед) с жидкостью; ΔH_f — объемная энтальпия плавления. Это уравнение может быть использовано для вычисления распределения наночапель (кластеров) воды по размерам на основе температурной зависимости величины C_{uw} , полученной методом ^1H ЯМР-спектроскопии с послойным вымораживанием воды, когда применение других методов анализа структурных характеристик наночапель воды затруднительно [12, 13]. Для практического использования уравнение (1) можно представить в виде $\Delta T_m = k/R$, в котором константа k для полимерных систем, содержащих воду, близка к $50 \text{ K}\cdot\text{nm}$, что для пористых тел подтверждается сопоставлением распределений, полученных методом ЯМР-криометрии и низкотемпературной адсорбции азота [12, 13]. Следует отметить, что точность определения радиусов каплей методом ЯМР-криометрии зависит от точности определения температуры, которая в большинстве ЯМР-экспериментов не превышает ± 1 град. Тогда верхним пределом измерения радиуса каплей является $R = 200 \text{ nm}$.

Параллельно проводили измерения с использованием оптической микроскопии, что позволяет определить радиус каплей в дисперсионной среде, размер которых составляет от долей нм до 10 мкм .

Результаты и обсуждение

Микрофотографии эмульсий водного раствора САЧ в силиконе при различных концентрациях водной фазы в диапазоне 1–8% мас приведены на рис. 1. На фотографиях регистрируются микрокапли водной фазы, диаметр большинства из которых на-

ходится в диапазоне 1–3 мкм. С ростом концентрации эмульсии количество каплей в зоне видимости возрастает, причем преимущественно за счет роста числа каплей с диаметром 1–2 мкм. В эмульсиях, склонных к расслаиванию ($C_{САЧ} = 4\text{--}8\%$ мас), наблюдается слияние отдельных каплей, которое приводит к появлению участков с неоднородными оптическими характеристиками, особенно заметными при $C_{САЧ} = 8\%$ мас (рис. 1, з).

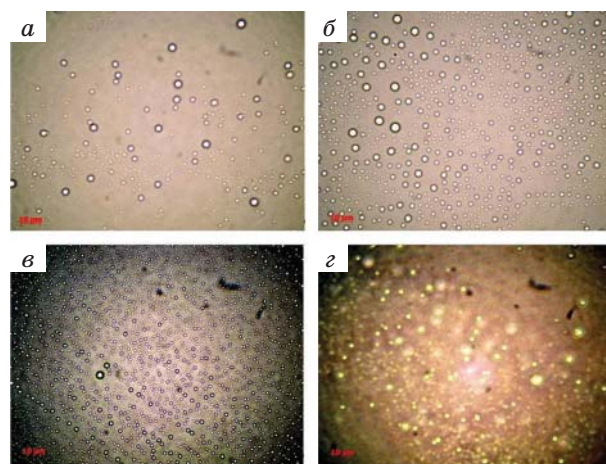


Рис. 1. Микрофотографии эмульсий САЧ в силиконовом масле ПДМС-1000 при концентрации водной фазы:

а — 1% мас; б — 2% мас; в — 4% мас; з — 8% мас

Спектры ^1H ЯМР водной фазы эмульсии раствора САЧ в ПДМС приведены на рис. 2. Химические сдвиги воды измеряли относительно сигнала протонов ПДМС, принятого за 0 м. д. При $C_{САЧ} = 1\%$ мас химический сдвиг воды составляет 5 м. д. и слабо зависит от температуры. С понижением температуры интенсивность сигнала воды уменьшается (из-за ее замерзания) и перестает регистрироваться в спектрах при $T < 260 \text{ K}$. Близкие значения химического сдвига наблюдаются и для более концентрированных эмульсий. С ростом концентрации эмульсии интенсивность сигнала воды растет.

Как отмечалось выше, при $C_{САЧ} = 4\%$ мас эмульсия расслаивается на преимущественно водную и силиконовую фазы, при этом в спектрах появляются два сигнала воды с несколько различающимися значениями химических сдвигов, которые отвечают двум возможным эмульсионным системам — «вода–масло» (более интенсивный сигнал) и «масло–вода» (рис. 2, $C_{САЧ} = 4\%$ мас). Величина химического сдвига воды отвечает сильноассоциированной воде (молекулы ко-

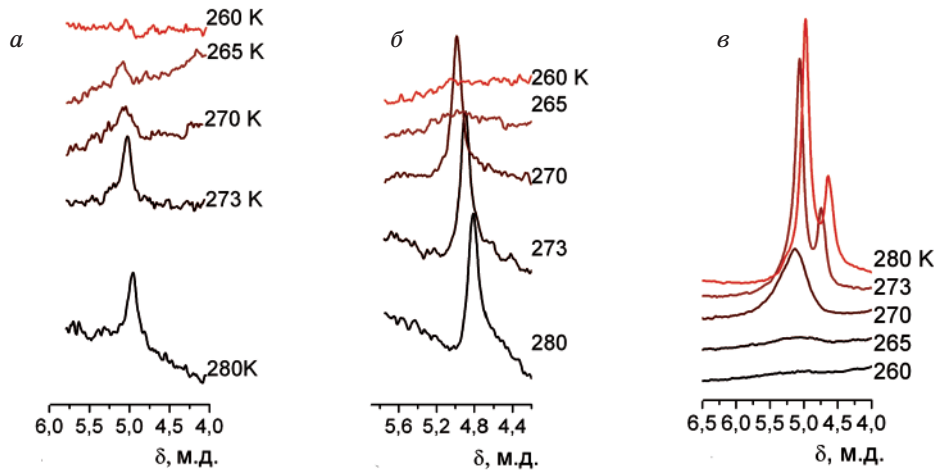


Рис. 2. Снятые при разной температуре спектры ^1H ЯМР водной фракции эмульсии раствора САЧ в ПДМС-1000: а — 1% мас; б — 2% мас; в — 4% мас САЧ

торой принимают участие в формировании двух и более водородных связей), близкой по структуре к жидкой воде [12–14].

Исследование замороженных водных растворов САЧ с разной концентрацией [16, 17] показывает, что его молекулы способны связывать значительное количество воды, которая локализуется внутри глобул в пустотах, сформированных близко расположенными фрагментами биополимерных цепей. Такая вода является сильносвязанной и может не замерзнуть вплоть до 200 К. Тем не менее, в рамках проведенных экспериментов сильносвязанная вода не регистрируется, что обусловлено необходимостью измерять сигнал воды на фоне значительно более интенсивного (на два порядка) сигнала метильных групп ПДМС. Поэтому можно считать, что регистрируемый сигнал относится преимущественно к микронным и субмикронным каплям раствора САЧ, находящегося в виде эмульсии в ПДМС.

На рис. 3, а приведена зависимость изменения концентрации незамерзающей воды от температуры, б — рассчитанные на их основе, в соответствии с формулой (1), распределения по радиусам нанокapлей дисперсной фазы. Поскольку количество экспериментальных точек в температурном интервале уменьшения интенсивности сигнала воды от своего максимального значения до нуля было ограничено, для получения более наглядных распределений к имеющимся на рис. 3, а точкам в диапазоне температур $265 < T < 273$ К добавляли несколько виртуальных точек, лежащих на сглаженных кривых $C_{uw}(T)$ через 1–2 градуса.

На полученных распределениях $\Delta C_{uw}(R)$ могут быть выделены три–четыре макси-

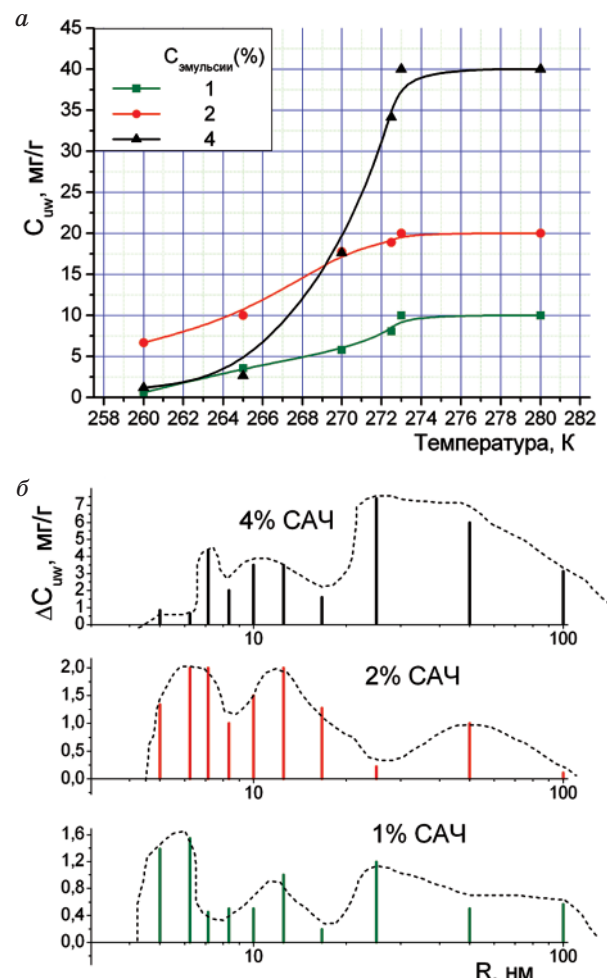


Рис. 3. Зависимость концентрации незамерзающей воды от температуры при разном содержании дисперсной фазы в эмульсиях водного раствора САЧ (а) и построенные на их основе распределения по радиусам нанокapлей воды (б)

му, отвечающих преимущественному формированию нанокapель определенного размера. В области капель субмикронного размера ($R = 30\text{--}100$ нм) интенсивность и форма максимума зависят от концентрации эмульсии. Максимальная масса капель такого размера фиксируется в эмульсии, содержащей 4% мас САЧ. В наиболее разбавленной эмульсии повышено содержание нанокapель с радиусом $R < 7$ нм. С ростом концентрации дисперсной фазы до 2% мас возрастает максимум с $R = 9\text{--}15$ нм.

Снятые при разной температуре спектры ^1H ЯМР ПДМС приведены на рис. 4. Сигнал метильных групп наблюдается в виде одиночного сигнала неправильной гауссовской формы с химическим сдвигом $\delta_{\text{H}} = 0$ м. д. Искажение формы сигнала обусловлено неоднородностью образца. В области $\delta_{\text{H}} = 5$ м. д. также регистрируется слабоинтенсивный сигнал воды, который при более высокой чувствительности прибора показан на рис. 3. На рис. 5 приведена температурная зависимость концентрации незамерзшей части ПДМС в процессе оттаивания образцов, предварительно охлажденных до 200 К. Кривая размораживания $[C_{\text{ПДМС}}(T)]$ имеет сложный вид. На ней регистрируются две области подъема в температурных диапазонах $230 < T < 240$ К и $260 < T < 280$ К, что свидетельствует о возможности совместного существования твердой и жидкой фаз силикона в широком диапазоне температур. Области роста $C_{\text{ПДМС}}$ разделены плато или участком более медленного роста интенсивности сигнала при повышении температуры

($240 < T < 260$ К). В этом диапазоне температур практически не наблюдается таяние замерзшего ПДМС. Можно предположить, что при $T > 240$ К в жидкой фазе силикона (примерно 75% от общего количества ПДМС-1000) присутствуют кристаллические формы твердого ПДМС, полное таяние которых происходит только при 280 К.

Как следует из данных рис. 5, процесс размораживания ПДМС существенно зависит от количества эмульсионной фазы, что особенно наглядно проявляется при $C_{\text{САЧ}} = 4\%$ мас. В присутствии дисперсной фазы температура размораживания ПДМС-1000 может возрастать на 20–30 градусов. При этом существенно расширяется температурная область совместного существования жидкой и твердой фаз силикона. Ранее подобный эффект наблюдался нами при изучении эмульгирования раствора гиалуроновой кислоты в силиконе ПДМС-5700 [18]. Поскольку плавление молекулярных кристаллов сопровождается эндотермическим эффектом, стабилизация твердой фазы силикона может быть связана с наличием компенсирующей его рост энтропии коллоидной системы.

В отличие от раствора САЧ, эмульсификация раствора ГК в ПДМС-1000 происходит значительно хуже. Даже в системе, содержащей 1% мас раствора ГК, после суток оттаивания визуально фиксируется наличие объемной водной фазы. На рис. 6 представлены микрофотографии ПДМС-1000 после диспергирования в нем раствора ГК. Эмульсия стабильна только при $C_{\text{ГК}} = 0,5\%$

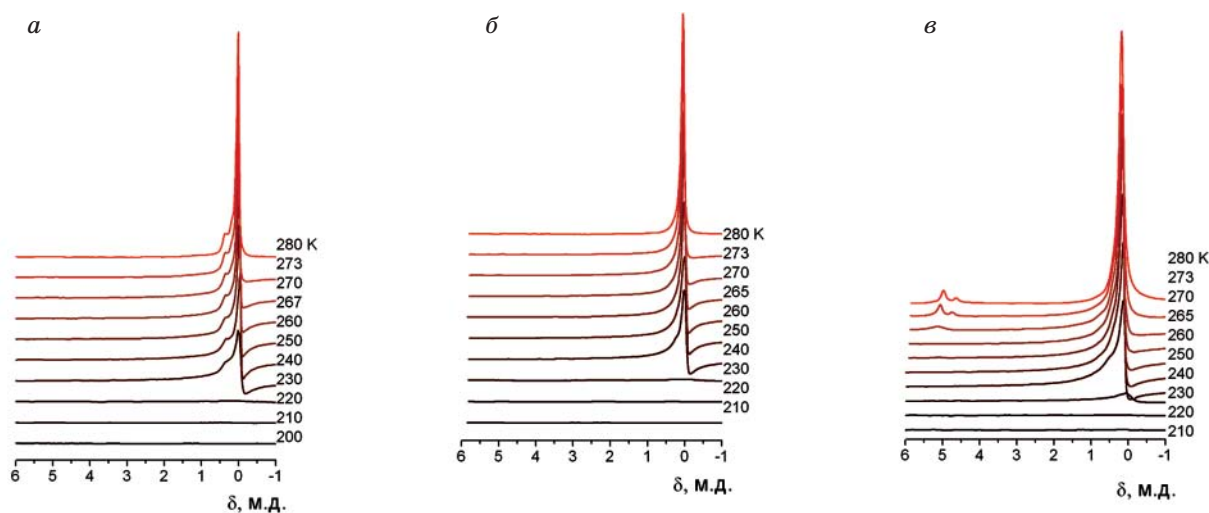


Рис. 4. Снятые при разной температуре спектры ^1H ЯМР ПДМС-1000, содержащие разное количество диспергированного раствора САЧ: 1% (а); 2% (б); 4% (в)

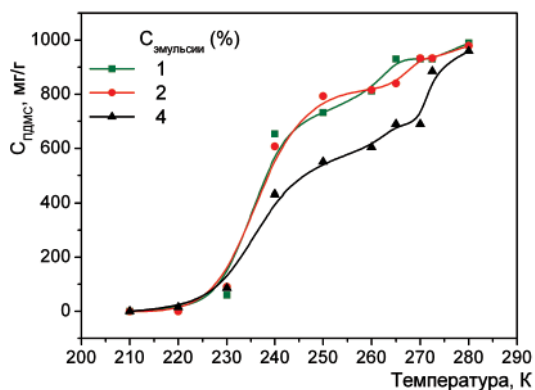


Рис. 5. Температурная зависимость концентрации незамерзшей фазы ПДМС-1000, снятая при разной концентрации диспергированного раствора САЧ

мас. В остальных случаях микроскопические исследования проводили на более легкой фракции коллоида, расположенной в верхней части сосуда. Установлено, что рост количества микрокапель водной фазы в поле зрения и их средние размеры слабо коррелируют с количеством эмульгированного раствора ГК. Вероятно, способность эмульсий «ПДМС–раствор биополимеров» существенно зависит от вязкости силикона, поскольку изученное ранее [18] эмульгирование раствора ГК в более вязком силиконе (ПДМС-5700) проходит без расслаивания вплоть до концентрации дисперсной фазы, равной 4% мас.

На рис. 7 приведены снятые при разной температуре спектры метильных групп ПДМС-1000 и построенная на их основе

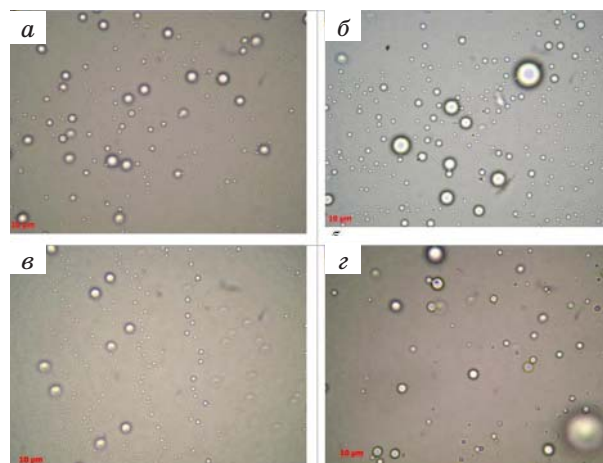


Рис. 6. Микрофотографии эмульсий ГК в силиконовом масле ПДМС-1000 при концентрациях водной фазы: а — 0,5% мас; б — 2% мас; в — 4% мас; г — 8% мас

зависимость концентрации незамерзшего силикона от концентрации дисперсной фазы (рис. 8). Вид кривых зависимости $C_{ПДМС}(T)$ аналогичен представленным на рис. 5, где наблюдаются два участка размораживания ПДМС в температурных интервалах $230 < T < 240$ К и $260 < T < 280$ К. Очевидно, отсутствие корреляции формы кривой с концентрацией эмульсии обусловлено тем, что в рабочей области ампулы, содержащей эмульсию, сохраняется приблизительно одинаковое соотношение ПДМС и водной эмульсии ГК. При этом объемная фаза раствора ГК не проявляется в спектрах из-за ее малого объема и локализации на дне измерительной ампулы, вне зоны регистрации сигнала ЯМР.

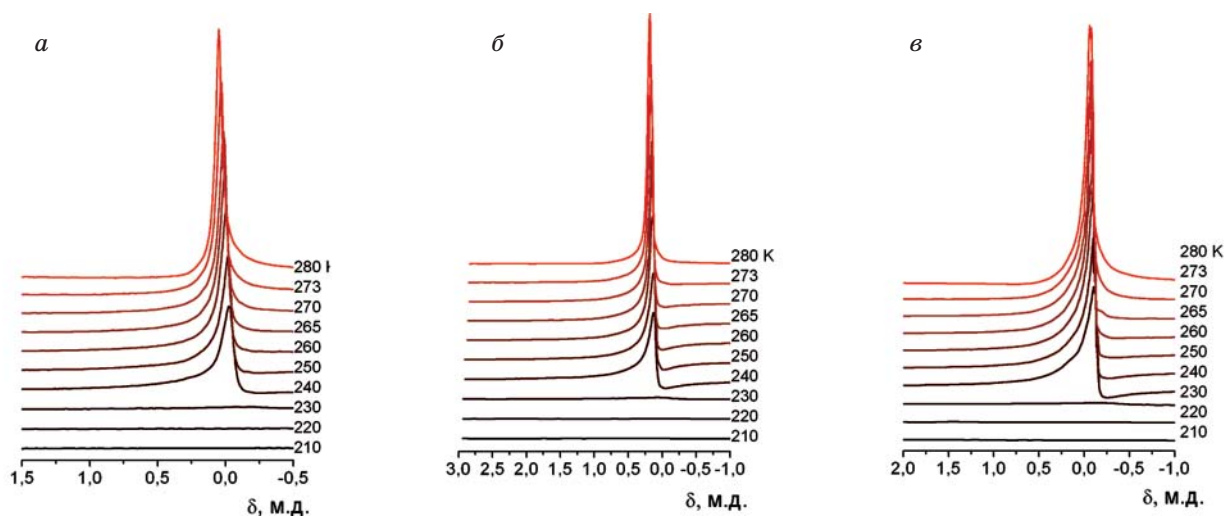


Рис. 7. Снятые при разной температуре спектры метильных групп 1H ЯМР ПДМС-1000, содержащие разное количество диспергированного раствора ГК: 0,5% (а); 2% (б); 8% (в)

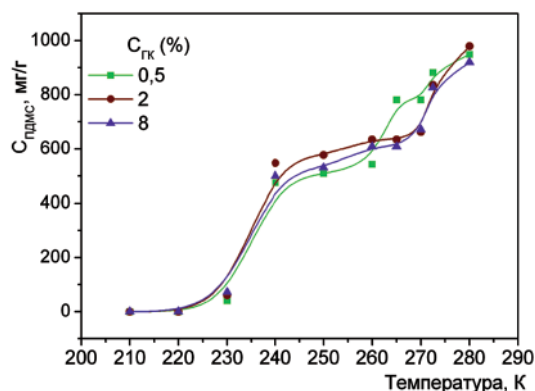


Рис. 8. Температурная зависимость концентрации незамерзшей фазы ПДМС-1000, снятая при разной концентрации диспергированного раствора ГК

Замерзший силикон с диспергированными в нем микрокаплями биополимерных эмульсий представляет собой гидрофобный материал с развитой поверхностью, который граничит с гидрофильной поверхностью капель дисперсной фазы, находящихся в твердом или жидком состоянии. Можно предположить, что именно свойства границы раздела фаз способны влиять на температуру фазового перехода дисперсионной среды. Для проверки этого предположения была исследована система ПДМС-1000/Si-100, где силикон заполнял более половины порового пространства силикагеля Si-100, суммарный объем пор которого составлял $1,2 \text{ см}^3/\text{г}$ [13].

На рис. 9 приведены снятые при разной температуре спектры силикона в матрице SiO_2 (а), рассчитанная на их основе зависимость изменения количества незамерзшего ПДМС-1000, отнесенного к массе кремнезема (б), и взятое из [13] распределение по ра-

диусам пор силикагеля Si-100, рассчитанное на основе низкотемпературной адсорбции азота (в). Гидратированность поверхности кремнезема осуществлялась путем добавления к высушенному при 200°C кремнезему 1,5% мас воды, которая могла равномерно распределяться по поверхности, связываясь с силанольными группами, концентрация которых для Si-100 составляет 2,6 ОН-группы на 1 нм^2 [19].

Из данных рис. 9, а, б следует, что незамерзающий ПДМС-1000 присутствует во всей области изменения температуры. При этом можно выделить две температурные области ($T < 250 \text{ K}$ и $T > 250 \text{ K}$, области А и Б, соответственно), в которых существуют разные состояния адсорбированного силикона. Область А характеризуется относительно медленным ростом с температурой незамерзшего ПДМС-1000. Сравнивая интенсивность сигналов незамерзшего силикона в кремнеземной матрице (рис. 9, а) и в коллоидных системах (рис. 4 и 7), можно заключить, что количество ПДМС-1000, не замерзающего при низких температурах (область А на рис. 9, б), существенно выше. Это может быть связано с адсорбционными взаимодействиями ПДМС-1000/ SiO_2 , которые понижают температуру замерзания жидкостей.

Если предположить, что при проникновении силикона в поровое пространство силикагеля первыми заполняются поры меньшего размера (в которых выше адсорбционный потенциал), то поровое пространство Si-100, занятое силиконом, соответствует части распределения по радиусам пор, ограниченного на рис. 9, в заштрихованной областью. Как следует из данных рис. 9, б, полное плавление силикона наблюдается только при $T = 300 \text{ K}$,

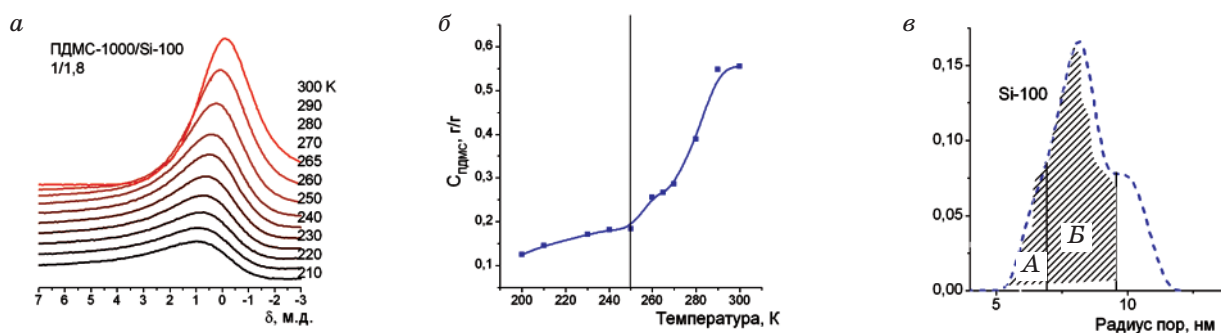


Рис. 9. Снятые при разной температуре спектры силикона: в матрице SiO_2 (а); зависимость изменения количества незамерзшего ПДМС-1000, отнесенного к массе кремнезема (б); распределение по радиусам пор силикагеля Si-100, рассчитанное на основе низкотемпературной адсорбции азота (в); А и Б: области с $T < 250 \text{ K}$ и $T > 250 \text{ K}$, соответственно

что значительно выше температуры плавления объемного силикона (область *B* на рис. 9, б). ПДМС в порах силикагеля следует рассматривать как некую фрактальную структуру, характеристические размеры которой определяются геометрией порового пространства адсорбента. Тогда есть основание полагать, что именно рост поверхности контакта силикона с гидратированной поверхностью ответственен за повышение температуры его размораживания.

Таким образом, диспергирование раствора САЧ в среде ПДМС-1000 при $C_{\text{САЧ}} < 2\%$ мас сопровождается формированием устойчивых эмульсий, в которых размер капель водной фазы может составлять от

10 мкм до 5 нм. В случае диспергирования раствора ГК в жидком силиконе наблюдаются только микрокапли водной фазы, а наноразмерные капли либо не образуются, либо присутствуют в количестве, недостаточном для регистрации методом ЯМР-криометрии.

Кроме того, обнаружена возможность существенного влияния эмульгированного раствора САЧ на температуру размораживания ПДМС-1000, что отражается на его оптических параметрах. Этот эффект регистрируется как в области низких температур, так и температуры, близкой к температуре человеческого тела, что может влиять на состояние силикона при использовании его в хирургии в качестве импланта.

REFERENCES

1. Unger K. K. Porous silica: its properties and use in column liquid chromatography. Amsterdam: Elsevier. 1979, 336 p.
2. Jesinowski T., Krysztafkiewicz A. Preparation of the hydrophilic/hydrophobic silica particles. *Colloid Surface A: Phys. Chem. Engin. Aspects*. 2002, V. 207, P. 49–58.
3. *Medical Chemistry and clinical applications of silica dioxide*. A. A. Chuiko ed. Kyiv: Naukova dumka. 2003, 415 p. (In Russian)
4. Castellarin A, Grigorian R., Bhagat N., Priore L. D., Zarbin M. A. Vitrectomy with silicone oil infusion in severe diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 2003, V. 87, P. 318–321.
5. Kirchof B., Tavakolian U., Paulmann H., Heimann K. Histopathological findings in eyes after silicone oil injection. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1986, V. 224, P. 34–37.
6. Strange J. H., Rahman M., Smith E. G. Characterization of porous solids by NMR. *Phys. Rev. Lett.* 1993, V. 71, P. 3589–3591.
7. Strange J. H., Allen S. G., Stephenson P. C. L., Matveeva N. P. Phase equilibria of absorbed liquids and the structure of porous media. *Magn. Reson. Imag.* 1996, V. 14, P. 963–965.
8. Strange J. H., Mitchell J., Webber J. B. W. Pore surface exploration by NMR. *Magn. Reson. Imag.* 2003, V. 21, P. 221–226.
9. Aksnes D. W., Kimtys L. H and H NMR studies of benzene confined in porous solids: melting point depression and pore size distribution. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 2004, V. 25, P. 146–152.
10. Khokhlov A. G., Valiullin R. P., Stepovich M. A., Kärger J. NMR crioporometry and adsorption methods for characterization of pore size distribution in porous silica. *Kolloidnyj zh.* 2008, 70(4), 550–557. (In Russian).
11. Petrov O. V. Furo I. NMR cryoporometry: Principles, application and potential. *Progr. NMR.* 2009, V. 54, P. 97–122.
12. Gun'ko V. M., Turov V. V., Gorbik P. P. Water at the interfaces. *Kyiv: Naukova dumka.* 2009, 694 p. (In Russian).
13. Turov V. V., Gun'ko V. M. Clustered water and ways of its applications. *Kyiv: Naukova dumka.* 2011, 313 p. (In Russian).
14. Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M., Zarko V. I., Leboda R., Goncharuk E. V., Novza A. A., Turov A. V., Chuiko A. A. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic Interfaces. *Adv. Colloid. Interf. Sci.* 2005, V. 118, P. 125–172.
15. Pople J. A., Schneider W. G., Bernstein H. J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. New York: McGraw-Hill Book Company. 1959. P. 165–180.
16. Turov V. V., Rugal A. O., Gun'ko V. M. Supramolecular structures with participants of blood polypeptides and highly dispersed silica particles. *Chem. Phys. and Technol. of Surface.* 2007, V. 2, P. 357–391. (In Russian).
17. Turov V. V., Galagan N. P., Rugal A. P. Sugars influence on serum albumin hydration at low temperatures. *Biophysics.* 2007, 52(5), 780–784. (In Russian).
18. Ruban A. M., Kazanets A. I., Krupskaya T. V., Turov V. V. Interphase interaction of vitreoretinal silicone with a solution of hyaluronic acid. *Med. Chem.* 2012, V. 14, P. 44–47. (In Ukrainian).
19. Tertykh V. A., Belyakova L. A. Chemical reactions with silica surface participant. *Kyiv: Nauk. dumka,* 1991, 246 p. (In Russian).

ЕМУЛЬСИФІКАЦІЯ РОЗЧИНІВ СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ ЛЮДИНИ ТА ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ В ПОЛІДИМЕТИЛСИЛОКСАНІ ПДМС-1000

*A. M. Рубан*¹
*A. I. Казанець*¹
*T. V. Крупська*²
*V. V. Туров*²

¹Клінічна офтальмологічна лікарня
«Центр мікрохірургії ока», Київ, Україна

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

E-mail: *v_turov@ukr.net*

З метою створення біологічно інертних матеріалів, придатних для застосування в широкому діапазоні температур, а також в агресивних середовищах методами оптичної мікроскопії та ЯМР-кріометрії вивчено емульгування водних розчинів сироваткового альбуміну людини і гіалуронової кислоти в полідиметилсилоксані ПДМС-1000. Показано, що сироватковий альбумін людини, на відміну від гіалуронової кислоти, може формувати в силіконовій матриці стійкі емульсії, розмір крапель в яких змінюється від 100 до 10 000 нм. Присутність дисперсної фази (сироваткового альбуміну людини чи гіалуронової кислоти) істотно підвищує температуру танення полідиметилсилоксану, що, ймовірно, зумовлено впорядкованим впливом мікро- та нанокрапель біополімерів на локалізовані між ними кристали ПДМС.

У разі диспергування розчину гіалуронової кислоти в рідкому силіконі спостерігаються тільки мікрокраплі водної фази, а нанорозмірні краплі або не утворюються, або присутні в кількості, недостатній для реєстрації методом ЯМР-кріометрії.

Встановлено можливість істотного впливу емульгованого розчину сироваткового альбуміну людини на температуру танення ПДМС-1000, що виявляється на його оптичних параметрах.

Цей ефект реєструється як у ділянці низьких температур, так і температури, близької до температури тіла людини, що може впливати на стан силікону в разі використання його як імплантанта.

Ключові слова: ¹H ЯМР-спектроскопія, силікон, сироватковий альбумін людини, гіалуронова кислота, кластери води.

THE EMULSIFICATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN AND HYALURONIC ACID SOLUTIONS IN POLYDIMETHYLSILOXANE PDMS-1000

*A. M. Ruban*¹
*A. I. Kazanets*¹
*T. V. Krupskaya*²
*V. V. Turov*²

¹Clinical eye hospital «Eye microsurgery
center», Kyiv, Ukraine

²Chuiko Institute of Surface Chemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: *v_turov@ukr.net*

To create a biologically inert material suitable for use in a wide range of temperatures and in corrosive environments, the methods of optical microscopy and NMR-cryometry were used for investigation of emulsification of solutions of human serum albumin and hyaluronic acid in polymethylsiloxane PDMS-1000. Unlike hyaluronic acid, human serum albumin forms persistent emulsions in the silicon matrix, whose size of the droplets varies from 100 to 10 000 nm. The presence of dispersed phase (human serum albumin or hyaluronic acid) increases significantly melting temperature of polydimethylsiloxane. It is probably due to ordering influence of micro- and nanodrops of biopolymers on PDMS crystals localized between them.

In case of dispersion of hyaluronic acid solution in liquid silicone only microdroplets of the aqueous phase are observed and nanosized droplets either didn't form or were in amount not sufficient to be detected by NMR cryometry.

The possibility of a significant influence of human serum albumin emulsified solution on PDMS-1000 defrosting temperature is revealed, that is impacted on its optical parameters. This effect is recorded both in the low temperature region and at temperature close to human body, which might influence on silicone state when it is used as implant.

Key words: ¹H NMR-spectroscopy, silicone, human serum albumin, hyaluronic acid, water clusters.

УДК 547.953:615.012:665:372

ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ ИЗ СУХИХ ЛЕЦИТИНОВ СОИ И ПОДСОЛНЕЧНИКА НА ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Г. В. Дзяк¹С. М. Шулга²М. Адаб³А. Л. Дроздов³И. С. Глух²¹ГУ «Днепропетровская медицинская академия» МЗ Украины»,
Днепропетровск²ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев³НИИ медико-биологических проблем ГУ «ДМА МЗ Украины»,
Днепропетровск

E-mail: shulga5@i.ua

Получено 29.01.2014

Сухой лецитин, представляющий собой смесь полярных фосфолипидов, нейтральных липидов, свободных жирных кислот, гликолипидов, углеводов и незначительного количества влаги, является перспективным объектом для создания биопрепаратов-гепатопротекторов. Одно из проявлений его фармакологической активности — влияние на состав липидов сыворотки, в частности на транспортные формы этих липидов.

Исследовано влияние обезжиренных сухих лецитинов сои и подсолнечника на степень гиперлипотеинемии и других нарушений липидного обмена. Показано, что обезжиренный сухой лецитин сои проявлял гипохолестеролемическую активность по отношению ко всем изученным формам холестерина сыворотки крови. Обезжиренный сухой лецитин подсолнечника оказывал аналогичное, но несколько менее выраженное воздействие. Однако снижение концентрации холестерина липопротеидов высокой плотности под действием лецитина подсолнечника развивалось раньше, чем лецитина сои.

Показано, что оба лецитина предотвращали развитие дислипотеинемии, вызываемой применением тетрахлорметана.

Ключевые слова: биопрепараты лецитина сои и подсолнечника, липиды сыворотки крови.

В настоящее время на фармацевтическом рынке представлено большое количество симптоматических лекарственных препаратов для лечения поражений печени. Однако продолжают оставаться актуальными поиск, разработка и внедрение в медицинскую практику новых лекарственных средств. В первую очередь это обусловлено высокими требованиями к их безопасности, поскольку клетки печени, в которых происходит биодеградация ксенобиотиков, максимально чувствительны к их токсическому действию.

Сравнительные характеристики воздействия на печень сухих обезжиренных лецитинов сои и подсолнечника в условиях интоксикации тетрахлорметаном были представлены в предыдущей работе [1].

Заболевания печени различной этиологии проявляются на фоне нарушений регуляции метаболических реакций, активации факторов воспаления и процессов деструкции. Поэтому важным свойством современных лекарственных средств является способность проявлять широкий спектр

фармакологической активности, включая нормализацию метаболических процессов, детоксицирующее, мембраностабилизирующее, антиоксидантное действие и, как следствие, замедление развития цирроза печени. Препараты с подобным спектром действия особенно перспективны для профилактики и лечения токсических, метаболических и вирусных гепатитов, приводящих к циррозу и способствующих появлению новообразований печени. Кроме того, разработка комплексных способов восстановления функций печени, в частности биопрепаратами, актуальна для поиска средств, обладающих высокой эффективностью и низкой токсичностью.

Известно, что в плазме (сыворотке) крови присутствуют три основных класса липидов: холестерол и его эфиры, триглицериды и фосфолипиды. Наибольшее стимулирующее значение в атерогенезе имеет повышение уровней холестерола и триглицеридов при снижении содержания фосфолипидов. Основной транспортной формой липидов являются, как известно, липопротеиды, в ко-

торых холестерол, триглицериды и фосфолипиды связаны с апопротеинами [2, 3–6].

Транспорт липидов осуществляется в среде растворителя, где они образуют сложные шароподобные (псевдомицеллярные) структуры, включающие молекулы протеинов. Уровень фосфолипидов играет существенную роль в процессах обмена и транспорта холестерола. Регулярное применение лецитина приводит к снижению уровня холестерола в крови и стенках кровеносных сосудов, а также повышает способность желчных кислот выводить это соединение из кровотока [4, 7, 8].

В основе воздействия лецитина на метаболизм липидов лежит природный антагонизм фосфатидилхолина и других фосфолипидов и холестерола. Уже на уровне цитоплазматических мембран проявляется способность холестерола повышать их жесткость и увеличивать твердость, в то время как фосфолипиды делают их более текучими и жидкими, т. е. увеличивают их функциональную активность. Вследствие метаболических процессов, протекающих в мембранах, в первую очередь гепатоцитов, образуются липопротеиды высокой плотности (HDL), проявляющие антиатеросклеротическую активность.

В последние годы особый интерес проявляется к препаратам, имеющим широкий спектр фармакологической активности и полученным из природных источников. Такие биопрепараты отличаются многокомпонентным составом и зачастую высоким профилем безопасности [4, 9]. В качестве перспективного лечебного средства начинают активно использовать как сухие, так и жидкие лецитины растительного происхождения.

Лецитин сои широко применяется как эмульгатор и антиоксидант в пищевой, парфюмерной и химической отраслях промышленности, а также как гепатопротектор в фармации. Лецитин подсолнечника рассматривают как близкий аналог лецитина сои, однако его свойства и биологическая активность практически не изучены. Целью работы было исследование влияния лецитина подсолнечника и сои на концентрацию основных транспортных форм липидов сыворотки крови у интактных крыс и животных, интоксцированных тетрахлорметаном.

Материалы и методы

В исследованиях использовали: тетрахлорметан, ч. д. а., ГОСТ 20288-74, производство АО «Реахим» (Россия), сухой

обезжиренный лецитин подсолнечника пищевой (SFL), производство ПАО «ДОИРЕА» (Украина), лецитин сои сухой обезжиренный пищевой SOLEC (SL), производство SOLAE LLC (США).

Эксперименты на животных выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренных I–IV Национальными конгрессами по биоэтике (Киев, 2001–2011 гг.) и согласованных с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, Страсбург, 1985 [10]. Протокол опытов был согласован Комиссией по биоэтике НИИ медико-биологических проблем ГУ «Днепропетровская медицинская академия» МЗ Украины.

Исследования проводили на 170 белых крысах самцах массой 190–240 г, которых содержали на стандартной диете при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Методом случайной выборки животных разделили на две группы.

В 1-й группе животные были разделены на 3 подгруппы:

1 — интактные — контроль;

2 — крысы, которым на протяжении 14 сут вводили «липидную» добавку в объеме 10% суточного рациона в виде подкожного свиного сала;

3 — крысы, которым в условиях «липидной» добавки внутрижелудочно вводили лецитин в виде 30%-й суспензии (2,5 г/кг) в день.

Животным 1-й и 2-й подгрупп сравнения вводили внутрижелудочно, в эквивалентном количестве, изотонический раствор хлористого натрия. Через две недели крыс декапитировали под эфирным наркозом и получали сыворотку крови для исследований. Определяли концентрацию общего холестерола, триглицеридов, холестерола липопротеидов высокой плотности и холестерола липопротеидов низкой плотности общепринятыми методами [11–13].

Во второй группе исследовали воздействие лецитинов сои и подсолнечника на липиды сыворотки крови в условиях патологии печени. Экспериментальные животные были разделены на 3 подгруппы:

1 — интактные (контроль);

2 — крысы, которым внутрижелудочно вводили лецитин подсолнечника в виде 20%-й суспензии (доза 2,5 г/кг) в день и тетрахлорметан;

3 — крысы, которым внутривентриально вводили лецитин сои в виде 20% -й суспензии (2,5 г/кг) в день и тетрахлорметан.

Гепатотоксичность вызывали путем внутривентриального введения тетрахлорметана, разведенного в два раза в растительном масле (2,5 г/кг) на 1-е, 3-и и 7-е сут наблюдений. Исследуемые показатели регистрировали в начале эксперимента и на 3-и, 7-е и 14-е сут у контрольных животных и крыс, которым ежедневно внутривентриально вводили 20% -ю суспензию лецитина сои или подсолнечника (по 2,5 г/кг массы тела) за 2 ч до гепатотоксина. Контрольной группе крыс ежедневно внутривентриально вводили изотонический раствор хлористого натрия — 100 г/кг. Биологический материал для исследований получали спустя 2–3 ч после последнего введения лецитинов, тетрахлорметана или изотонического раствора натрия хлорида.

Для оценки состояния липидного и липопротеидного (протеиново-жирового) обмена при использовании обезжиренных сухих лецитинов сои и подсолнечника определяли концентрацию: общего холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеидов высокой плотности (HDL) и холестерина липопротеидов низкой плотности (LDL) в сыворотке крови, а также коэффициент атерогенности (КА).

При этом граница обычных значений коэффициента атерогенности для крыс устанавливалась в пределах 3 единиц [2–3].

Результаты наблюдений обрабатывали статистически с применением *t*-критерия Стьюдента [14].

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что на протяжении двух недель эксперимента ни в контрольных группах, ни при введении 10% -й «липидной» добавки или лецитинов, а также тетрахлорметана гибели

животных не наблюдалось. Результаты определения влияния SFL на показатели липидного обмена приведены в табл. 1.

Введение в рацион экспериментальных животных 10-й «липидной» добавки приводило к изменению регистрируемых показателей. Уровень общего холестерина и триглицеридов достоверно увеличивался на 110,0% и 113,4%, соответственно. Определение соотношения уровня холестерина HDL и холестерина LDL показало, что при статистически значимом росте обоих классов липопротеидов (на 330,0% и 157,1% соответственно), преобладало увеличение антиатерогенных HDL.

Введение крысам SFL на фоне 10% -й «липидной» добавки приводило к аналогичным изменениям регистрируемых показателей. Однако, в отличие от крыс, получавших обогащенный жирами рацион, дополнительно статистически значимо возрастала концентрация общего холестерина (на 60,5%), холестерина HDL (на 85,7%) и холестерина LDL (на 101,9%), а содержание триглицеридов достоверно не отличалось.

На основании этих данных можно сделать вывод о том, что при повышении содержания в рационе интактных животных жиров лецитин выступает в качестве дополнительной, обогащенной липидами, биологически активной пищевой добавки.

Учитывая особую роль печени в липидном обмене, было определено сравнительное влияние лецитинов сои и подсолнечника на состав липидов сыворотки крови в условиях введения тетрахлорметана.

Концентрация триглицеридов в сыворотке крови (СК), является одним из основных показателей липидного обмена. Увеличение концентрации триглицеридов установлено при использовании лекарственных средств стероидной природы, этанола при вирусных гепатитах, алкогольном и биллиарном

Таблица 1. Влияние лецитина подсолнечника на показатели липидного обмена ($M \pm m$, $n = 6-11$)

Группы животных	Исследуемые липиды (ммоль/л)			
	Общий холестерол	Триглицериды	Холестерол HDL	Холестерол LDL
Контроль	0,40 ± 0,03	0,49 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,21 ± 0,06
10% -я «липидная» добавка	1,24 ± 0,14*	1,07 ± 0,09*	0,21 ± 0,03*	0,54 ± 0,07*
«Липидная» добавка + лецитин	1,99 ± 0,16* **	1,12 ± 0,10*	0,39 ± 0,03* **	1,09 ± 0,11* **

Примечания: * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем; ** — $P < 0,05$ по сравнению с крысами, которые в течение 2 недель получали в рационе 10% -ю «липидную» добавку.

циррозе, внепеченочной обтурации желчных ходов и др. Однако в терминальной стадии поражения паренхимы печени установлено снижение этого параметра [11].

Результаты наблюдений (табл. 2) показали, что в условиях интоксикации тетрахлорметаном на 14-е сут интоксикации отмечалось существенное (на 37,9%) уменьшение содержания триглицеридов в СК.

Введение SL в условиях интоксикации тетрахлорметаном приводило к возрастанию концентрации триглицеридов на 56,0% и 30,6% на 3-и и 14-е сут по сравнению с применением одного тетрахлорметана.

На 7-е сут после введения SFL содержание триглицеридов статистически значительно возрастало на 62,3% и 136,1%, соответственно, при сопоставлении с воздействием тетрахлорметана, что существенно превышало как контрольные величины, так и эффекты SL.

Анализ полученных результатов изменений концентрации триглицеридов показывает, что используемый способ интоксикации печени тетрахлорметаном на 14-е сут приводит к ее истощению. Об этом свидетельствует существенное снижение концентрации триглицеридов по сравнению с контролем. При этом SL повышал ее уровень до контроля, тогда как SFL резко его увеличивал, начиная с 7-х сут после введения.

Содержание общего холестерина возрастает при ряде заболеваний и использовании фармпрепаратов [3, 11].

Результаты исследований общего холестерина показали, что в условиях применения тетрахлорметана его концентрация на 3-и, 7-е и 14-е сут наблюдений достоверно увеличивалась по сравнению с контролем на 14,4%, 31,3% и 37,9%, соответственно (табл. 3).

Введение SL приводило вначале к стабилизации данного показателя на несколько

более низком (но превышающем контрольные значения) уровне, а на 14-е сут — к его уменьшению на 27,7% по сравнению с введением тетрахлорметана. SFL в меньшей степени влиял на уровень общего холестерина.

Возможно, подобные неоднозначные сдвиги содержания общего холестерина связаны с сочетанием процессов истощения его пула в органах (прежде всего в печени) и непосредственным замещением при введении лецитинов.

При патологии, в частности сердечно-сосудистой системы, особое значение имеет определение в сыворотке крови классов липопротеидов, различающихся по физико-химическим свойствам.

Концентрация холестерина HDL или α -липопротеидов возрастает в условиях интоксикации, первичного биллиарного цирроза печени, хронического гепатита, алкоголизма и др. Со снижением его концентрации существенно возрастает риск атеросклеротических изменений и ишемической болезни сердца [3, 11].

При интоксикации тетрахлорметаном на 14-е сут отмечалось резкое возрастание (на 218,2 %) концентрации холестерина HDL (табл. 4).

По сравнению с действием тетрахлорметана введение SL приводило к достоверному увеличению на 114,3% уровня холестерина HDL на 7-е сут и снижению на 20,0% — на 14-е. Аналогичный, но несколько менее выраженный эффект наблюдался в условиях двухнедельного введения SFL. Следовательно, лецитины проявляют гипохолестеролемическое действие относительно липопротеидов высокой плотности при введении тетрахлорметана.

Определение уровня холестерина LDL, проявляющих «атерогенную» активность, является неотъемлемым компонентом оценки риска возникновения патологии сердечно-сосудистой системы [3, 9, 11, 14].

Таблица 2. Изменения концентрации триглицеридов (ммоль/л) на фоне действия лецитинов при интоксикации тетрахлорметаном ($M \pm m$, $n = 6-10$)

Группы животных	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Контроль	0,62 ± 0,11	0,58 ± 0,04	0,58 ± 0,04
Тетрахлорметан	0,50 ± 0,06	0,61 ± 0,11	0,36 ± 0,02*
Тетрахлорметан+SL	0,78 ± 0,05**	0,57 ± 0,04	0,47 ± 0,03* **
Тетрахлорметан + SFL	0,59 ± 0,09	0,99 ± 0,10 * ** •	0,85 ± 0,04* ** •

Примечание. Здесь и далее: * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем; ** — $P < 0,05$ по сравнению с тетрахлорметаном; • — $P < 0,05$ по сравнению с лецитином сои.

Таблица 3. Влияние лецитинов сои и подсолнечника на концентрацию (ммоль/л) общего холестерина в сыворотке крови при интоксикации тетрахлорметаном ($M \pm m$, $n = 6-10$)

Группы животных	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Контроль	$1,53 \pm 0,07$	$1,28 \pm 0,19$	$1,21 \pm 0,09$
Тетрахлорметан	$1,75 \pm 0,07^*$	$1,68 \pm 0,06^*$	$1,91 \pm 0,12^*$
Тетрахлорметан + SL	$1,86 \pm 0,07^*$	$2,02 \pm 0,24^*$	$1,38 \pm 0,10^{**}$
Тетрахлорметан + SFL	$1,90 \pm 0,17$	$1,70 \pm 0,16$	$1,73 \pm 0,12^* \bullet$

Таблица 4. Влияние лецитинов сои и подсолнечника на концентрацию (ммоль/л) холестерина HDL в сыворотке крови при интоксикации тетрахлорметаном ($M \pm m$, $n = 6-8$)

Группы животных	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Контроль	$0,65 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$
Тетрахлорметан	$0,56 \pm 0,06$	$0,35 \pm 0,08$	$0,70 \pm 0,05^*$
Тетрахлорметан + SL	$0,60 \pm 0,05$	$0,75 \pm 0,08^* **$	$0,56 \pm 0,04^* **$
Тетрахлорметан + SFL	$0,56 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,05^* **$	$0,58 \pm 0,05^*$

При введении тетрахлорметана уровень холестерина LDL стабильно увеличивался на 3-и, 7-е и 14-е сут соответственно на 60,0%, 45,8% и 43,8% (табл. 5).

Введение SL на 14-е сут интоксикации приводило к достоверному уменьшению данного показателя на 42,9% по сравнению с действием тетрахлорметана. Аналогичным эффектом обладает и SFL.

Интоксикация тетрахлорметаном приводила к стабильной гиперлипотеидемии на протяжении всего эксперимента.

Оба изучаемых лецитина вызывали гипо-холестеролемический эффект практически в одинаковой степени. Однако снижение концентрации холестерина LDL при действии SFL развивалось раньше, чем SL.

Коэффициент атерогенности (КА) отражает соотношение анти- и атерогенных форм холестерина в липопротеидах сыворотки крови. В контроле он в среднем составлял $2,5 \pm 0,43$ (табл. 6).

В условиях интоксикации тетрахлорметаном этот показатель достоверно возрастал на 3-и и 7-е сут на 72,9% и 51,1%, соответственно. На 14-е сут КА, напротив, достоверно снижался на 61,7%, что, вероятно, было обусловлено резким увеличением уровня холестерина HDL на этом этапе наблюдений.

Изменение КА в условиях интоксикации тетрахлорметаном показывает преимущественное возрастание уровня атерогенных классов липопротеидов (LDL) на первых этапах (3-и и 7-е сут) эксперимента. На завершающей стадии (14 сут), напротив, преоб-

ладало повышение содержания α -липопротеидов. Возможно, это связано с липидами, «вымываемыми» тетрахлорметаном из клеточных мембран органов, включая в первую очередь печень.

По сравнению с тетрахлорметаном введение SL приводило к снижению данного показателя на 7-е сут.

Существенным отличием при введении SFL являлся тот факт, что на 14-е сут значение КА было существенно выше (на 40,5%) по сравнению с величинами, установленными во время действия SL.

Следовательно, оба лецитина блокировали развитие дислипотеидемии, вызываемой введением тетрахлорметана.

Таким образом, у крыс, получавших обогащенный жирами рацион, дополнительно статистически значимо возрастали концентрации общего холестерина (на 60,5%), холестерина HDL (на 85,7%) и холестерина LDL (на 101,9%), а содержание триглицеридов не отличалось. С повышением содержания жиров в рационе интактных животных лецитин, выступая в качестве биологически активной пищевой добавки, проявлял парадоксальное, гиперхолестеролемическое действие. При этом фосфолипиды лецитина в крови транспортировались в форме липопротеидов, что объясняет дополнительный прирост содержания холестерина HDL и холестерина LDL.

Применение SL в условиях интоксикации тетрахлорметаном приводило к возрастанию концентрации триглицеридов на 56,0%

Таблица 5. Влияние лецитинов сои и подсолнечника на концентрацию (ммоль/л) холестерина LDL в сыворотке крови при интоксикации тетрахлорметаном ($M \pm m$, $n = 6-10$)

Группы животных	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Контроль	0,60 ± 0,07	0,72 ± 0,08	0,73 ± 0,07
Тетрахлорметан	0,96 ± 0,08*	1,5 ± 0,02*	1,05 ± 0,09*
Тетрахлорметан + SL	0,92 ± 0,04*	1,00 ± 0,16 * **	0,60 ± 0,04*
Тетрахлорметан + SFL	1,07 ± 0,12*	0,61 ± 0,11* **	0,77 ± 0,12* •

Таблица 6. Влияние лецитинов сои и подсолнечника на величину коэффициента атерогенности при интоксикации тетрахлорметаном ($M \pm m$, $n = 6-8$)

Группы животных	Сроки наблюдений		
	3-и сут	7-е сут	14-е сут
Контроль	1,40 ± 0,10	2,21 ± 0,13	4,54 ± 0,21
Тетрахлорметан	2,42 ± 0,47*	3,34 ± 0,53*	1,74 ± 0,63*
Тетрахлорметан+ SL	2,19 ± 0,24*	1,66 ± 0,08 * **	1,48 ± 0,02*
Тетрахлорметан+ SFL	2,36 ± 0,18*	1,65 ± 0,08* **	2,08 ± 0,19* •

и 30,6%, соответственно, на 3-и и 14-е сут по сравнению с действием тетрахлорметана, а введение SFL приводило к росту содержания триглицеридов на 62,3% и 136,1%, соответственно, что существенно превышало концентрацию триглицеридов как в контроле, так и при введении SL.

Введение SL приводило в начальной стадии эксперимента к стабилизации концентрации общего холестерина на несколько более низком (но превышающем контрольные значения) уровне, а на 14-е сут — к его уменьшению на 27,7% ($P < 0,05$) по сравнению с концентрацией общего холестерина при введении тетрахлорметана.

SFL в меньшей степени оказывал воздействие на уровень общего холестерина по сравнению с SL. Возможно, подобные неоднозначные сдвиги содержания общего холестерина в сыворотке крови связаны с сочетанием процессов истощения его пула в органах (в первую очередь, в печени) и непосредственным замещением при введении лецитинов.

Интоксикация тетрахлорметаном приводила к стабильной гиперлиппротеидемии на протяжении всего срока наблюдений. Оба изучаемых лецитина оказывали гипохолестеролемический эффект практически в одинаковой степени. Однако снижение концентрации холестерина LDL на фоне действия SFL развивалось раньше, чем при воздействии SL.

REFERENCES

1. Drozdov A. L., Shulga S. M., Adab M., Glukh I. S. Hepatotropic action of complex biological products of natural origin — sunflower and soy lecithin. *Biotech. Acta*. 2014, 7(1), 123–130. (In Russian).
2. Drozdov A. L., Postolov O. M., Kudelya I. V. Methods for determination of lipoprotein. *DMA, Metodichna rozrobka. Dnipropetrovs'k*. 2005, 21 p. (In Ukrainian).
3. Drozdov A. L., Kudelya I. V., Kitenko N. V. Clinical diagnosis and prediction significance for determining lipoproteyn. *DMA. Metodicheskoe posobiye. Dnipropetrovsk*. 2007, 24 p. (In Russian).
4. Dzyak G. V., Drozdov A. L., Shulga S. M., Glukh A. I., Glukh I. S. Modern presentation of biology properties of lecithin. *Medychni perspektyvy*. 2010, XV(2), P. 12–23. (In Russian).
5. Shulga S. M., Glukh I. S., Drozdov O. L. Biological properties of sunflower lecithin. *ONAFIT, Naukovi pratsi*. 2012, V. 1, Issue 42, P. 234–238. (In Ukrainian).
6. LeBlanc M.-J., Brunet S., Bouchard G. Effects of dietary soybean lecithin on plasma lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in rats. *J. Nutr. Biochem*. 2003, 14(1), 40–48.
7. Knuiman J. T., Beunen A. C., Katan M. B. Lecithin intake and serum cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* 1989, V. 49, P. 266–268.
8. Mourad A. M., Pincinato E. C., Mazzola P. G., Sabha M., Moriel P. Influence of soy lecithin administration on Hypercholesterolemia. *Cholesterol. V. 2010. Article ID 824814*. P. 1–4.

9. Maligan J. M., Estiasih T., Kusnadi J. Structured phospholipids from commercial soybean lecithin containing omega-3 fatty acids reduces atherosclerosis risk in male *Sprague dawley* rats which fed with an atherogenic diet. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 2012, V. 69, P. 502–508.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *Council of Europe, Strasbourg*, 1986, 53 p.
11. Menshikov V. V., Delektorskay L. N., Zolotnitskay R. P., Andreeva Z. M., Ankirskay A. S. Laboratory methods in clinical studies: Handbook. Ed. V. V. Menshikov. *Moscow: Medicine*. 1987, 368 p. (In Russian).
12. Dzyak G. V., Drozdov A. L., Bilozub V. V., Kudelya I. V., Kharaponova O. B. Method for determining fractions of lipoprotein. *Patent for utility model № 60647. Patent was published 25.06.2011, Bul. № 12/2011*. (In Ukrainian).
13. Tvorogova M. G. Laboratory diagnosis of lipid disorders. *Laboratory medicine*. 2001, N 4, P. 67–74. (In Russian).
14. Plokhinskiy N. A. *Biometrics. M.: Izd-vo Moskovskogo un-ta*. 1978, 368 p. (In Russian).

ВПЛИВ БІОПРЕПАРАТІВ ІЗ СУХИХ ЛЕЦИТИНІВ СОЇ ТА СОНЯШНИКУ НА ЛІПІДНИЙ СКЛАД СИРОВАТКИ КРОВІ

Г. В. Дзяк¹, С. М. Шульга², М. Адаб³,
А. Л. Дроздов³, І. С. Глух²

¹ДУ «Дніпропетровська медична академія
МОЗ України», Дніпропетровськ

²ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України», Київ

³НДІ медико-біологічних проблем
ДУ «ДМА МОЗ України», Дніпропетровськ

E-mail: shulga5@i.ua

Сухий лецитин, що є сумішшю полярних фосфоліпідів, нейтральних ліпідів, вільних жирних кислот, гліколіпідів, вуглеводів і незначної кількості води, є перспективним об'єктом для створення біопрепаратів-гепатопротекторів. Одним із виявів його фармакологічної активності є вплив на склад ліпідів сироватки, зокрема на транспортні форми цих ліпідів.

Досліджено вплив сухих лецитинів сої та соняшнику на ступінь гіперліпопротеїнемії та інших порушень ліпідного обміну. Показано, що знежирений сухий лецитин сої виявляв гіпохолестеролемічну активність стосовно всіх вивчених форм холестеролу сироватки. Знежирений сухий лецитин соняшнику мав аналогічний, але дещо менший вплив. Однак зниження концентрації холестеролу ліпопротеїдів високої щільності під дією лецитину соняшнику розвивалося раніше, ніж лецитину сої.

Показано, що обидва лецитини запобігали розвиткові дисліпопротеїдемії, спричиненої застосуванням тетрахлорметану.

Ключові слова: сухий лецитин, біопрепарати лецитину сої та соняшнику, ліпіди сироватки крові.

INFLUENCE OF BIOPREPARATIONS FROM DRY SOYBEAN AND SUNFLOWER LECITHINS ON SERUM LIPIDS COMPOSITION

H. V. Dzyak¹, S. M. Shulga², M. Adab³,
A. L. Drozdov³, I. S. Glukh²

¹State organization «Dnipropetrovska Medical Academy» of Ministry of Health of Ukraine,
Dnipropetrovsk

²State organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

³Research Institute of Biomedical Problems of State organization «Dnipropetrovsk Medical Academy» of Ministry of Health of Ukraine, Dnipropetrovsk

E-mail: shulga5@i.ua

Dry lecithin, which is a mixture of polar phospholipids, neutral lipids, free fatty acids, glycolipids, carbohydrates, and small amounts of moisture, is a promising object for biologic-hepatoprotectors creation. One of its pharmacological activity displays is its influence on serum lipids, in particular transport forms of these lipids. The influence of dry soy lecithin and sunflower on hyperlipoproteinemia ratio and other lipid disorders is studied.

It is shown that low-fat dry soybean lecithin showed hypocholesterolemic activity against all studied forms of serum cholesterol. Nonfat dry sunflower lecithin had similar but somewhat less prominent effect.

However reduced concentration of high density lipoprotein cholesterol under sunflower lecithin developed right before soya lecithin. Both lecithin prevented the development of dyslipidemia induced carbon tetrachloride.

Key words: soybean and sunflower lecithin biopreparations, serum lipids.

УДК 582.998.1-119.2

ВЛАСТИВОСТІ СЕСКВІТЕРПЕНОВИХ ЛАКТОНІВ КУЛЬТИВОВАНИХ *in vitro* *Saussurea discolor* (Willd.) DC. ТА *S. porcii* Degen

М. М. Марченко
А. Є. Шелифіст
Л. М. Чебан

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Чернівці, Україна

E-mail: larisa.cheban@mail.ru

Отримано 24.03.2013

За допомогою методів УФ- та ІЧ-спектроскопії в рослинній сировині *Saussurea discolor* (Willd.) DC. (сосюрея різноколірна) та *S. porcii* Degen (сосюрея Порціуса), рідкісних видів роду *Saussurea* DC., встановлено присутність сесквітерпенових лактонів. Аналогічні результати одержано й для рослин, культивованих *in vitro*. Вміст у них сесквітерпенових лактонів близький до вмісту в інтактних рослинах і вищий для *S. discolor*.

Розроблено умови вилучення (5-денною екстракцією хлороформом), очищення (адсорбційною хроматографією на колонці) та фракціонування (тонкошаровою хроматографією) смолки сесквітерпенових лактонів. За допомогою тонкошарової хроматографії виявлено якісні відмінності їхнього спектра для експлантів рослин, вирощених *in vitro*, та дикорослих рослин *S. discolor* і *S. porcii*. Рослинний матеріал обох досліджуваних видів відрізняється також за вмістом основних компонентів спектра сесквітерпенових лактонів. Виявлено його залежність від умов вирощування. Компоненти з Rf 0,36 та 0,95 містяться в усій досліджуваній сировині в максимальній кількості.

Із застосуванням методу дифузії в агар у сесквітерпенових лактонів виявлено антимікробну активність. Як тест-систему використовували *Bacillus subtilis*. Антимікробну активність встановлено для суми сесквітерпенових лактонів. Вона значною мірою зумовлена дією компонентів з Rf 0,36 та 0,95.

Одержані результати свідчать про здатність *S. discolor* та *S. porcii* синтезувати *in vitro* сесквітерпенові лактони, а також про можливість використання рослинної сировини культивованих рослин як їх джерел. Для сесквітерпенових лактонів досліджуваних видів доведено антимікробну активність.

Ключові слова: *Saussurea discolor* (Willd.) DC., *S. porcii* Degen, сесквітерпенові лактони, тонкошарова хроматографія, антимікробна активність.

Рід *Saussurea* у флорі Буковинських Карпат представлений двома видами — *S. porcii* Degen і *S. discolor* (Willd.) DC. [1]. Обидва види занесено до Червоної книги України: перший — зі статусом «рідкісний», другий — «зникаючий» [2]. Біохімічний склад та фармакологічну дію біологічно активних сполук цих рослин вивчено недостатньо. Залучення біотехнологічних методів з метою одержання рослинного матеріалу не тільки сприятиме розширенню альтернативної сировинної бази *S. discolor* і *S. porcii*, а й надасть унікальну можливість зберегти їх природні популяції.

Для рослинної сировини представників роду *Saussurea* встановлено протипухлинну [3], антимікробну та протигрибкову [4, 5] дію. Таку активність пов'язують зі здатністю синтезувати й накопичувати сесквітерпенові лактони [6, 7]. Вони являють собою кисневмісні похідні сесквітерпеноїдів, різноманіт-

тя яких у межах одного типу визначається ступенем насиченості кілець, розташуванням подвійних зв'язків та наявністю різних функціональних груп [8, 9]. Така різноякісність ускладнює процес виділення та ідентифікації сесквілактонів, тому одержання цих сполук у чистому вигляді потребує розроблення нових та оптимізації вже існуючих методів екстракції, очищення та ідентифікації.

У зв'язку із зазначеним метою роботи було визначити вміст сесквітерпенових лактонів дикорослих та культивованих *in vitro* *S. discolor* і *S. porcii* за розроблених нами оптимальних умов екстракції, очищення і розділення, а також дослідити їхню біологічну активність.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на листках дикорослих (по 25 експериментальних зраз-

ків) та культивованих *in vitro* *S. discolor* і *S. porcii* (не менше 50 експериментальних зразків листків експлантів, що їх вирощують у культурі більше двох років).

Матеріал *S. discolor* зібрано: Чернівецька область, Путильський р-н, Чивчинські гори, хребет Чорний Діл, г. Великий Камінь, 1 400 м н. р. м. Матеріал *S. porcii* зібрано: популяція № 1 — Івано-Франківська область, Верховинський р-н, Чивчинські гори, г. Гнетеса, 1 545 м н. р. м.; популяція № 2 — Івано-Франківська область, Верховинський р-н, Чивчинські гори, пол. Глистувата, 1 475 м н. р. м.

Умови культивування. Для введення в культуру *in vitro* використовували насіння, зібране в місцях зростання природних популяцій. Насіння знезаражували 96%-м етанолом з додаванням Tween-80 та розчином промислового препарату «Білізна» (ТУУБ-05743160.001-93), після чого його тричі промивали стерильною дистильованою водою. Далі насіння переносили на живильне середовище, основою для приготування якого слугувало середовище Мурасіге–Скуга, доповнене цистеїном [10]. Експланти одержували прямим морфогенезом. Проростки, що формувалися впродовж першого пасажу, було пересаджено на середовище для індукції утворення конгломерату пагонів, доповнене 0,1 мг/л ІОК (індолілоцтовою кислотою — індолілацетатом) та 1 мг/л БАП (6-бензамінопурином) [10].

Екстракція сесквітерпенових лактонів. Для одержання сесквітерпенових лактонів висушену до повітряно-сухого стану і подрібнену сировину вичерпно екстрагували хлороформом упродовж 5 діб за температури 21 ± 2 °С на мішалці. Розчинник відганяли під вакуумом до одержання залишку (смолки), який потім очищували методом адсорбційної хроматографії на колонці [11].

Адсорбційна хроматографія на силікагелі. Колонки розміром 1,0 : 15,0 заповнювали Silicagel L 40/100 загальноприйнятим способом [12, 13], зрівноважували бензолом до повної стабілізації стартової лінії.

Смолку, розчинену в 3 мл хлороформу, наносили на колонку й елюювали сумішшю: петролейний ефір:етилацетат (9:1). Присутність лактонного кільця у фракціях об'ємом 5 мл перевіряли за здатністю поглинати світло за довжини хвилі 214 нм на СФ-46. Відповідні фракції об'єднували і випарювали до кінцевого об'єму 1 мл [13].

Спектральний аналіз. ІЧ-спектроскопію очищеної смолки проводили у тонкій плівці з використанням бромної пластинки на SPECORD — 75IR у ділянці 1 600–1 800 cm^{-1} . Сумарний вміст сесквітерпенових лактонів визначали спектрофотометрично з *n*-диметиламінобензальдегідом [14].

Тонкошарова хроматографія (ТШХ). Якісний аналіз спектра сесквітерпенових лактонів здійснювали методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту на пластинках Silufol — UV — 254 (Чехія) в системі розчинників петролейний ефір : етилацетат (9 : 1) [14] висхідним способом відповідно до вимог Державної фармакопеї [15]. Ідентифікацію окремих компонентів проводили, витримуючи хроматографічні пластинки 5 хв за температури 120 °С після оброблення 1%-м розчином ваніліну у 20% -й H_2SO_4 [11].

Усі реактиви були вітчизняного виробництва («Макрохім»).

Виділення індивідуальних сесквітерпенових лактонів проводили за допомогою препаративної ТШХ. Зони, що відповідали індивідуальним сполукам, зішкрябували із носія та екстрагували відповідним буфером [11].

Дослідження антимікробної активності сесквітерпенових лактонів здійснювали, застосовуючи метод дифузії в агар. У чашки Петрі, розташовані на строго горизонтальній поверхні, заливали по 20 мл м'ясопептонного агару (МПА). Після застигання в середовищі за допомогою стерильного циліндра формували лунки діаметром 4,0 мм. Поверхню агару рівномірно засівали стандартизованою суспензією тест-культури *Basilus subtilis* у концентрації $1 \cdot 10^7$ КУО/мл. У лунки вносили по 20 мкл хлороформних смолок чи індивідуальних фракцій сесквітерпенових лактонів, попередньо висушених та перерозчинених у суміші диметилсульфоксид : етанол у співвідношенні 1 : 1. Аналогічний розчин використовували як контроль. Після інкубації в термостаті протягом трьох діб визначали діаметр зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки [15].

Статистична обробка даних. Усі дослідження проводили в 6-кратній повторюваності. На рисунках подано типові хроматограми. Статистичну обробку результатів виконували за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Відмінності результатів, що обговорюються в роботі, є вірогідними за рівня значущості $P \leq 0,05$ за критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

З метою встановлення наявності біологічно активних речовин у рослинній сировині передусім проводили її спектральний аналіз. Для точної ідентифікації сесквітерпенових лактонів найбільш придатним є метод ІЧ-спектроскопії, оскільки в інфрачервоній ділянці розташовано більшість коливальних і обертальних спектрів молекул [8].

Використання цього методу для аналізу смолочок із листків дикорослих та культивованих *in vitro* *S. discolor* та *S. porcii* дало змогу виявити в ІЧ-спектрі смуги поглинання, що є характерними для сесквітерпенових лактонів (1 710–1 760, 1 760–1 790 cm^{-1}) [16].

Здатність рослинного організму до синтезу вторинних метаболітів за умов *in vitro*, не властивих йому під час зростання у природних умовах, або до зміни кількісного співвідношення присутніх сполук потребує додаткового аналізу рослинної сировини за різних умов культивування. Нами було проведено порівняльний аналіз вмісту сесквітерпенових лактонів рослинної сировини, зібраної в природних місцях зростання та вирощеної *in vitro*. Для експлантів обох досліджуваних видів порівняно з вирощуваними в природних умовах було встановлено більший їх вміст (рис. 1). Максимальну кількість сесквітерпенових лактонів синтезували рослини *S. porcii* першої популяції. Водночас для експлантів *S. discolor*, порівняно з природним матеріалом, встановлено здатність накопичувати ці сполуки в 1,3 раза більше.

Рослинний матеріал *S. porcii* другої популяції, як природний, так і культивований *in vitro*, характеризується майже удвічі

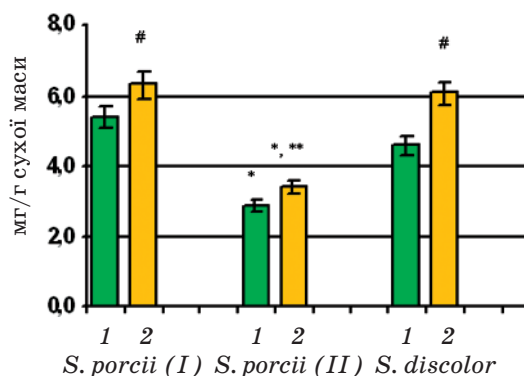


Рис. 1. Сумарний вміст сесквітерпенових лактонів у рослинній сировині *S. discolor* та двох популяцій *S. porcii* ($M \pm m$, $n = 6$, $P \leq 0,05$): 1 — природний матеріал; 2 — експланти.

* $P \leq 0,05$ *S. porcii* відносно *S. discolor*;

** $P \leq 0,05$ *S. porcii* (II) відносно *S. porcii* (I);

$P \leq 0,05$ експлантів відносно дикорослих рослин

нижчим рівнем сесквітерпенових лактонів порівняно з рівнем першої популяції, і в 1,6 раза — порівняно з експлантами *S. discolor*.

Отже, у процесі культивування *in vitro* *S. discolor* та *S. porcii* зберігають здатність до синтезу сесквітерпенових лактонів, причому їх вміст в усіх випадках вищий за вміст дикорослих рослин.

Для більш детального вивчення сесквітерпенових лактонів широко застосовують хроматографію у тонкому шарі сорбенту. Відомо, що від типу розчинника для екстракції залежить не тільки повнота вилучення досліджуваних сполук, але й їхній склад [8]. Нами було досліджено різні методи екстракції, що відрізнялися як за екстрагуючою речовиною, так і за температурним режимом. Смолки надалі аналізували за допомогою ТПХ.

На основі проведених досліджень було встановлено, що для індивідуальних сполук сесквітерпенових лактонів *S. discolor* та *S. porcii* найоптимальнішою є 5-денна хлороформна екстракція за кімнатної температури з подальшим розділенням за допомогою ТПХ з використанням як рухомої фази суміші петролейний ефір : етилацетат, та ідентифікація розчином ваніліну в сірчаній кислоті [11].

Досліджуючи спектр сесквітерпенових лактонів *S. discolor* і *S. porcii*, ми встановили відмінність у компонентному складі експлантів та листків дикорослих рослин. Так, у природному зразку *S. discolor* виявлено 9 сполук, тоді як в експлантах — 10 (рис. 2). Спільними для них є 7 компонентів, 2 з яких (R_f 0,26; R_f 0,95) характеризуються максимальним вмістом у сировині. Сполуки, R_f яких лежить у межах 0,6–0,9, мають мінімальний вміст. Слід зауважити, що саме більшість із них втрачаються під час водно-хлороформної екстракції.

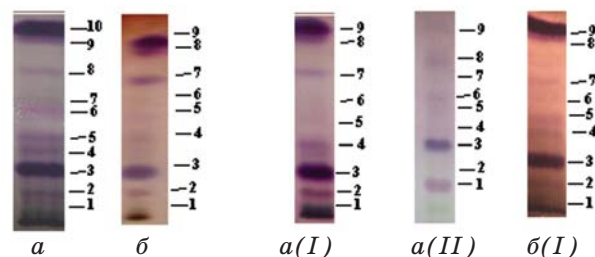


Рис. 2. Тонкошарова хроматографія експлантів рослин *in vitro* (а) та листків дикорослих рослин (б) *S. discolor* і *S. porcii*:

I — перша популяція; II — друга популяція;

1–10 — компоненти спектра сесквітерпенових лактонів

Виявлені між зразками відмінності стосуються компонентів, коефіцієнти рухливості яких лежать у межах 0,51–0,65 (таблиця).

Під час дослідження смолки *S. porcii* на хроматограмах ідентифіковано 9 компонентів, що набувають специфічного для сесквітерпенових лактонів забарвлення (рис. 2). За порівняльного аналізу рослинної сировини *S. porcii* було відзначено зміну складу сесквітерпенових лактонів залежно від умов вирощування. Варіабельною для даного виду є ділянка, яка включає сполуки з коефіцієнтами рухливості у межах 0,48–0,65 (таблиця). Сполуки з *Rf* 0,26 та 0,95, як і в тканинах *S. discolor*, присутні в рослинній сировині *S. porcii* у максимальній кількості.

Отже, в рослинній сировині *S. discolor* та *S. porcii* синтезуються сесквітерпенові лактони, а їхній якісний склад залежить від умов культивування. Спільними для обох видів є компоненти з коефіцієнтом рухливості 0,14; 0,26; 0,36; 0,90 та 0,95.

Дослідження антимікробної активності одержаних смолок за допомогою методу дифузії в агар було проведено з використанням *Bacillus subtilis*, оскільки для аналізу протимікробної активності представників роду *Saurea* як тест-культури найчастіше

використовують *B. subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* [17–19].

Передусім нами було вивчено низькі концентрації сухої смолки (2,5, 5 та 10 мг/мл). В умовах експозиції за дії 2,5 мг/мл спостерігали появу невеликої «облямівки» посиленого росту по краю лунки. Достовірної різниці між результатами для смолок із матеріалу *S. porcii* різних популяцій виявлено не було, тому дані наведено для однієї з них (рис. 3).

Зі збільшення концентрації смолки в досліджуваному розчині препарат набував антимікробних властивостей (рис. 4). Окрім того, поступове збільшення концентрації досліджуваного розчину уможливорює виявлення відмінностей для популяцій *S. porcii*.

Далі ми проаналізували антимікробну активність індивідуальних сполук, представлених на хроматограмі у максимальній кількості (*Rf* 0,36 та *Rf* 0,95), які було одержано препаративною ТПХ. Як видно з рис. 5, обидва компоненти виявляють схожий ефект на культу-

Коефіцієнти рухливості компонентів сесквітерпенових лактонів експлантів *S. discolor* і *S. porcii*

№ п/п	Матеріал				
	<i>S. discolor</i>		<i>S. porcii</i>		
	Дикорослі рослини	Експланти	Дикорослі рослини (популяція I)	Експланти (популяція I)	Експланти (популяція II)
1	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
2	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
3	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
4	0,43	0,43	–	–	0,43
5	–	–	0,48	0,48	–
6	–	0,51	–	–	–
7	0,53	–	–	0,53	–
8	–	0,55	–	–	–
9	–	0,60	0,60	0,60	0,60
10	0,65	–	0,65	–	0,65
11	0,75	0,75	0,75	0,75	–
12	–	–	–	–	0,81
13	–	–	–	–	0,87
14	0,90	0,90	0,90	0,90	–
15	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95

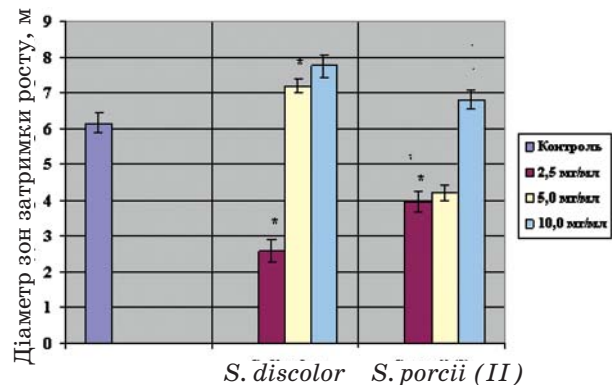


Рис. 3. Антимікробна активність хлороформних смолок із *S. discolor* та *S. porcii* у малих концентраціях (2,5/5,0/10 мг/мл) відносно *B. subtilis*. * — $P < 0,05$ відносно контролю; контроль: культивування *Bacillus subtilis* за присутності у середовищі суміші диметилсульфоксид : етанол (1 : 1)

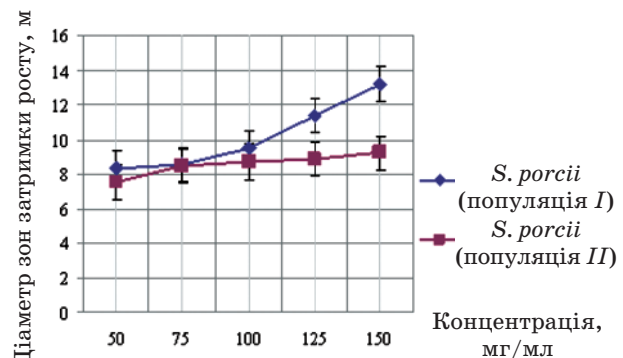


Рис. 4. Залежність антимікробної активності сухої смолки різних популяцій *S. porcii* від її концентрації

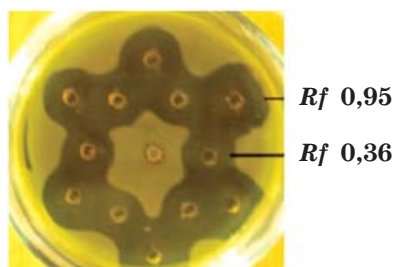


Рис. 5. Антимікробна активність індивідуальних сесквітерпенових лактонів *S. discolor* із *Rf* 0,95 ($22,68 \pm 1,46$ мм) та *Rf* 0,36 ($19,25 \pm 1,26$ мм)

ру *B. subtilis*. Діаметр зон затримки росту за дії обох індивідуальних сесквілактонів становив близько 19–23 мм, що дає змогу постулювати наявність антимікробної активності.

Підсумовуючи, можна зробити висновок, що *S. discolor* та *S. porcii* містять сесквітерпенові лактони з антимікробною активністю. Саме тому досліджувані види можуть бути використані як джерела сполук з біологічною активністю за умов розроблення ефективних

методів нарощування рослинної маси *in vitro*.

На основі хроматографічного розділення у тонкому шарі сорбенту встановлено відмінності у спектрі сесквітерпенових лактонів смолек листків дикорослих та культивованих *in vitro* рослин *S. discolor* і *S. porcii*, а також доведено, що рослини різних популяцій *S. porcii* відрізняються за складом компонентів. У результаті дослідження біологічної активності сесквітерпенових лактонів встановлено антимікробну дію їхніх хлороформних смолек, а також індивідуальних компонентів.

Таким чином, було підібрано умови вилучення, очищення та фракціонування сесквітерпенових лактонів *S. discolor* і *S. porcii*, за допомогою ТПХ виявлено відмінності у спектрі експлантів рослин *in vitro* та дикорослих рослин *S. discolor* і *S. porcii*, а також антимікробну активність сесквітерпенових лактонів, яка значною мірою зумовлена дією компонентів з *Rf* 0,36 та 0,95.

REFERENCES

1. *Tasenkevich L.* Red List of Vascular Plants of the Carpathian Mountains. *Lviv: State Museum of Natural History, NAS of Ukraine.* 2002, 29 p.
2. The Red Book of Ukraine. The plantage ed. by *J. P. Diduha.* Kyiv: *Globalconsulting.* 2009, 900 p. (In Ukrainian).
3. *Zhang S., Won Y. K., Ong Ch. N., Shen H. M.* Anticancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Cur. Med. Chemistry-Anti-Cancer Agents.* 2005, 5(3), 239–249.
4. *Choi S. Z., Choi S. U., Lee K. R.* Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Saussurea calcicola.* *Arch. Pharm. Res.* 2005, 28(10), 1142–1146.
5. *Pandey M. M., Govindarajan R., Ravat A. K., Palpu P.* Free radical scavenging potential of *Saussurea costus.* *Acta Pharm.* 2005, N 55, P. 297–304.
6. *Yang J-L., Wang R., Lin J-L., Shi Y-P.* Phytochemicals and biological activities of *Saussurea* species. *J. of Asian natural Products Research.* 2010, 12(2), 162–175.
7. *Yang M., Wang C. M., Zhang Q.* Sesquiterpenes, lignans and other constituents from *Saussurea macrota.* *Pharmazi.* 2004, 59(12), 972–976.
8. *Adekenov S.M., Kagarlitskii A.D.* The chemistry of sesquiterpene lactones. *Alma-Ata: Gylm.* 1990, 188 p. (In Russian).
9. *Alebastrov O.V.* The regio- and stereoselective transformations of sesquiterpene lactones. Part 1. *Int. Sci. J. Alt. Energy Ecol.* 2005, 10(30), 20–35. (In Russian).
10. *Pat. N. 65665. A01N4/00.* The method of microclonal breeding of species of *Saussurea discolor* (Willd.) DC. and *Saussurea porcii* Degen. *Marchenko M. M., Shelyfist A. E., Cheban L. M., publ.* 12.12. 2011, Bull. N 23. (In Ukrainian).
11. *Pat. N. 69107. A61K31/365.* The method of producing sesquiterpene lactones from the leaves of *Saussurea discolor* (Willd.) DC. *Marchenko M. M., Shelyfist A. E., Cheban L. M., publ.* 25.04.2012, Bull. N 8. (In Ukrainian).
12. The State Pharmacopoeia of Ukraine. Kyiv. 2004, 2000 p. (In Ukrainian).
13. *Belyakov K. V., Popov D. M.* Getting the standard sample of alantolactone. *Pharmacy.* 2004, N. 1, P. 37–39. (In Russian).
14. *Belyakov K. V.* The definition of sesquiterpene lactones in the rhizomes and roots of *Elecampane (Inula helenium L.). Pharmacy.* 2003, N. 3, P. 10–12. (In Russian).
15. *Fritsch N. I., Vivcharuk L. M., Mizyuk R. M.* The study of antimicrobial activity of plants of the heath family (*Ericaceae* Juss.). *Pharm. Magazine.* 2005, N. 2, P. 97–104. (In Russian).
16. *Marchenko M. M., Shelyfist A. E., Cheban L. M.* The characteristics of the biologically active compounds of *Saussurea porcii* Degen. *Biol. syst.* 2010, 2(1), 12–15. (In Ukrainian).
17. *Paulsen E.* Contact sensitization from Compositae-containing herbal remedies and cosmetics. *Contact Dermatitis.* 2002, 2(47), 189–198.
18. *Ren G., Yu Z. M., Chen Y. L., Wu S. H.* Sesquiterpene lactones from *Saussurea alata.* *Nat. Prod. Res.* 2007, 3(21), 221–226.
19. *Sharma R. K., Shanti S. S.* Seed germination behaviour of some medicinal plants of Lahaul and Spiti cold desert: implications for conservation and cultivation. *Cur. sci.* 2006, 90(8), 1113–1118.

**СВОЙСТВА СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ
ЛАКТОНОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *in vitro*
Saussurea discolor (Willd.) DC.
И *S. porcii* Degen**

М. М. Марченко
А. Е. Шелифост
Л. Н. Чебан

Черновицкий национальный университет
имени Юрия Федьковича,
Черновцы, Украина

E-mail: larisa.cheban@mail.ru

С помощью методов УФ- и ИК-спектроскопии в растительном сырье *Saussurea discolor* (Willd.) DC. (соссурея разноцветная) и *S. porcii* Degen (соссурея Порциуса), редких видов рода *Saussurea* DC., установлено присутствие сесквитерпеновых лактонов. Аналогичные результаты получены и для растений, культивируемых *in vitro*. Содержание в них сесквитерпеновых лактонов близко к содержанию в интактных растениях и более высокое для *S. discolor*.

Разработаны условия извлечения (5-дневной экстракцией хлороформом), очищения (адсорбционной хроматографией на колонке) и фракционирования (тонкослойной хроматографией) смолки сесквитерпеновых лактонов. С помощью тонкослойной хроматографии обнаружены качественные различия их спектра для эксплантов растений, выращенных *in vitro*, и дикорастущих *S. discolor* и *S. porcii*. Растительный материал обоих исследуемых видов отличается также содержанием основных компонентов спектра сесквитерпеновых лактонов. Выявлена его зависимость от условий выращивания. Компоненты с *Rf* 0,36 и 0,95 в исследуемом сырье содержатся в максимальном количестве.

С применением метода диффузии в агар у сесквитерпеновых лактонов обнаружена антимикробная активность. Как тест-систему использовали *Bacillus subtilis*. Антимикробная активность установлена для суммы сесквитерпеновых лактонов. Она в значительной степени обусловлена действием компонентов с *Rf* 0,36 и 0,95.

Полученные результаты свидетельствуют о способности *S. discolor* (Willd.) DC. и *S. porcii* синтезировать *in vitro* сесквитерпеновые лактоны, а также о возможности использования растительного сырья культивируемых растений как их источников. Для сесквитерпеновых лактонов исследуемых видов доказана антимикробная активность.

Ключевые слова: *Saussurea discolor* (Willd.) DC., *S. porcii* Degen, сесквитерпеновые лактоны, тонкослойная хроматография, антимикробная активность.

**PROPERTIES OF THE SESQUITERPENE
LACTONES OF *in vitro* CULTIVATED
Saussurea discolor (Willd.) DC.
AND *S. porcii* Degen**

M. M. Marchenko
A. E. Shelifist
L. M. Cheban

Phedkovitch Chernivtsy National University,
Chernivtsy, Ukraine

E-mail: larisa.cheban@mail.ru

Using the UV- and IR-spectroscopy methods in the plantstuff of *Saussurea discolor* (Willd.) DC. and *S. porcii* Degen, that are infrequent species of the genus of *Saussurea* DC., the existence of the sesquiterpene lactones in them was determined. Similar results for the plants cultivated *in vitro* were received. The contents of the sesquiterpene lactones are approximate to the same ones in the intact plants. It was found as well that the plants of *S. discolor* have their higher total content.

We elaborated the separation criterions (under 5-days extraction of chloroform), purification (using the adsorption chromatography column) and fractionation (applying thin layer chromatography) for the amounts of the sesquiterpene lactones. By thin layer chromatography there were detected the qualitative differences of their spectrum for the explants of plants, grown *in vitro* and for the *S. discolor* and *S. porcii* wild plants. The plant material of both investigated species differs besides by the quantitative content of the main components of the sesquiterpene lactones. All the investigated materials showed maximum amounts of *Rf* 0,36 and 0,95 components.

By diffusion in agar method the existence of the antimicrobial activity of the sesquiterpene lactones was detected. The test-system was *Bacillus subtilis*. This property was conditioned mainly by the action of the components of *Rf* 0,36 and 0,95.

The results give evidence for the ability of *S. discolor* and *S. porcii* to synthesize the sesquiterpene lactones. The cultivated *in vitro* plants could be as their sources. So the sesquiterpene lactones of *S. discolor* and *S. porcii* have the antimicrobial activity.

Key words: *Saussurea discolor* (Willd.) DC., *S. porcii* Degen, sesquiterpene lactones, thin layer chromatography, antimicrobial activity.

SOME EFFECTS ASSOCIATED WITH THE USE OF THE BIOPREPARATION FROM *Picralima nitida* SEEDS EXTRACT AS ANTIDIABETIC AGENT

O. A. Akinloye¹
E. A. Balogun²
S. O. Omotainse¹
O. O. Adeleye¹

¹Department of Biochemistry, Federal University of Agriculture,
Abeokuta, Nigeria

²Department of Veterinary Pathology, Federal University of Agriculture,
Abeokuta, Nigeria

E-mail: oaakin@yahoo.com

Received 23.10.2013

The study was aimed to investigate some untoward effects that could be associated with the use of *P. nitida* as hypoglycemic agent using some biochemical and histological evidences.

The antioxidant property of the plant was determined by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. Biochemical studies in plasma using determining the testes such as blood glucose, alanine and aspartate aminotransferases, gamma glutamyl transferase activities, electrolytes (sodium, potassium and bicarbonate, lipid peroxidation levels, haematological parameters (red blood cell and whole blood cell, platelets, and lymphocyte counts), blood glucose level, lipid profile, and also liver and kidney function tests were performed. Histopathological examinations of the liver, kidney and pancreas were done following the standard Hematoxylin and Eosin staining method.

Methanol extract of the seeds has the highest antioxidant level (36.73%), indicating higher free radical scavenging activity; followed by aqueous extract (19.36%) and coconut water extract (4.09%). There was significant reduction ($P < 0.05$) in blood glucose of all the treated rats at the end of the experiment (ranging from 55.59% to 41.66%). Significant increase ($P < 0.05$) in body weights of the treated rats were also observed at the end of the treatment (ranging from 9.26% to 38.89%). There was a significant ($P < 0.05$) increase in the hematological parameters in all the extract treated groups. There was also significant decrease ($P < 0.05$) in the lipid profiles of the treated groups. Plasma studied enzymes activities decreased in all treated groups. Ionoregulatory disturbances observed included hyperkalemia and hypernatremia in all the treated groups but were reduced significantly ($P < 0.05$) at the end of the treatment. Urea and bicarbonate concentrations and also of lipid peroxidation level decreased significantly in all the groups. The histopathological studies revealed that the extracts were unable to ameliorate some observable pathologic conditions associated with induced diabetic tissues. Although, diabetes mellitus have been reported to be associated with varied histological changes in different organs, in this study, histological examinations of the pancreas of the treated and untreated groups showed varying degree of degenerations but the extent of severity in the lesions were more pronounced in the extract treated groups. In this relation the obtained results of this study which revealed the hypoglycemic and antioxidant potentials of *Picralima nitida* seed extracts for the treatment of diabetes mellitus should be taken with caution in administering the *P. nitida* seed extract as an hypoglycemic agent.

Key words: *Picralima nitida*, diabetes mellitus, biochemical, histological evidences.

Diabetes is becoming one of the prevalent disease conditions worldwide. Diabetes mellitus, often simply referred to as diabetes, is a group of metabolic disease in which a person has high blood sugar, either because the body does not produce enough insulin, or as a result of insensitivity of target cells to the insulin that is produced [1]. Clinically, there are three main types of diabetes: Type 1 diabetes mellitus, also known as Insulin Dependent Diabetes

Mellitus (IDDM) or juvenile onset diabetes is caused by an autoimmune destruction of the insulin secreting β -cells of the pancreas [2]. It usually develops during childhood, adolescence or during early adulthood [3], since the insulin producing β cells are partially or completely loss, the patient requires daily injection of insulin [4]. It is also characterized by a condition in which the pancreas does not produce insulin at all, which could be as a result of damage on

the pancreatic cells. Type 2 is often referred to as Insulin Independent Diabetic which is characterized by a condition in which the pancreas does not produce enough insulin or the insulin produced is not working properly. Gestational diabetes is when pregnant women who have never had diabetes before have high blood glucose level during pregnancy, in some cases it may precede development of diabetes type 2 [2]. Long term diabetes mellitus is commonly accompanied by other cardiovascular risk factors such as dyslipidemia, hypertension, prothrombic factors and microvascular problems involving eyes, kidney and peripheral nerves [5].

Treatment of diabetes is very important because it is a life threatening ailment and presently there is no known cure [6]. Management of diabetes often concentrates on keeping blood sugar levels close to normal (euglycemia) as possible without presenting undue danger to the patient. Dietary management, regular exercise, and use of appropriate medications are some other management regime. Long term diabetes mellitus is commonly accompanied by other cardiovascular risk factors such as dyslipidemia, hypertension, prothrombic factors, ketoacidosis, and non-ketotic hyperosmolar coma and microvascular problems involving eyes, kidney and peripheral nerves failure, poor wound healing, gangrene on the feet which may lead to amputation and erectile dysfunction or impotence [5, 7].

Picralima nitida is a member of the family *Apocynaceae* and order *gentianales* and is widely distributed in the tropical rainforests of Africa, as homesteads or bushes [8, 9]. It can measure up to 20–35 m high when fully grown, having white flower in terminal inflorescence and very large paired fruits (pods). Its leaves are opposite, simple, and entire. The fruit (pod) has many seeds which are usually embedded in the pulpy material known as pulp. The pericarp of the fruit which contains latex is known as the rind [10]. *P. nitida* seed is known as Akuamma seed in Ghana, Osi-igwe seed in Igboland (Eastern Nigeria), Eso Abere in Yorubaland (Western Nigeria) [11].

Picralima nitida (Abere) has been used as antimalarial, antifungal, analgesic and antidiabetic agent. Traditionally, the seeds are crushed or grinded into powdery form and taken orally, for the treatment of malaria, diarrhoea, diabetic, as a painkiller and stimulant. The antimicrobial, antipyretic and antifungal activities of this plant have been reported [12–14]. Pronounced inhibitory activities against

asexual erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* was reported to be highest in the root, stem, bark, and fruit rind extracts while the leaf and seed extracts yielded much lower activity or were completely inactive [15]. The antimalarial activity of the plant has been attributed to its alkaloid components [16–18]. The trypanocidal and antileishmanial activities of the plant have been reported [19, 20]. The plant also possesses opium analgesic [21, 22] and anticholinesterase properties [23]. The seeds of *Picralima nitida* extract have also been reported to possess hypoglycaemic, with the coconut water extract of the seed having higher hypoglycaemic effect than the aqueous extract [24, 25].

This study was designed to evaluate some possible untoward effects the *P. nitida* seed extracts could have while using it as an hypoglycemic or antidiabetic agent using both biochemical and histological tests.

Materials and methods

Materials

Fresh seeds of *Picralima nitida* were purchased from Itoku market in Abeokuta, Ogun State, Nigeria and were authenticated by Dr. Aworinde (Plant taxonomist) of the Department of Biological Sciences, Federal University of Agriculture Abeokuta. Technology of the seeds obtaining is contain washing and rinsing with distilled water, mopping with clean tissue paper, cutting into pieces and allowed to air dried after which they were grinded into powdery form.

Animals

42 adult Wistar rats purchased from the College of Veterinary Medicine, University of Agriculture Abeokuta were used for this study. The rats were allowed to acclimatize for seven days in cages at room temperature. They were given free access to commercial feed and water *ad libitum*.

A Technology of Extract Preparation

Twenty-five grams (25 g) each of the dried powdery form of the *Picralima nitida* seed was soaked into 500 ml of distilled water, coconut water and methanol separately. The mixture was shaken vigorously and stirred at regular interval for 48 hrs to allow for equilibration of the mixture. The mixture was then filtered using sterile muslin bag, and the filtrate obtained was concentrated to constant residual weight which was used to calculate percentage yield. The extract obtained was kept inside air

tight container and stored at 4 °C prior to use.

The percentage yield for methanolic, distilled water and coconut water extracts were 74.6%, 25.04% and 35.8% respectively.

*Determination of antiradical activity of *Picralima nitida**

The antiradical activity of the plant was determined by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity as described by Ayoub et al., [26]. The DPPH radical scavenging activity was calculated using the formula:

DPPH radical scavenging activity (%) = $[(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$.

Where A_0 is the absorbance of the control, A_1 is the absorbance of extract or standard sample.

Induction of Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus was induced in the rats following the method described in [26]. The rats were given a single intraperitoneal injection of 150 mg/kg of freshly prepared alloxan monohydrate dissolved in normal saline after an overnight fasting. Rats that survived after the seventh day with blood glucose concentrations more than 150 mg/100ml were considered diabetic.

Animal grouping and administration of extract

The rats were divided into seven groups of six rats per group and treated as follows:

Group 1: served as control; non-induced rats and were given free access to normal feed and water *ad libitum*. *Group 2:* untreated diabetes-induced rats. *Group 3:* non-induced rats, received coconut water only. *Group 4:* diabetes-induced rats, received coconut water extract (100 mg/kg body weight). *Group 5:* diabetes-induced rats, received distilled water extract (100 mg/kg body weight). *Group 6:* diabetes-induced rats, received methanol extract (100 mg/kg body weight). *Group 7:* diabetes induced rats, received 10 mg/kg body weight of glibenclamide (standard drug).

Blood Glucose Determination

A drop of blood was collected by cutting the tip of the tail of conscious rat and placed on the strip of ACCU-CHEK glucometer for the determination of blood glucose.

Periodic Weighing

Body weights of each rats in all the groups was measured every three days throughout the period of the treatment.

Blood collection and dissection

At the end of the experiment, the rats were anesthetized under light diethyl ether, blood samples was collected from each rat by cardi-

ac puncture into heparinised tubes. The tubes were rocked gently to allow proper mixing of the blood. Thereafter, the rats were dissected and the liver and kidneys of each rat excised, mopped, weighed and stored in 10% formalin for histopathological studies.

Preparation of Plasma

Test tubes containing whole blood samples collected were centrifuged at 4000 rpm for five minutes, the supernatant (plasma) was decanted into another tube and labeled accordingly.

Biochemical Analysis

Plasma Aspartate Aminotransferase (AST) and Plasma Alanine Aminotransferase (ALT) assays: AST and ALT was measured spectrophotometrically by the method of Reitman and Frankel [27] as described in Randox kit manual.

Plasma Urea

Urea in the plasma was determined using Urease-Berthelot method as described in Randox kit manual [28].

Plasma Cholesterol

Plasma cholesterol was determined after enzymatic hydrolysis and oxidation according to the method described by Trinder [29] as described in Randox diagnostic kit manual.

Plasma Triglycerides

Plasma triglycerides are determined after enzymatic hydrolysis with lipases according to the method described in Randox kit manual.

Estimation of vLDL-Cholesterol

The concentration of Very Low Density Lipoprotein (vLDL) cholesterol was calculated by modification of the Friedewald formular [30]. vLDL-Cholesterol was calculated as Triglycerol concentration obtained divided by five.

Plasma Gamma-glutamyltransferase (GGT)

Plasma GGT was measured spectrophotometrically by the method described by Szasz [31] as described in Randox Diagnostic kit manual.

Lipid peroxidation

The extent of lipid peroxidation was estimated in terms of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) by measuring the amount of malondialdehyde (MDA) formed according to the method described by Drapper et al. [32], with slight modifications.

Determination of plasma sodium and potassium

Plasma sodium and potassium concentration were determined using the flame photometry method.

Determination of Bicarbonate concentration

The plasma bicarbonate concentration was determined by titration.

Packed Cell Volume (PCV) Estimation

PCV was determined by the microhaematocrit method [33] as described by Omotainse and Anosa [34].

Haemoglobin (Hb) Concentration

The haemoglobin concentration was determined colorimetrically using Cypress diagnostic kit.

Red Blood Cell (RBC) and Whole Blood Cell (WBC) count

The RBC and total WBC counts were carried out by the use of the Neubauer haemocytometer according to the method of Schalm et al. [33] as described by [34].

Histopathological examinations

Histopathological examinations of the liver, kidney and pancreas was done following the standard Heamatoxylin and Eosin (H&E) staining method as described by Krause [35].

Statistical Analysis

Results obtained were expressed as mean \pm S.D. The levels of homogeneity among the groups were tested using one-way Analysis of Variance (ANOVA) and Duncan Multiple Range Test (DMRT). Analysis was done using statistical package for Social Science (SPSS) version 16.0. Difference at $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results and discussion

The antiradical activity of the different extracts of *Picralima nitida* seeds

The antiradical activity of all the studied extract of *P. nitida* seed are summarized in Table 1. The methanolic extraction of the seed has the lowest absorbance among the three when compared with the standard, indicating higher free radical scavenging activity.

Table 1. The antiradical activity of the different extracts of *Picralima nitida* seeds

EXTRACT	ABSORBANCE	% INHIBITION
AQUEOUS EXTRACT	0.444	19.36
METHANOLIC EXTRACT	0.348	36.73
COCONUT WATER EXTRACT	0.528	4.09
STANDARD (VIT C)	0.0015	100

Body weight of Animals

Table 2 shows the summary of the effect of the plant seed extracts on body weights of the animals. After the intraperitoneal injection of 150 mg/kg alloxan monohydrate, mean body weight of all the alloxan-induced groups were significantly reduced ($P < 0.05$). During treatment, all diabetic-induced but treated rats showed increase ($P < 0.05$) in body weight when compared with their weights after induction prior treatment. The result showed higher weight gain in the rats treated with methanolic and coconut water extract of *P. nitida* seeds when compared to other treated groups. There was consistent increase in weight of the normal control groups while the diabetes induced but not treated group showed a consistent decrease in weight throughout the experiment.

The summary of the blood glucose levels of the rats is presented in Table 3. Before induction of diabetes the mean blood glucose level of the rats ranged from 81.67 to 91.33 mg/dl. There was increase in the mean blood glucose of all the induced groups, having values between 223.33 and 265.33 mg/dl which confirmed them diabetic. All the groups treated with the extracts had decreased mean glucose values respectively. Glibenclamide treated rats also showed decrease in mean blood glucose from 245.00 to 110.67 mg/dl at the end of the experiment. However, the diabetic untreated rats maintained high plasma glucose.

Effects of treatment on the haematological parameters are presented in Table 4. The Packed Cell Volume (PCV) and Hb contents of the alloxan-induced but untreated group and the induced but distilled water extract treated group were significantly lower ($P < 0.05$) than the control. Only the induced but methanol extract treated group had no significant difference in the RBC content when compared with the control. The WBC and lymphocyte contents of all the alloxan induced groups were significantly lower ($P < 0.05$) than that of the control, with the alloxan-induced untreated group having the lowest value. Comparison the lymphocyte contents of the induced groups with the non-induced group, only the alloxan-induced and the glibenclamide-treated groups had a significant increase ($P < 0.05$). Alloxan induced-methanolic extract-treated group had the least lymphocyte level.

Table 5 depicts the effect of treatments on some lipid profile parameters. The result showed that alloxan caused significant ($P < 0.05$) increase in the lipid profile (total

Table 2. Effect of treatments of *Picralima nitida* seeds extract on body weight (g) of rats

GRP	TREATMENT	DAY 1	DAY 7	DAY 10	DAY 13	DAY 16	DAY 19
1	Control	80 ±11.18 ^a	99 ±13.42 ^a	107±10.37 ^b	117±10.37 ^b	122 ±7.58 ^{bc}	132±10.37 ^{bc}
2	Alloxan only	129 ±4.18 ^b	118±4.48 ^b	115 ±4.08 ^b	111 ±7.50 ^b	109 ±9.02 ^a	108±11.68 ^{ab}
3	CW only	80 ±11.18 ^a	103 ±13.0 ^{ab}	115±11.18 ^b	128±13.51 ^{bc}	143±11.51 ^{cd}	151 ±15.58 ^c
4	A + CW	120±20.92 ^b	104±11.94 ^{ab}	104±20.43 ^{ab}	111 ±22.75 ^b	123±16.47 ^{bc}	134 ±13.77 ^c
5	A + DS	105±20.92 ^b	92 ±16.05 ^a	90 ±13.69 ^a	88±9.75 ^a	97 ±10.41 ^a	98 ±17.56 ^a
6	A + MET	124±6.88 ^b	115±10.61 ^b	123±18.37 ^b	142±5.77 ^c	147±10.41 ^d	150±10.00 ^c
7	A + GLIB	126±29.88 ^b	109±20.43 ^{ab}	123±16.05 ^b	127±23.63 ^{bc}	132±27.54 ^{bcd}	142±27.54 ^c

Notes: hereinafter – values are mean ± SD. Values within the same row with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$, ($n = 6$); CW only: Coconut water only; A + CW: Alloxan + Coconut water extract of *P. nitida* seed; A + DS: Alloxan + Distilled water extract of *P. nitida* seed; A + MET: Alloxan + Methanol extract of *P. nitida* seed; A + GLIB: Alloxan + Glibenclamide.

Table 3. Effect of treatments of *Picralima nitida* seeds on the plasma glucose level (mg/dL) of rats

GR	TREATMENT	DAY 1	DAY 7	DAY 10	DAY 13	DAY 16	DAY 19
1	Control	90.60±5.18 ^a	84.80±3.96 ^a	85.20±5.26 ^a	81.6±6.27 ^a	84.6±4.22 ^a	81.4±5.94 ^{ab}
2	Alloxan only	91.33±6.51 ^a	265.33±41.59 ^b	292±66.73 ^c	250.67±35.02 ^c	249.67±40 ^e	247.67±46.2 ^d
3	CW only	83.60±5.59 ^a	82.80±5.07 ^a	83±4.47 ^a	79.6±8.68 ^a	91.8±1.3 ^a	75±9.03 ^a
4	A + CW	86.75±10.99 ^a	234.25±32.09 ^b	227.75±31.17 ^b	204±9.35 ^b	194.75±8.66 ^d	144.5±45.2 ^c
5	A + DS	81.67±7.57 ^a	223.33±29.19 ^b	287±62.64 ^c	223.33±34.5 ^{bc}	174±3.46 ^{cd}	128.67±21 ^c
6	A + MET	88.67±3.06 ^a	249.33±39.53 ^b	214.67±11.72 ^b	196.33±29.02 ^b	150.67±5.13 ^{bc}	122.67±6.11 ^{bc}
7	A + GLIB	79.33±14.01 ^a	245.00±33.45 ^b	203.33±39.07 ^b	193±29.51 ^b	134.67±22.37 ^b	110.6±4.58 ^{abc}

Table 4. Effect of treatments of *Picralima nitida* on some hematological parameters of rats

GRP	TREATMENT	PCV (%)	Hb (g/dl)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	PLAT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	LYMP (%)
1	Control	45.08±3.03 ^{cd}	15.05±0.89 ^c	7.66±0.48 ^d	10.10±0.69 ^d	638.20±7.86 ^e	64.00±2.55 ^{ab}
2	Alloxan only	31.53±1.67 ^a	10.34±0.43 ^a	5.43±0.31 ^a	5.13±0.21 ^a	217.00±6.25 ^a	77.67±3.51 ^d
3	CW only	41.40±2.69 ^{bc}	13.99±0.78 ^{bc}	7.30±0.29 ^{cd}	9.04±0.27 ^d	637.40±7.89 ^e	65.20±2.28 ^b
4	A + CW	41.08±0.72 ^{bc}	13.69±0.59 ^{bc}	6.88±0.21 ^{bc}	7.68±0.33 ^c	244.67±8.60 ^c	62.75±2.87 ^{ab}
5	A + DS	38.40±6.27 ^b	12.74±2.08 ^b	6.43±0.47 ^b	6.47±0.40 ^c	294.67±8.33 ^c	63.00±3.61 ^{ab}
6	A + MET	46.70±1.45 ^d	15.24±0.52 ^c	7.80±0.26 ^d	8.33±0.45 ^c	419.33±6.03 ^d	60.00±3.46 ^a
7	A + GLIB	42.73±2.18 ^{bc}	14.20±0.63 ^{bc}	7.03±0.47 ^{bc}	5.80±0.36 ^{ab}	228.00±11.14 ^a	71.33±1.53 ^c

Table 5. Effect of treatments on some lipid profile parameters of rats

GRP	TREATMENT	Total CHOL (mg/dl)	TRIG (mg/dl)	vLDL (mg/dl)
1	Control	87.20±3.69 ^a	62.40±3.49 ^{ab}	12.48±0.69 ^{ab}
2	Alloxan only	120.47±2.99 ^e	96.70±2.21 ^d	19.34±0.44 ^d
3	CW only	87.72±3.05 ^a	64.80±2.89 ^{ab}	12.88±0.52 ^{ab}
4	A + CW	97.88±1.42 ^b	67.03±7.55 ^{bc}	13.41±1.51 ^{bc}
5	A + DS	110.67±3.16 ^d	74.40±4.79 ^c	14.88±0.96 ^c
6	A + MET	103.63±4.30 ^c	67.23±5.39 ^{bc}	13.45±1.08 ^{bc}
7	A + GLIB	98.03±2.85 ^b	58.50±5.99 ^a	11.70±1.19 ^a

cholesterol, triglyceride and vLDL) of the treated and untreated groups when compared with the control. However, treatments with the *P nitida* seed extracts showed significant ($P < 0.05$) reduction of the lipid profile levels. The cholesterol, triglycerol, and very Low Density Lipoprotein values of the alloxan-induced glibenclamide treated group were significantly lowered ($P < 0.005$) when compared with the control. The alloxan-induced but distilled water treated group showed a significant increase in the lipid profile when compared with all other groups.

The influence of treatments on some liver function test parameters is presented in Table 6. The alloxan- induced but untreated group showed a significant increase in the activities of all marker enzymes namely; GGT, AST, and ALT, when compared with the control. None of the treatments was able to bring the activities of these enzymes to the level of the control.

Electrolytes and urea plasma levels of the different groups of rats were presented in Table 7. There was no significant different ($P > 0.05$) between distilled water extract treated group and glibenclamide treated group as well as between the control and group administered coconut water only. All the renal function parameters (urea, sodium, potassium

and bicarbonate) of the glibenclamide group reduced significantly ($P < 0.05$) when compared with the control group.

Table 8 shows the summary of values of MDA concentration in the plasma of different groups. The MDA content of the extract treated groups decreased ($P < 0.05$) when compared to the control. However, the group administered alloxan only had a significant increase ($P < 0.05$) in the MDA content when compared to the control.

HISTOLOGICAL STUDIES

The liver

Histopathological examination of the liver of the rats in groups 1 and 3 showed normal appearance/architecture of the hepatocytes, bile ducts and blood vessels (Fig. 1).

Examination of the liver of untreated alloxan induced diabetic group showed lesions which include mononuclear cell infiltration of the portal triads particularly around the bile duct (Fig. 2), necrosis of the hepatocyte, diffuse disorganisation of the hepatocyte cords and diffuse distribution of mononuclear cells in the sinusoids. Photomicrograph of the treated groups also showed varying degree of lesions (Fig. 2–7). The degree of lesions in the treated groups are however milder compared to the untreated group.

Table 6. Effect of treatments on activities of some markers enzymes of hepatotoxicity in rats

GRP	TREATMENT	GGT (U/L)	AST (U/l)	ALT(U/l)
1	Control	23.82 ± 2.10 ^a	22.65 ± 2.90 ^a	37.02±2.20 ^a
2	Alloxan only	67.10 ± 3.30 ^e	79.01 ± 0.72 ^f	54.38±4.45 ^d
3	CW only	25.00 ± 1.49 ^a	35.93 ± 1.82 ^b	37.76±1.19 ^a
4	A + CW	34.38 ± 2.11 ^{bc}	45.16 ± 4.83 ^c	38.78±1.75 ^{ab}
5	A + DS	38.90 ± 1.92 ^d	55.17 ± 4.81 ^d	40.63±1.31 ^{ab}
6	A + MET	35.40 ± 3.48 ^{cd}	37.80 ± 0.70 ^b	42.00±1.76 ^{bc}
7	A + GLIB	30.97 ± 3.29 ^b	60.69 ± 1.54 ^e	45.67±3.79 ^c

Table 7. Effect of treatments of *Picralima nitida* seeds on renal function parameters in rats

GRP	TRTMENT	UREA (mg/dl)	SODIUM (mmol/L)	POTASSIUM (mmol/L)	BICARBONATE (mmol/L)
1	Control	19.58±1.86 ^a	73.00±7.42 ^a	3.56±0.61 ^a	12.00±1.23 ^a
2	Alloxan only	54.43±4.15 ^e	131.67±3.50 ^d	9.53±0.31 ^d	22.33±1.16 ^d
3	CW only	19.64±2.29 ^a	86.40±1.67 ^b	7.02±0.33 ^{bc}	16.00±1.00 ^b
4	A + CW	44.05±1.82 ^d	94.75±12.37 ^{bc}	7.13±0.61 ^{bc}	16.50±2.08 ^{bc}
5	A + DS	35.43±2.45 ^c	98.67±9.29 ^c	7.83±0.72 ^c	18.33±1.16 ^c
6	A + MET	26.97±1.06 ^b	104.33±3.22 ^c	8.07±0.59 ^c	18.00±1.00 ^{bc}
7	A + GLIB	34.93±1.59 ^c	85.00±2.00 ^b	6.10±2.23 ^b	13.67±0.58 ^a

Table 8. Effect of treatments of *Picralima nitida* seeds on lipid peroxidation level in rats

GRP	TREATMENT	MDA (µmol/L)
1	Control	0.48±0.33 ^a
2	Alloxan only	3.20±0.76 ^c
3	CW only	0.49±0.36 ^a
4	A + CW	1.24±0.38 ^b
5	A + DS	1.25±0.27 ^b
6	A + MET	1.27±0.21 ^b
7	A + GLIB	1.19±1.91 ^b

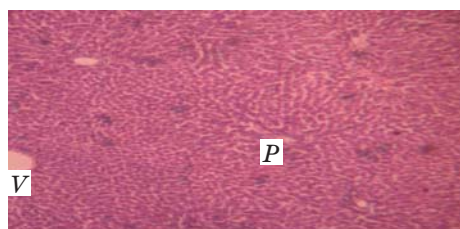


Fig. 1. Photomicrograph of the liver section showing normal appearance of the perivascular spaces of the hepatocytes (P) and blood vessel (V) in the liver: of the normal control groups (1 and 3). ×200 H&E

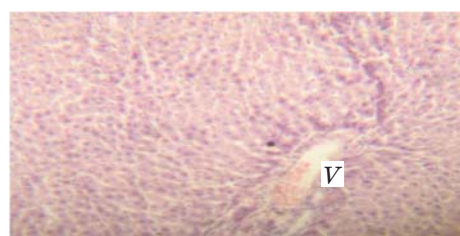


Fig. 2. Photomicrograph of the liver section showing infiltration of perivascular space (V) of the hepatocytes: in the untreated diabetes induced group. ×200 H&E



Fig. 3. Photomicrograph of the liver section showing bile duct hyperplasia (D) in the hepatocytes: of the induced groups treated with 100mg/kg of coconut water and distilled water extraction of *P. nitida*. ×400 H&E

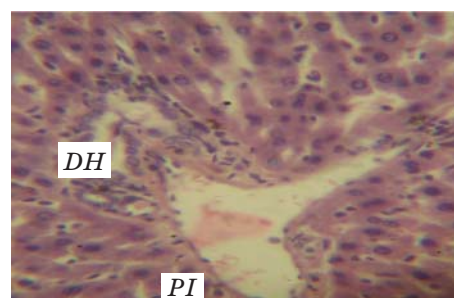


Fig. 4. Photomicrograph of the liver section showing perivascular cellular infiltration (PI) and disorganized hepatic cords in the hepatocytes (DH): of the diabetic group treated with glibenclamide. ×400 H&E

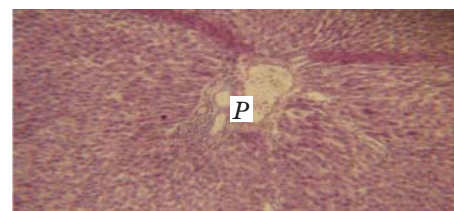


Fig. 5. Photomicrograph of the liver section showing severe periportal cellular infiltration (P) and disorganized hepatic cords of the hepatocytes: in the diabetic group treated with coconut water and methanolic extraction of *P. nitida* seeds. ×200 H&E

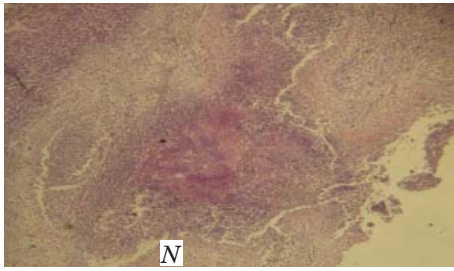


Fig. 6. Photomicrograph of the liver section showing severe necrosis of hepatocytes (N): in the group treated with methanolic extraction of *P. nitida* seeds. $\times 200$ H&E

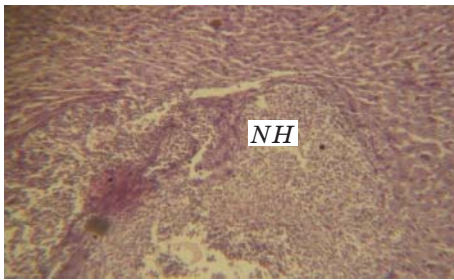


Fig. 7. Photomicrograph of the liver section showing necrosis of the hepatocytes (NH). $\times 200$ H&E

The Kidney

Photomicrograph of the kidney of the control rats revealed normal appearance of the glomeruli, tubules and blood vessels (Fig. 8).

Histopathological examination of the untreated group showed necrosis of the Bowman's capsule, enlarged perivascular space (oedema) of the kidney and tubular necrosis of the kidney. The group treated with coconut water extraction showed diffuse massive tubular epithelial cell degeneration, glomerular necrosis, congestion of the vessels and degeneration of the renal tubules. Similar lesions or more severe than these were seen in the other treated groups.

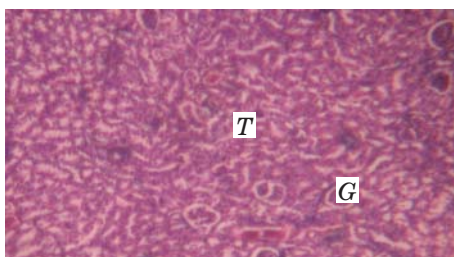


Fig. 8. Photomicrograph of a section of the kidney of control group: showing the normal appearance of the glomerulus (G), tubules (T), and blood vessels of the kidney. $\times 200$ H&E

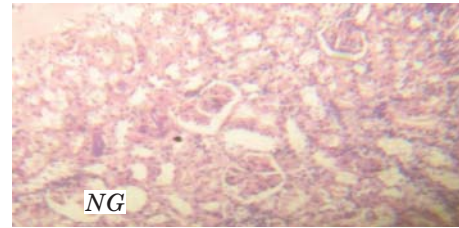


Fig. 9. Photomicrograph of a section of the kidney: showing necrotic glomerulus (NG) of the diabetic groups treated with coconut water, distilled water and methanolic extraction of the seeds of *P. nitida*. $\times 400$ H&E

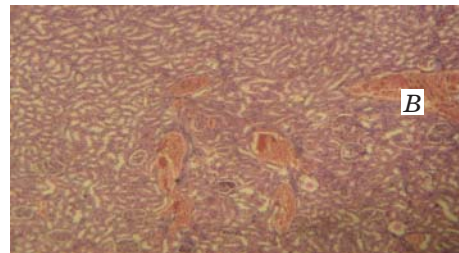


Fig. 10. Photomicrograph of a section of kidney showing congested blood vessels (B): in the groups treated with coconut water, distilled water, methanolic extraction of *P. nitida* seeds, also in glibenclamide treated group. $\times 200$ H&E

The Pancreas

The lesions observed in the different groups in the pancreas were as summarized in the Table 9 and Figures 11–18. These lesions include necrosis of the exocrine and fat cells, enlargement of the islet of Langerhans, hyperplastic ducts, proliferation of the blood vessels and blockage of the tubules by necrotic and inflammatory cells. Other lesions include the thickening of the tubular wall, perivascular necrosis and fibrosis as well as vascular degeneration of the cells of the islets.

Diabetes is a common and very prevalent disease affecting the people in both developed and developing countries [36]. According to the World Health organization's report in 2006, at least 171 million people worldwide suffer from diabetes [37]. The incidence of diabetes mellitus is increasing rapidly and it is estimated that by the year 2030, this number will double [37]. The primary goal of treatment of diabetes is to bring the elevated blood sugars down to a normal range in order to alleviate or prevent complications.

The use of herbal products for medicinal benefits has played an important role in nearly every culture on earth and for many years, not only because they are relatively cheap and readily available, but also due to ease with

Table 9. Summary of the severity of lesions in the pancreas in the various treatment groups

LESIONS	GROUPS						
	1	2	3	4	5	6	7
Necrosis of exocrine and fat cells	-	++	-	+	+	+	+
Enlarged islet of langerhans	-	++	-	+++	+++	+++	+
Hyperplastic ducts and ductular proliferation	-	-	-	+++	+++	++	+
Blockage of ductular lumen by inflammatory cells	-	++	-	+	++	++	++
Thickening of the walls of the tubules and vessels	-	-	-	++	+++	++	+
Peri-vascular necrosis and fibrosis	-	-	-	++	+++	++	++
Vascular degeneration of the cells of the islets and fat cells	-	-	-	+	+	+++	+

Notes: - not present; + mild; ++ moderate; +++ severe.

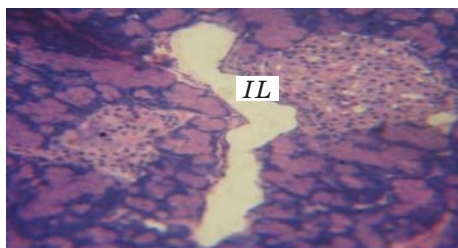


Fig. 11. Photomicrograph of the pancreas section: showing of normal appearance of the langerhans islets (IL) in the pancreas of normal control groups. ×400 H&E

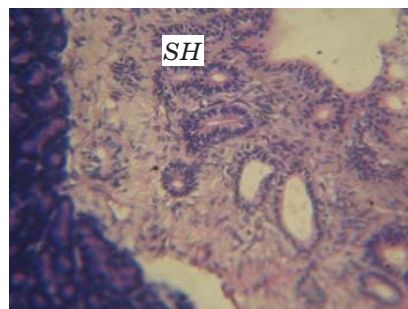


Fig. 14. Photomicrograph of a section of the pancreas: showing severe hyperplasia (SH) of the ductular wall. ×400 H&E

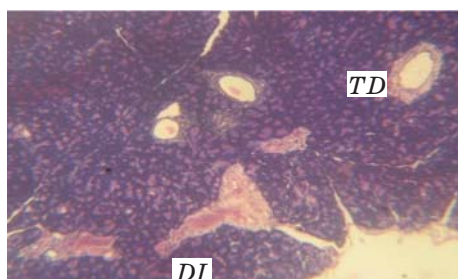


Fig. 12. Photomicrograph of a section of the pancreas: showing degeneration of the langerhans islets (DI) and thickened duct (TD). ×100 H&E
PANCREAS: hyperplastic ductular wall

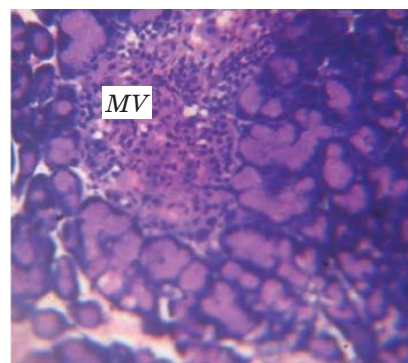


Fig. 15. Photomicrograph of a section of the pancreas: showing mild vacuolation (MV) of islet cells. ×200 H&E

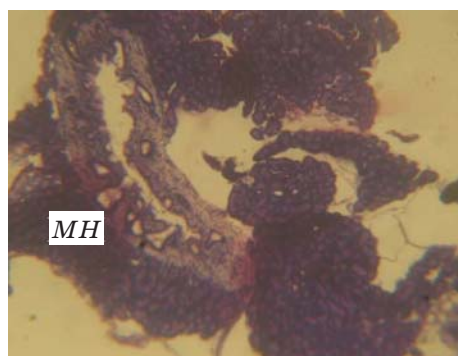


Fig. 13. Photomicrograph of a section of the pancreas: showing mild hyperplasia (MH) of the ductular wall. ×100 H&E

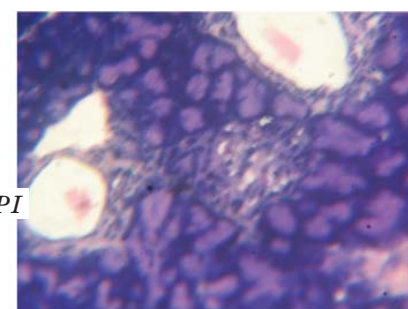


Fig. 16. Photomicrograph of a section of the pancreas: showing periductal cellular infiltration (PI). ×200H&E

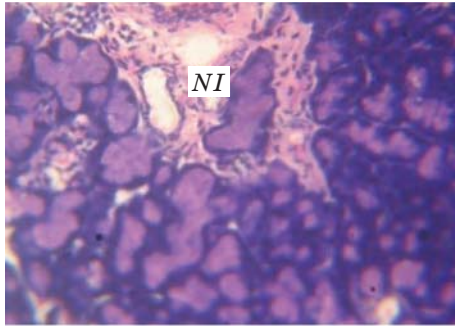


Fig. 17. Photomicrograph of a section of the pancreas: showing necrotic islet (NI). $\times 400$ H&E

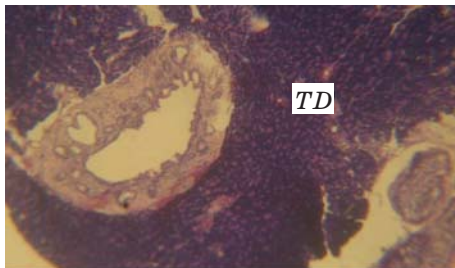


Fig. 18. Photomicrograph of a section of the pancreas: showing thickened pancreatic duct. $\times 200$ H&E

which they can be administered. One of such disease condition in which herbal products is being advocated for its management is diabetes mellitus [38].

Changes in body weight are usually considered in all physiological conditions. The diabetic control group showed a remarkable decrease in body weight at the end of the study. On the other hand, increase in body weight was observed in all the seed extract treated groups and also in the control groups.

Increased oxidative reactions level shows the production of free radicals and reactive oxygen species which are formed under normal physiological conditions but may become deleterious when they are not quenched by the antioxidant molecule(s) within the systems [39]. The antiradical activity of the different extracts of *Picralima nitida* seeds showed that the methanolic extract of the seed has the highest percentage inhibition 36.73%, thus having higher free radical scavenging activity, this is followed by the aqueous extract 19.36%, while the coconut water has the least percentage inhibition of 4.09%.

There have been reports on the increase in blood glucose during diabetes in rats and humans [40–44]. The blood glucose lowering effect of *P. nitida* extract after induction by alloxan is in agreement with the reports of Sa-

lihu et al. [24] and Inya-Agha et al. [45]. This could be attributed to the presence of some active ingredient(s) that enhances its ability to increase the permeability of cell plasma membrane to glucose. There has been an increase in the prevalence of atherosclerosis and hyperlipidaemia among diabetics worldwide [46]. This is said to occur as a result of the altered lipid profile in the serum of diabetic patients [47, 48], which is as a result of increase in plasma triglycerides and total cholesterol levels. Hypercholesterolemia has been reported to occur in alloxan-diabetic rats [49, 50]. The most common lipid abnormalities in diabetes are hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia [51]. This was observed in the lipid profile of the diabetic control group. In our study there was a significant decrease in the lipid profiles of all the three groups treated with extracts of *Picralima nitida* seeds. However, the group treated with coconut water seed extract showed a significant decrease in total cholesterol level when compared with the control, followed by the methanolic extract treated group. There was also a significant decrease in the total triglyceride and vLDL of all the seed extract treated groups. However, glibenclamide, a standard drug for diabetes, showed a most pronounced decrease in the lipid profile levels. The observed hypolipidemic effect may be attributed to decreased blood glucose levels and decreased cholesterologenesis as well as fatty acid synthesis. This is similar to the report of Bopanna et al. [52].

Anaemia is a medical condition caused by an abnormally low number of RBC, PCV and the Hb content. The anaemia occurring in diabetes is due to the increased non-enzymatic glycosylation of RBC membrane protein which correlates with hyperglycemia [1]. This study showed a marked reduction in the PCV and Hb content in the diabetes-induced but untreated group. The treated groups showed improvement in the PCV and Hb content. This indicates that the seed extract of *Picralima nitida* might probably contain some phytochemicals that were able to increase or boost the level of packed cell volume and Hb concentration.

Aspartate- (AST) and alanine transaminase (ALT) are found predominantly in the liver, and are biochemical markers for liver injury in patients [3]. Elevated activity of both enzymes above normal is an indication of possible liver damage. Although, the diabetes-induced groups all had high activities of AST and ALT when compared with the control, there was

significant reduction in the activities of these enzymes in all the extract treated groups. Only the untreated group had very high levels, thus indicating liver impairment.

Plasma GGT is a measure of the hepatobiliary system. Elevated plasma GGT activity has been reported to be found in diseases of the liver, biliary system and pancreas [53]. There was a significant reduction in the plasma GGT of the treated groups. This indicates an improvement in the hepatobiliary system.

High lipid peroxidation level is a sign of oxidative damages. Oxygen free radicals species have been implicated in the pathogenesis of diabetes mellitus [54]. This was seen in all the diabetes — induced groups, but the extract treated groups showed significant decrease in the extent of lipid peroxidation. This could probably be due to the presence of the alkaloids and glycosides present in the seed extracts. However, the untreated group had a very high level lipid peroxidation.

Picralima nitida seeds have been reported to be rich in alkaloids and glycosides [8, 24]. Glycosides present in the seeds have been reported to be responsible for the blood glucose reduction through pancreatic and extra pancreatic effect. These pancreatic and extra pancreatic effects on the blood glucose could be through prevention of hepatic glucose over

production, increase in glucose uptake by the muscles, inhibition of gastric emptying and/or increase in glucose permeability of plasma cell membrane.

Although, diabetes mellitus have been reported to be associated with varied histological changes in different organs, in this study, histological examinations of the pancreas of the treated and untreated groups showed varying degree of degenerations but the extent of severity in the lesions were more pronounced in the extract treated groups. The histopathological examination of the liver and kidney also revealed varying degree of degenerations in these organs. This suggests the inability of the different extracts administered to, either prevent the uptake of alloxan into the cells, or to interfere with its destructive actions in the cells. It could therefore be concluded that although, *Picralima nitida* seed extracts were seen to reduce diabetes to some extent (with the methanolic extract having highest antioxidant property than the others), however, this plant seed extract did not produce any observable ameliorative or regenerative properties to the organs damaged by alloxan. Thus, caution should be exercised while taking *P. nitida* seed extracts decoctions (traditionally) or recommending it as a possible remedy against diabetes.

REFERENCES

1. Umar I. A., Mohammed A., Dawud F. A., Kyari, H., Abdullahi M. Anti-diabetic action of the aqueous extract of *Ocimum suave* in alloxan – induced diabetic rats. *Afr. J. Biotechnol.* 2012 11(38), 9243–9247.
2. Lubert S. Metabolic derangement in diabetes result from relative insulin insufficient and glucogen excess. *Intergration of metabolism. Biochemistry.* 1995, 4th ed., P. 780.
3. Harris M. National Diabetes: Data Group National institutes of health. Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. «Diabetes in American». 2nd ed. NIH. 1995, P. 1395–1468.
4. Meyer P. A. Digestion and absorption in: Murry R. K. Harper's Biochemistry Stamford. *Appleton and Lange.* 2000, P. 178–188.
5. Barnett H. A., O' Gara G. Diabetes and the heart: clinical practice series. *Churchhill livingstone Edinburge, United Kingdom.* 2003, P. 7–30.
6. Harris M. I., Flegal, K. M., Cowie C. C., Eberhardt M. S., Goldstein D. E., Little R. R., Wiedmeyer H. M., Byrd-Holt D. D. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in United States adults. The third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Diabetes care.* 1998, 21(4), 518–524.
7. Nathan D. M., Cleary P. A., Backlund, J. Y., Genuth S. M., Lachin J. M., Orchard T. J., Raskin P., Zinman B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular diseases in patient with type 1 diabetes. *New England J. Med.* 2005, 353(25), 2643–2653.
8. Corbett A. D., Menzies J. R. W., Macdonald, A., Paterson, S. J., Duwiejua, M. The opioid activity of akuammine, akuammicine and akuammidine: alkaloids from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). *Brit. J. Pharmacol.* 1996, V. 119, P. 334.
9. Ubulom P., Akpabio E., Udobi C., Mbon R. Antifungal activity of aqueous and ethanolic extracts of picralima nitida seeds on *Aspergillus flavus*, *Candida albican* and *Microsporium canis*. *Pharmaceut. Biotechnol.* 2011, 3(5), 57–60.
10. Keay R. W. J., Onochie C.I.A., Stemfield D. D. Nigerian Trees. *Federal Department of Forest Resources: Ibadan, Nigeria.* 1964, P. 1–20.
11. Aguwa C. N., Ukwe C. V., Inya-Agha S. I., Okonta J. M. Antidiabetic effect of *Picralima*

- nitida* aqueous seed extract in experimental rabbit model, *J. Natl. Remed.* 2001, V. 1, P. 135–139.
12. Iroegbu C. U., Nkere C. K. Evaluation of the antibacterial properties of *Picralima nitida* stem bark extracts. *Intern. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 2005, 1(2), 182–189.
 13. Ansa-Asamoah R., Kapadia G. J., Lloyed H. A., Sokoski E. A. Picratidine, a new indole alkaloid from *Picralima nitida* seeds. *J. Nat. Prods-Lloydia.* 1990, V. 5, P. 975–977.
 14. Magihu M., Mbuyi M., Ndele M. B. Use of Medicinal Plants among the Pygmies (Mbutu) to treat Malaria in the area of Mambasa, Ituri, Zaire. *The Biodiversity of African Plants, Wageningen, Netherland.* 1996, P. 741–746.
 15. Francois G., Ake Assi L., Holenz J., Bringmann G. Constituents of *Picralima nitida* display inhibitory activities against asexual erythrocytic forms of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 1996, V. 54, P. 113–117.
 16. Iwu M. M., Klayman D. L. Evaluation of *in vitro* antimalarial activity of *Picralima nitida* extracts. *J. Ethnopharmacol.* 1992, V. 36, P. 133–135.
 17. Kspadia G. J., Angerhofer C. K., Ansa-Asamoah R. Akuammine: an antimalarial indolemonoterpene alkaloid of *Picralima nitida* seeds. *Planta Medica.* 1993, 59(6), P. 565–566.
 18. Moeller B. L., Seedorff L., Nartey F. Alkaloids of *Picralima nitida*. *Phytochemistry.* 1972, V. 11, P. 2620–2621.
 19. Iwu M. M., Klayman D. L., Bass G. T. Antimalarial activity of Indole alkaloids from *Picralima nitida*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992, V. 47, P. 179–186.
 20. Wosu L. O., Ibe C. C. Use of extract of *Picralima nitida* bark in the treatment of experimental trypanosomiasis: A preliminary study. *J. Ethnopharmacol.* 1989, V. 25, P. 263–268.
 21. Menzies J. R. W., Paterson S. J., Duwiejua M., Corbett A. D. Opioid activity of alkaloids extracted from *Picralima nitida* (fam. Apocynaceae). *Eur. J. Pharmacol.* 1998, V. 350, P. 101–108.
 22. Ezeamuzie I. C., Ojinnaka M. C., Uzogara E. O., Oji S. E. Antiinflammatory, antipyretic and antimalarial activities of a West African medicinal plant *Picralima nitida*. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 1994, 23(1), 85–90.
 23. Levy A., Collin M. C. Anticholinergic properties of pseudo Akamminigine alkaloid of *Picralima nitida* Apocynaceae. *Ann. Pharmaceut. Franc.* 1978, V. 36, P. 77–83.
 24. Salihu M. A., Luqman A. O., Oshiba O. J., Rabi O. Jimoh, Sikiru A. Jimoh, Ayokunle Olawepo, Adesola I. R. Abioye. Comparative study of the hypoglycemic effects of coconut water extract of *Picralima nitida* seeds (Apocynaceae) and Daonil in alloxan-induced diabetic albino rats. *Afr. J. Biotechnol.* 2009, 8(4), 574–576.
 25. Okonta J. M., Adibe M. O., Ubaka C. M. Antiulcer activity of methanolic extract and fractions of *Picralima nitida* seeds (Apocynaceae) in rats. *Asian Pacific J. Trop. Med.* 2010, V. 7, P. 13–15.
 26. Ayoub R. C., Zahid M. Q., Syed A. R., J. William, M. Arshad. Quantitative determination of Antioxidant potential of *Artemisia persica*. *Analele Universitatii din Bucuresti-Chimie (serie noua).* 2010, 19(1), 23–30.
 27. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Amer. J. Clin. Pathol.* 1957, V. 28, P. 56–63.
 28. Weatherburn M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 1967, V. 39, P. 971–982.
 29. Trinder P. Mono-reagent enzymatic glucose. *Clinical Chemistry W. B. Sanders, Philadelphia.* 1969, P. 24–27.
 30. Sandkamp M., Funke H., Schulter Köhler E., Assmann G. Lipoprotein (a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age. *Clin. Chem.* 1990, V. 36, 20–23.
 31. Szasz G. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd English ed. New York, Academic Press Inc. 1974, P. 717–720.
 32. Drapper H. H., Squines E. J., Mahemedi H. W. A comparative elevation of thiobarbituric acid method for the determination of malondialdehyde in biological material. *Freemed.* 1993, V. 15, P. 353–363.
 33. Schalm O. W., Carroll E. J. In: Veterinary Hematology. 3rd ed., Lea and Febiger, Philadelphia. 1975, P. 204–206.
 34. Omotainse S. O., Anosa V. O. Erythrocyte response to *Trypanosoma brucei* in experimentally infected dogs. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 1992, 45(3), 279–283.
 35. Krause W. J. The art of examining and interpreting histological preparations. *A student handbook. Parthenon Publishing group, U. K.* 2001, P. 9–10.
 36. Erasto P., Adebola P. O., Grierson D. S., Afolayan A. J. An ethanobotanical study of plants used for the treatment of diabetes in the Eastern Cape Province, South Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 2005, 4(2), 1458–1460.
 37. American Diabetes Association. Total prevalence of diabetes and pre-diabetes. *American Diabetes Association.* 2005, P. 15.
 38. Osinubi A. A., Ajayi O. G., Adesiyun A. E. Evaluation of the antidiabetic effect of aqueous leaf extracts of *Tripinanthus butungil* in male spragne Dawley rats. *Med. J. Islamic World Acad. Sci.* 2006, 16(1), 41–47.
 39. Fang Y. Z., Yang S., Wu G. Free radical, antioxidant and nutrition. *Nutrition.* 2002, V. 18, P. 872–890.

40. Ozougwu J. C. Anti-diabetic effects of *Allium cepa* (onions) aqueous extracts on alloxan-induced diabetic *Rattus norvegicus*. *J. Med. Plants Res.* 2010, 5(7), 1134–1139.
41. Hamme H. R., Martins S., Federlin K., Geisen K., Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetes retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991, V. 88, P. 11555–11558.
42. Sharpe P. C., Yue K. M., Catterwood M. A., McMaster D., Trimble E. R. The effects of glucose induced oxidative stress on growth and extracellular matrix gene expression of vascular smooth muscle cells. *Diabetologia.* 1998, V. 41, P. 1210–1219.
43. Tukuneu N. B., Bcyraktar M., Varli K. Reversal of defective nerve conduction with vitamin E supplementation in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1998, V. 21, P. 1915–1918.
44. Bell B. M., Hayes J. R., Stout R. W. Lipoprotein, insulin and glycaemic control in diabetes. *Hormon. Metab. Res.* 1984, V. 16, P. 252–260.
45. Inya-Agha S. I., Ezea S. C., Odukoya O. A. Evaluation of picralima nitida: Hypoglycemic Activity, Toxicity and Analytical Standards. *Intern. J. Pharmacol.* 2006, 2(5), 576–580.
46. Pepato M. T., Baviera A. M., Vendramini R. C., Perez Mda P., Kettelhut Ido C., Brunetti I. L. *Cissus sicyoides* (Princess Vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003, V. 3, P. 15–20.
47. Orchard T. J. Dyslipoproteinemia and diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 1990, V. 19, P. 361–379.
48. Betteridge D. J. Diabetic dyslipidaemia. *Am. J. Med.* 1994, V. 96, P. 25–31.
49. Sharma S. R., Dwivedi S. K., Swarup D. Hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of *Cinnamomum tomala* leaves. *Ind. J. Exp. Biol.* 1996, V. 34, P. 372–374.
50. Pushparaj P., Tan C. H., Tan B. K. Effect of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2000, V. 72, P. 69–76.
51. Mitra K. S., Gopumadahavan S., Muralidhar S. T., Anturlikar S. D., Sujatha M. B. Effects of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, hemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. *Ind. J. Exp. Biol.* 1995, V. 33, P. 798–800.
52. Bopanna N. K., Kannan J., Gadgil S. Antidiabetic and antihyperglycemic effects of neem seed kernel powder on alloxan diabetic rabbits. *Ind. J. Pharmacol.* 1997, V. 29, P. 162–167.

**ДЕЯКІ НЕСПРИЯТЛИВІ ЕФЕКТИ,
ПОВ'ЯЗАНІ З ВИКОРИСТАННЯМ
БІОПРЕПАРАТУ З ЕКСТРАКТУ
НАСІННЯ *Picralima nitida*
ЯК АНТИДІАБЕТИЧНОГО АГЕНТА**

О. А. Акинлойе¹, Є. А. Балогун²,
Т. А. К. Омотанзе¹, О. О. Аделеїс¹

¹Відділ біохімії, Федеральний університет сільського господарства, Абеокута, Нігерія
²Відділ ветеринарної патології, Федеральний університет сільського господарства, Абеокута, Нігерія

E-mail : oaakin@yahoo.com

За допомогою біохімічних і гістологічних методів вивчено деякі несприятливі ефекти, які можуть бути пов'язані з використанням біопрепарату з насіння *P. nitida* як гіпоглікемічного засобу. Антирадикальну активність біопрепарату визначали за допомогою стабільного радикала 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразу. Біохімічні дослідження включали визначення активності аланін- і аспартатаміно-, гамма-глутамілтрансферази, концентрації глюкози крові, електролітів (натрій, калій і бікарбонат), рівня пероксидного окиснення ліпідів. Визначали також параметри крові (кількість

**НЕКОТОРЫЕ НЕБЛАГОПРИЯТНЫЕ
ЭФФЕКТЫ, СВЯЗАННЫЕ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПРЕПАРАТА
ИЗ ЭКСТРАКТА СЕМЯН *Picralima nitida*
В КАЧЕСТВЕ АНТИДИАБЕТИЧЕСКОГО
АГЕНТА**

О. А. Акинлойе¹, Е. А. Балогун²,
Т. А. К. Омотанзе¹, О. О. Аделеїс¹

¹Отдел биохимии, Федеральний университет сельского хозяйства, Абеокута, Нігерія
²Отдел ветеринарної патології, Федеральний университет сельского хозяйства, Абеокута, Нігерія

E-mail : oaakin@yahoo.com

С помощью биохимических и гистологических методов изучены некоторые неблагоприятные эффекты, которые могут быть связаны с использованием биопрепарата из семян *P. nitida* в качестве гипогликемического средства.

Антирадикальную активность биопрепарата определяли с помощью стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразу. Биохимические исследования включали определение активности аланин- и аспартатаміно-, гамма-глутамілтрансферазы, концентрации глюкозы крови, электролитов (натрий, калий и

сумарних клітин крові, еритроцитів і лімфоцитів), функцій печінки і нирок, а також ліпідний профіль. Гістопатологічні дослідження печінки, нирок і підшлункової залози було виконано за допомогою стандартного методу фарбування гематоксилін-еозином.

За введення щурам Вістар максимальну антиоксидантну активність порівняно з контрольними розчинами (водний і водно-кокосовий екстракти) мав метанольний екстракт насіння (36,73%), що вказує на його високий ступінь нейтралізації вільних радикалів, далі — водний (19,36%) і водно-кокосовий екстракти (4,09%). У всіх оброблених щурів наприкінці експерименту спостерігали значне зниження ($P < 0,05$) концентрації глюкози крові (в діапазоні від 55,59% до 41,66%) та істотне збільшення ($P < 0,05$) маси тіла (в межах від 9,26% до 38,89%). Для всіх груп, які отримували екстракт насіння, характерним було збільшення гематологічних показників ($P < 0,05$), а також достовірне ($P < 0,05$) зниження параметрів ліпідних профілів і активності ензимів плазми. У всіх групах, які отримували екстракт, спостерігали іонорегуляторні порушення, зокрема гіперкаліє- і гіпернатріємію, однак вони були значно меншими ($P < 0,05$) наприкінці обробки. У всіх дослідних групах були істотно нижчі концентрація сечовини і бикарбонату та рівень пероксидного окиснення ліпідів. Гістопатологічні дослідження показали, що екстракти не коригували деякі спостережувані патологічні стани тканин, індуковані діабетом. Хоча, згідно з даними літератури, цукровий діабет супроводжується різними гістологічними змінами в різних органах, одержані в цій роботі результати морфологічного вивчення тканини підшлункової залози в групах тварин, які отримували і не отримували біопрепарат, свідчать про наявність ушкоджень різного ступеня, однак їх тяжкість в осередках ураження була більш виражена за введення біопрепарату екстракту насіння. У зв'язку з цим одержані дані, які дали змогу визначити гіпоглікемічну і антиоксидантну активність біопрепарату з екстрактів насіння *Picralima nitida* як антидіабетичного засобу, дають підстави стверджувати, що використовувати його для лікування цього захворювання слід з обережністю.

Ключові слова: цукровий діабет, екстракт насіння *Picralima nitida*, біохімічні, гістологічні дослідження.

бикарбонат), урвня пероксидного окислення ліпідів. Определяли также параметры крови (число суммарных клеток крови, эритроцитов и лимфоцитов), функций печени и почек, а также липидный профиль. Гистопатологические исследования печени, почек и поджелудочной железы были выполнены с помощью стандартного метода окрашивания гематоксилин-еозином.

При введении крысам Вистар максимальной антиоксидантной активностью по сравнению с контрольными растворами (водный и водно-кокосовый экстракты) обладал метанольный экстракт семян (36,73%), что указывает на его высокую степень нейтрализации свободных радикалов; затем следовал водный (19,36%) и водно-кокосовый экстракты (4,09%). У всех обработанных крыс в конце эксперимента наблюдали значительное снижение ($P < 0,05$) концентрации глюкозы крови (в диапазоне от 55,59% до 41,66%) и существенное увеличение ($P < 0,05$) массы тела (в пределах от 9,26% до 38,89%). Для всех групп, получавших экстракт семян, характерным было увеличение гематологических показателей ($P < 0,05$), а также достоверное ($P < 0,05$) снижение параметров липидных профилей и активности энзимов плазмы. Во всех группах, получавших экстракт, наблюдали ионорегуляторные нарушения, в частности гиперкаліє- и гипернатріємію, но они были значительно менее выражены ($P < 0,05$) в конце обработки. Также во всех опытных группах была существенно ниже концентрация мочевины и бикарбоната, а также уровень пероксидного окисления липидов. Гистопатологические исследования показали, что экстракты не корригировали некоторые наблюдаемые патологические состояния тканей, индуцированные диабетом. Хотя, согласно данным литературы, сахарный диабет сопровождается различными гистологическими изменениями в различных органах, полученные в этой работе результаты морфологического изучения ткани поджелудочной железы в группах животных, получавших и не получавших биопрепарат, свидетельствуют о наличии поврежденных различной степени, однако степень их тяжести в очагах поражения была более выражена при введении биопрепарата из экстракта семян. В связи с этим полученные данные, которые позволили определить гипогликемическую и антиоксидантную активность биопрепарата из экстрактов семян *Picralima nitida* в качестве антидиабетического средства, дают основание утверждать, что использовать его для лечения этого заболевания следует с осторожностью.

Ключевые слова: сахарный диабет, экстракт семян *Picralima nitida*, биохимические и гистологические исследования.

ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ З ВИНОГРАДНОГО ВИНА НА АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ЕНЗИМІВ У ЩУРІВ ЗА НИЗЬКИХ ДОЗ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

У. В. Дацюк¹М. В. Сабадашка¹Л. О. Дацюк¹А. Р. Гнатуш¹Є. А. Сластия²А. М. Зотов²В. Г. Гержилова²Н. О. Сибірні¹¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
Україна²Національний інститут винограду та вина «Магарач»,
Ялта, Україна

E-mail: starankoulyana@gmail.com

Отримано 24.12.2013

Показано, що споживання щурами з питною водою природного поліфенольного комплексу з виноградного вина в добовій дозі $12,5 \pm 1,1$ мг поліфенолів/кг маси впродовж 10 діб до радіаційного впливу призводить до підвищення активності супероксиддисмутази та глутатіонредуктази в лізатах периферичної крові на 24-ту та 48-му год після загального рентгенівського опромінення в дозі 30 сГр. Активність каталази, глутатіонпероксидази та вміст ТБК-позитивних продуктів упродовж 72 год після опромінення зберігається на рівні контролю. Відзначено зниження активності супероксиддисмутази на 24-ту і каталази на 24-ту і 48-му год після дії іонізуючого опромінення та зростання вмісту продуктів ПОЛ у всі досліджувані терміни. У лізатах аорти встановлено зниження активності супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази на 48-му год після радіаційного впливу й підвищений вміст ТБК-позитивних продуктів протягом 3 діб. За опромінення і введення поліфенольного комплексу з виноградного вина в лізатах аорти не виявлено змін активності супероксиддисмутази та каталази, тоді як активність глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази була підвищеною через 72 год після радіаційного впливу. Споживання поліфенолів виноградного вина достовірно знижувало вміст ТБК-позитивних продуктів у лізатах аорти опромінених щурів порівняно з тваринами, які було опромінено без споживання поліфенолів.

Ключові слова: іонізуюче випромінювання низької потужності, антиоксидантні ензими, природний поліфенольний комплекс із виноградного вина.

Особливістю біологічної дії іонізуючого випромінювання є збудження та іонізація атомів і молекул з наступним утворенням високоактивних радикалів, здатних ушкоджувати клітинні структури [1]. В організмі зростає навантаження на захисні механізми, що запобігають безконтрольному лавиноподібному зростанню вмісту продуктів окиснення, у тому числі й на активність антиоксидантних ензимів [2]. Іонізуюче випромінювання в низьких дозах індукує генерацію активних форм кисню (АФО) та продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [3]. АФО ушкоджують різні біологічні молекули: спричиняють розриви ДНК, утворення зшивок поліпептидних ланцюгів у протеїнах, окиснення SH-груп, активацію

або інактивацію ензимів, полімеризацію вуглеводів. Найбільш негативним процесом для клітин вважають ініціювання ними ланцюгів вільнорадикального пероксидного окиснення ліпідів [3].

Механізми захисту клітини від АФО та ПОЛ реалізуються через ріст активності антиоксидантних ензимів, які знешкоджують супероксиданіон, пероксид водню, ліпопероксидази, та за рахунок неензиматичних сполук, що мають антиоксидантні властивості й детоксикують реактивні похідні молекулярного кисню.

До антиоксидантних ензимів належать супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатіонпероксидаза (ГПО) та інші пероксидази, функціонування яких пов'язане між собою, оскільки кінцеві продукти одних

реакцій є субстратами для інших. До неензиматичних антиоксидантів належать вітаміни А, С, Е, Р, К, відновлений глутатіон, естрогени тощо [4, 5].

Аналіз літератури щодо впливу невисоких та малих доз іонізуючого випромінювання на активність антиоксидантних ензимів свідчить про різноспрямований характер змін у різних тканинах та клітинах живих організмів. Показано, що малі дози радіації підвищують активність СОД. Так, одноразове опромінення в дозах 0,25 та 0,5 Гр спричинювало зростання активності ензиму в різних тканинах упродовж тривалого терміну дослідження [6]. Підвищеною була активність в еритроцитах персоналу радіологічних кабінетів [7], тимчасом як за даними інших авторів у еритроцитах людей, які працювали в умовах підвищеної радіації та в гемолізатах крові щурів, яких утримували впродовж місяця в умовах підвищеного радіаційного фону, виявлено зниження активності цього ензиму [8, 9]. Зростання експресії гена СОД у селезінці мишей спостерігали лише на 23-тю добу після дії низької дози (0,5 Гр) [10].

Існують суперечливі дані й щодо змін активності каталази за радіаційного впливу в широкому діапазоні доз. Одноразове опромінення собак дозою 0,5 Гр зумовлювало зниження активності ензиму в крові впродовж 10–12 діб після опромінення з поступовим зростанням активності до рівня контролю [11]. За умов одноразового внутрішньоочеревинного введення ^{131}I (117 кБк / тварину) відбувалася хвилеподібна зміна активності каталази крові з активацією на 1-шу добу та подальше її зниження [12]. Активація експресії гена каталази і зростання активності ензиму в селезінці за опромінення в дозі 0,5 Гр виявлено на 23-тю добу після радіаційного впливу [10], тоді як в інших тканинах зафіксовано збільшення активності вже через декілька год [13].

Встановлено зниження активності ГПО в ранній період після опромінення з наступним підвищенням до рівня контролю або й вище [14, 15]. За хронічного опромінення малою дозою виявлено зростання активності ензиму в еритроцитах [7], тимчасом як активність ГР знижувалася з перших хвилин після опромінення і залишалася низькою впродовж десятків діб без тенденції до відновлення [15].

Застосування антиоксидантів як протирадіаційних засобів обґрунтовано і підтверджено експериментально. Оскільки продук-

ти ПОЛ є токсичними [16], їм водночас притаманний і радіопротекторний ефект.

Продукти виноробства викликають інтерес як потенційне джерело біологічно активних компонентів з антиоксидантними властивостями, зокрема поліфенолів та мінералів [17].

Рослинні фенольні сполуки з різним розташуванням гідроксильних груп у бензольному кільці — флавоноїди (рутин, кверцетин, катехіни, антоціани), фенольні кислоти (галова, елагова, оксидинамова), похідні пірокатехіну, пірогалолу, гідрокінону — мають низьку токсичність, добре розчинні у воді (окрім рутину і кверцетину), характеризуються високою біодоступністю. Ці сполуки виявляють здатність перехоплювати пероксидні та алкоксильні радикали, ефективно знешкоджують гідроксильний і супероксиданіон-радикали, синглетний кисень, чим блокують ініційовані ними реакції ПОЛ [18, 19].

Показано, що виноград, вино та препарати з виноградною насінням інгібують окиснення ліпопротеїнів низької густини, запобігаючи агрегації тромбоцитів і знижуючи ризик виникнення коронарних хвороб серця та серцево-судинних захворювань [20]. Проціанідини винограду зв'язуються з проліном колагену й еластину в стінках артерій, збільшуючи їхню протидію тисковій крові, відновлюють в ендотелії нормальний синтез NO та посилюють релаксацію судин [21]. Здатність поліфенольних сполук підвищувати стабільність мембран ендотелію судин є одним із провідних механізмів, що зумовлюють їхні антиатерогенні та антиоксидантні властивості [22].

З урахуванням антиоксидантних та імуностимулювальних властивостей природного поліфенольного комплексу винограду [23] цей нетоксичний комплекс речовин є перспективним як засіб профілактики і ранньої терапії радіоіндукованих ушкоджень тканин організму. Перевагою препаратів та біологічно активних добавок, виготовлених із природних антиоксидантів, є можливість їх перорального застосування.

Одним із чутливих тестів для виявлення змін, які ведуть до виникнення компенсаторних реакцій організму, є дослідження активності антиоксидантних ензимів та вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Актуальною є фармакологічна корекція цих змін за дії низьких доз іонізуючого випромінювання.

Метою роботи було дослідити вплив природного поліфенольного комплексу з виноградного вина на активність антиоксидантних ензимів і вміст продуктів ПОЛ у периферичній крові та аорті щурів за дії малих доз рентгенівського опромінення.

Матеріали і методи

Досліди було проведено на 56 білих безпородних щурах-самках масою 180–220 г відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових дослідженнях. Тварини впродовж експерименту перебували у стаціонарних умовах виварію, мали вільний доступ до питної води і були поділені на чотири групи: перша — контрольні тварини (К); друга — тварини, яким за 10 діб до початку та впродовж 3 діб експерименту давали з питною водою концентрат поліфенольного комплексу виноградного вина з розрахунку добової дози $12,5 \pm 1,1$ мг поліфенолів/кг маси тіла (К+П); третя — тварини, яким піддавали одноразовому опроміненню дозою 30 сГр (шкірно-фокусна відстань 95 см, напруга 130 кВ, сила струму 10 мА, фільтри Cu 0,5 мм та Al 1,0 мм, потужність дози — $8,3$ мГр·с⁻¹) (О); четверта — тварини, яким вводили з питною водою концентрат аналогічно другій групі та піддавали радіаційному впливу (О+П). Дозу опромінення контролювали клінічним дозиметром типу 27012 (Otto Shon, Німеччина).

Концентрат поліфенольного комплексу одержували упарюванням червоного сухого вина марки Каберне-Совіньон (наданого Національним інститутом винограду і вина «Магарач», Крим) на роторному випарювачі Laborota-4001 з такими параметрами: $t = 40$ °С, тиск 0,8–0,9 кгс/см², 60 об/хв). Масова концентрація фенольних сполук у концентраті становила 59180 мг/л, масова концентрація полімерів — 40161 мг/л, проціанідинів — 7370 мг/л, речовин, які реагують з ваніліном, — 4122 мг/л, барвників — 2021 мг/л.

Для дослідження використовували кров із хвостової вени щурів та супернатант гомогенату аорти, одержаний після гомогенізації в гіпотонічному 50 мМ Na-К-фосфатному буфері (5 мг тканини/100 мкл буфера) центрифугуванням упродовж 15 хв за 20 тис. г.

Активність Cu, Zn-супероксиддисмутази (СОД) (1.15.1.1) визначали за методом Чеварі та ін. [24], каталази (1.11.1.6) — Корольок

та ін. [25], глутатіонпероксидази (ГПО) (1.11.1.9) — Моїн [26], глутатіонредуктази (ГР) (1.6.4.2) — Goldberg, Spooner [27]. Вміст ТБК-позитивних продуктів (ТБК-ПП) визначали згідно з [28], концентрацію протеїну — за загальноприйнятим методом [29].

Результати досліджень обробляли статистично з використанням програми Origin Pro. Відмінність досліджуваних показників вважали статистично достовірною за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Споживання з питною водою поліфенольного комплексу з виноградного вина ($12,5 \pm 1,1$ мг/кг маси) піддослідними тваринами не спричинювало вірогідних змін активності антиоксидантних ензимів та вмісту продуктів ПОЛ у периферичній крові, однак виявлено істотні відмінності в динаміці досліджуваних показників у тварин, які зазнавали радіаційного впливу без та на фоні споживання концентрату.

Наші дані свідчать про зниження активності СОД у периферичній крові на 55% на 24-ту год після опромінення, що, ймовірно, зумовлено надлишковим утворенням пероксиду гідрогену та гідропероксидів жирних кислот [30].

Водночас після опромінення та введення поліфенольного комплексу з виноградного вина відзначено зростання активності на 77% порівняно з контролем, що майже у 4 рази перевищує цей показник в опроміненіх тварин та на 49% більше порівняно з показниками групи тварин, яким вводили концентрат (табл. 1).

Таке зростання активності ензиму є наслідком збільшення кількості субстрату за радіаційного впливу. На 48-му год експерименту в групі опроміненіх тварин активність ензиму зростала до контрольних значень, а в групі тварин, які споживали поліфенольний комплекс, залишалася підвищеною на 65%.

Якщо на 3-тю добу в групі опромінення рівень активності СОД зростав у 2 рази порівняно з контролем, то у тварин, які споживали поліфеноли за опромінення, виявлено нормалізацію досліджуваного показника, що свідчить про виражену антиоксидантну дію поліфенольного комплексу з виноградного вина вже на ранніх стадіях експерименту.

Менш виражені зміни спостерігали під час дослідження активності каталази. Встановлено зниження активності ензиму на

Таблиця 1. Активність антиоксидантних ензимів і вміст ТБК-позитивних продуктів у лізатах крові за умов рентгенівського опромінення в дозі 30 сГр та на фоні введення поліфенольного комплексу з виноградного вина ($M \pm m$, $n = 6-10$)

Показники		СОД, U/мг протеїну	Каталаза, мкмоль/хв мг протеїну	ГПО, нмоль/хв мг протеїну	ГР, нмоль/хв мг протеїну	ТБК, нмоль/мл
К		4,54±0,60	137,75±2,10	345,09±2,76	3,44±0,31	200,44±14,40
К+П		5,04±0,84	133,51±10,82	345,46±1,99	3,74±0,42	222,25±18,44
О	24 год	2,04±0,35*	121,73±4,32*	406,71±9,45*	4,03±0,54	266,81±10,77*
	48 год	5,81±0,43	117,08±2,83*	414,10±10,37*	5,66±0,38*	286,32±14,11*
	72 год	9,12±0,19*	126,49±10,34	468,42±14,48*	6,77±0,61*	301,63±23,27*
О+П	24 год	8,05±0,87*#§	140,38±13,68	366,05±6,52§	7,31±0,35*#§	167,55±14,83§
	48 год	7,49±0,79*§	143,26±11,76#	352,69±6,11#	6,82±0,27*#§	228,50±12,14#
	72 год	5,03±0,72#	120,65±3,77	319,88±27,29#	5,77±0,44*#§	213,33±14,58#

Примітка. Тут і далі: * — достовірно порівняно з контролем ($P < 0,05$);

— достовірно порівняно з показниками опромінених тварин ($P < 0,05$);

§ — достовірно порівняно з показниками групи тварин, які отримували поліфенольний комплекс з виноградного вина ($P < 0,05$).

12 і 15%, відповідно, на 24-ту та 48-му год після рентгенівського опромінення, тоді як після радіаційного впливу на фоні введення поліфенолів вина активність каталази дещо перевищувала рівень контролю і на 48-му год достовірно зростала порівняно з показниками групи опромінених тварин (табл. 1), що корелює зі зростанням активності СОД у цій групі. Відомо, що надмірна продукція супероксиданіон-радикалу здатна пригнічувати активність каталази [30], що, очевидно, й зумовило зниження активності цього ензиму за дії іонізуючого випромінювання, оскільки активність СОД на 1-шу добу після опромінення була вдвічі нижчою від контрольних значень.

Встановлено стійке зростання активності ГПО у периферичній крові тварин, що зазнавали опромінення в усі пострадіаційні терміни дослідження (табл. 1). На 72-гу год експерименту активність ГПО досягала найбільшого значення, перевищуючи рівень контролю на 36%, тоді як за умов опромінення на фоні введення поліфенольного концентрату активність ензиму залишалась у межах контролю впродовж усіх термінів експерименту. Підвищення активності ГПО зумовлено, очевидно, зростанням вмісту пероксиду гідрогену — продукту супероксид-дисмутази реакції, до якого, як відомо,

спорідненість ензиму є вищою, ніж у каталази [31]. Оскільки за радіаційного впливу встановлено підвищення активності ГПО, закономірним є і зростання активності ГР порівняно з контролем на 65% та 97%, відповідно, на 2-гу та 3-тю добу експерименту (табл. 1). Відомо, що її функцією є підтримання постійного рівня відновленого глутатіону як кофактора ензиматичної активності. Більш виражене зростання активності ГР у групі тварин за опромінення на фоні введення поліфенольного комплексу, порівняно з контрольними та показниками групи тварин, яким вводили поліфеноли виноградного вина, пояснюється, ймовірно, зниженням вмісту відновленого глутатіону. Відомо, що продукти окиснення поліфенолів за надмірної продукції АФО здатні взаємодіяти з тіолами [32]. За посиленого окиснення катехинів, кверцетину та інших флавоноїдів у присутності клітинних пероксидаз і H_2O_2 виявлено кон'югацію окиснених продуктів із глутатіоном з утворенням моно- або диглутатіоніл-похідних та зниження вмісту відновленого глутатіону [33, 34].

На фоні зниження активності СОД та каталази на 24-ту і 48-му год дослідження за впливу опромінення встановлено стійке зростання вмісту ТБК-ПП у всі досліджувані терміни в периферичній крові щурів, що свідчить

про нездатність антиоксидантних ензимів до знешкодження надмірної кількості АФО. Вживання за дії іонізуючого опромінення поліфенольного комплексу з виноградного вина запобігало накопиченню продуктів ПОЛ як завдяки екзогенним антиоксидантам, так і внаслідок підвищення активності антиоксидантних ензимів.

Збільшення рівня АФО відіграє певну роль у виникненні патологічних змін серцево-судинної системи. Наслідком посиленого утворення АФО є надмірне утворення окиснених ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ). Гідропероксидази ЛПНЩ є джерелом гідроксидних радикалів, що відкривають пори у внутрішній мембрані мітохондрій та ушкоджують ендотелій судинних стінок [35]. За їх впливу відбувається активація тромбоцитів, лейкоцитів, перетворення моноцитів у макрофаги, порушується функція мембран клітин, зокрема провідної системи серця [36].

Результати досліджень з визначення активності антиоксидантних ензимів та вмісту продуктів ПОЛ в аорті щурів подано в табл. 2.

На відміну від периферичної крові, в аорті групи щурів, що споживали поліфенольний комплекс, виявлено зростання активності ГР порівняно з контролем. Відомо, що посилена акумуляція в ендотелії судин поліфенольних сполук здатна підвищувати активність антиоксидантних ензимів шляхом активації експресії відповідних генів [37].

За рентгенівського опромінення показано зниження активності СОД до 70% від рівня контролю на 48-му год експерименту, тоді як під час опромінення на фоні споживання поліфенольного комплексу активність ензиму залишалась у межах норми впродовж трьох діб. Зміни активності ГПО в аорті після дії радіаційного чинника мали хвилеподібний характер: спостерігалось зростання активності ензиму на 27% і 35% на 24-ту та 72-гу год, відповідно, і зниження на 20% на 48-му год, що вказує на часову зміну співвідношення прооксидантних та антиоксидантних факторів і дію компенсаторних механізмів. Після опромінення за умов введення поліфенолів виноградного вина зростання активності ГПО на 32% відзначено лише на 3-тю добу порівняно з контролем, що, можливо, зумовлено збільшенням вмісту гідропероксидів ліпідів, оскільки вміст ТБК-ПП у цей термін перевищує рівень контролю.

Зростання активності ГР в аорті на 31% після опромінення виявлено лише на 72-гу год дослідження, тоді як за опромінення та введення поліфенольного концентрату активність ензиму перевищувала контрольні показники на 34% і 39%, відповідно, на 24-ту та 72-гу год експерименту.

Підвищений рівень вмісту продуктів ПОЛ виявлено як після радіаційного впливу, так і за впливу опромінення та введення поліфенольного комплексу, однак в останньому разі вміст їх був значно нижчий

Таблиця 2. Активність антиоксидантних ензимів та вміст ТБК-позитивних продуктів у лізатах аорти за умов рентгенівського опромінення в дозі 30 сГр та введення поліфенольного комплексу з виноградного вина ($M \pm m$, $n = 6-10$)

Показники		СОД, U/мг протеїну	Каталаза, мкмоль/хв мг протеїну	ГПО, нмоль/хв мг протеїну	ГР, нмоль/хв мг протеїну	ТБК, нмоль/г тканини
К		30,48±3,52	10,05±0,97	44,68±3,66	8,47±0,34	265,64±43,97
К+П		31,54±1,89	12,37±1,19	43,41±4,34	10,02±0,50*	282,02±26,84
О	24 год	31,97±2,57	10,67±0,62	56,53±3,56*	8,07±1,04	404,67±26,86*
	48 год	21,01±2,47*	10,14±0,83	37,96±1,59*	7,66±0,38	371,40±21,93*
	72 год	35,10±3,10	12,41±1,30	60,15±3,07*	11,11±0,71*	353,84±13,85*
О+П	24 год	35,10±2,28	12,48±1,55	48,78±6,17	11,32±0,95**	323,36±16,86**
	48 год	27,45±0,96#	12,17±1,77	39,02±5,00	8,82±0,98	289,23±19,62#
	72 год	31,58±1,89	11,59±1,77	58,82±4,98*§	11,77±1,34*	301,54±2,69**

порівняно з відповідними показниками опромінених тварин.

Встановлено, що еритроцити людини здатні швидко зв'язувати на своїй поверхні велику кількість різноманітних поліфенольних сполук. Це сприяє посиленню загальної антиоксидантної ємності крові, яка формується сумою внутрішньоклітинних антиоксидантів, поліфенолів, зв'язаних із мембранами клітин крові та антиоксидантів плазми [38].

Проведені дослідження виявили відмінності в активності антиоксидантних ензимів периферичної крові та аорти за впливу низьких доз іонізуючого випромінювання. Відсутність змін у вмісті ТБК-позитивних продуктів у крові за радіаційного впливу на фоні введення поліфенолів з виноградного вина свідчить про збалансовану активність

антиоксидантних ензимів під впливом поліфенольного комплексу.

Відомо, що клітини епітелію, зокрема судинного, є високочутливими до дії іонізуючого випромінювання [39]. Саме тому виявлене підвищення в аорті вмісту продуктів ПОЛ та хвилеподібні зміни активності досліджуваних ензимів є свідченням суттєвіших негативних змін у цій тканині за дії іонізуючого випромінювання порівняно з периферичною кров'ю та неспроможність ензимів ефективно відновлювати прооксидантно-антиоксидантну рівновагу. Введення природного поліфенольного комплексу з виноградного вина суттєво поліпшує перебіг відповідних реакцій, оскільки рівень продуктів ПОЛ є нижчим ніж за опромінення, а отже, меншими є й наслідки променевого ушкодження аорти.

REFERENCES

1. Baraboy V. A. Bioantioxidants. *Kyiv: Kniga plus*. 2006, 462 p. (In Russian).
2. Baraboy V. A., Sutkovoy D. A. Oxydative-antioxidant homeostasis in norm and pathology. *Kyiv.: Chernobylinterinform*. 1997, Part 1, 202 p., Part 2, 220 p. (In Russian).
3. Skulachev V. P. The programmed death phenomena. Mitochondria, cells and organs: role of reactive oxygen species. *Sorosovskiy Obrazovatelnyi Zh.* 2001, 7(6), 4–10. (In Russian).
4. Baraboy V. A. Mechanisms of stress and peroxide oxidization of lipids. *Uspehi sovremennoj biologii*. 1991, 6(3), 923–931. (In Russian).
5. Cadenas E., Packer L. Antioxidants in health and disease. Handbook of antioxidants. L. Packer and J. Fuchs (Ed.). *N. Y.: Marcel Dekker*. 2001, 732 p.
6. Yamaoka K., Edamatsu R., Mori A. Time dependent changes in SOD activities and lipid peroxides levels in organs of rats after low dose X-ray irradiation. *J. Radiat. Res.* 1991, 32(1), 73.
7. Eken A., Aydin A., Erdem O., Akay C. Induced antioxidant activity in hospital staff occupationally exposed to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 2012, 88(9), 648–653.
8. Schweitzer K., Benko G., Bohos P. Untersuchungen der Superoxiddismutase (SOD) von humanen Erythrozyten an strahlungsgefährdeten Arbeitsplätzen. *Radiobiol. Radiother.* 1985, 26(5), 629–632.
9. Gacko G. G., Mazhul' L. M., Volyhina V. E. The effect of increased background radiation on lipid peroxidation in the blood of experimental animals. *Abstract of the 1st Scientific and Practical Conference, Minsk, Belarus*, 26–27 December 1989. (In Russian).
10. Kensuke O., Takao K., Hiroshi T. Activation of antioxidative enzymes induced by low-dose-rate whole body irradiation: adaptive response in terms of initial DNA damage. *Radiat. Res.* 2006, 166(3), 477–478.
11. Petrina L. G. Dynamics of blood enzyme activity of animals exposed by low doses X-ray. *Abstracts of the VI Ukrainian Biochemical Congress, Kyiv, Ukraine*, 12–15 May 1992. (In Ukrainian).
12. Grynevych Yu. P., Lypyska A. I., Teleczka S. V., Pospolita V. V. Peroxidation processes in the blood of rats and BMC single input ¹³¹I. *Abstracts of XIX Annual Scientific and Practical Conference of Institute for Nuclear Research of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*, 24–27 January 2012. (In Ukrainian).
13. Focea R., Nadejde C., Creanga D., Luchian T. Low dose X-ray effects on catalase activity in animal tissue. *J. Physics*. 2012, V. 398, P. 1–6.
14. Gudz T. I., Peshkova E. G., Goncharenko E. N. Inhibition of superoxide dismutase activity of linoleic acid hydroperoxide. The effect of ionizing radiation on glutathione peroxidase activity of rats tissues. *Radiobiologiya*. 1982, 22(4), 515–516. (In Russian).
15. Erden M., Bor N. M. Changes of reduced glutathione, glutathione reductase, and glutathione peroxidase after radiation in Guinea pigs. *Biochem. Med.* 1984, 31(2), 217–227.
16. Burlakova E. B., Goloshchapov A. N., Gorbunova N. B. Features of the biological effects

- of irradiation in low doses. *Radiobiologiya*. 1996, 36(4), 610–623. (In Russian).
17. Shrikhande A. J. Wine by-products with health benefits. *Food Res. Int.* 2000, V. 33, P. 469–474.
 18. Brenna O. V., Pagliarini E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J. Agric. Food. Chem.* 2001, V. 49, P. 4841–4844.
 19. Chun O. K., Kim D. O., Lee C. Y. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Agric. Food. Chem.* 2003, V. 31, P. 8067–8072.
 20. Dohadwala M. M., Vita J. A. Grapes and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 2009, 139(9), 1788–1793.
 21. Shao Z. H., Wojcik K. R., Dossymbekova A., Hsu C., Mehendale S. R., Li C. Q., Qin Y., Sharp W. W., Chang W. T., Hamann K. J., Yuan C. S., Hoek T. L. Grape seed proanthocyanidins protect cardiomyocytes from ischemia and reperfusion injury via Akt-NOS signaling. *J. Cell Biochem.* 2009, 107(4), 697–705.
 22. Silva R. C., Rigaud J., Cheynier V., Chemina A. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*. 1991, V. 30, P. 1259–1264.
 23. Mitjans M., Del Campo J., Abajo C., Martinez V., Selga A., Lozano C., Torres J. L., Vinardell M. P. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52(24), 7297–7299.
 24. Chevari S., Andyal T. D., Shtirenger D. Determination of the antioxidant properties of blood and their diagnostic value in old age. *Lab. delo*. 1991, 10, P. 9–13. (In Russian).
 25. Korolyuk M. A., Ivanova I. G., Mayorova I. G. Method for determination of the catalase activity. *Lab. delo*. 1988, V. 1, P. 16–18. (In Russian).
 26. Moin V. M. A simple and specific method for determination of the glutathione peroxidase activity in erythrocytes. *Lab. delo*. 1986, V. 12, P. 124–126. (In Russian).
 27. Goldberg D. M., Spooner R. J., Bergmeyer H. U. Glutathione reductase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. Weinheim. Verlag Chemie. 1983, P. 258–265.
 28. Timirbulatov R. A., Selezneva E. I. A method for increasing intensity of free radical oxidation of lipid-containing blood components and its diagnostic value. *Lab. delo*. 1981, V. 4, P. 209–211. (In Russian).
 29. Lowri O. H., Rosenbraugh M. J., Pori A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 1951, 193(1), 265–275.
 30. Dubinina E. E., Shugaley I. V. Oxidative modification of proteins. *Uspehi sovremennoj biologii*. 1993, 113(1), 71–81. (In Russian).
 31. Baud O., Green A. E., Li J., Wang H., Volge J. J., Rosenberg P. A. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 2004, 24(7), 1531–1540.
 32. Moridani M. Y., Scobie H., Jamshidzadeh A., Salehi P., O'Brien P. J. Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug Metab. Dispos.* 2001, V. 29, P. 1432–1439.
 33. Awad H. M., Boersma M. G., Vervoort J., Rietjens I. M. Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000, V. 378, P. 224–233.
 34. Awad H. M., Boersma M. G., Boeren S., Van Bladeren P. J., Vervoort J., Rietjens I. M. Quenching of quercetin quinone/quinone methides by different thiolate scavengers: stability and reversibility of conjugate formation. *Chem. Res. Toxicol.* 2003, V. 16, P. 822–831.
 35. Stocker R., Keaney G. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 2004, V. 4, P. 1381–1478.
 36. Lakshmi S. V., Padmaja G., Kuppusamy P., Kutala V. K. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 2009, 46(6), 421–440.
 37. Fernandez-Pachon M. S., Berna G., Otaolaurruchi E., Troncoso A., Martin F., Garcia-Parrilla C. Changes in antioxidant endogenous enzymes (activity and gene expression levels) after repeated red wine intake. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57(15), 6578–6583.
 38. Koren E., Koren R., Ginsburg I. Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Exp. Biol. Med.* 2010, 235(6), 689–699.
 39. Gajdusek C., Onoda K., London S., Jonson M., Monison R., Mayberg M. Early molecular changes in irradiated aortic endothelium. *J. Cell Physiol.* 2001, 188(1), 8–23.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ВИНОГРАДНОГО ВИНА НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ЭНЗИМОВ У КРЫС ПРИ НИЗКИХ ДОЗАХ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

У. В. Дацюк¹, М. В. Сабадашка¹,
Л. А. Дацюк¹, А. Р. Гнатуш¹,
Е. А. Слатья², А. Н. Зотов²,
В. Г. Гержикова², Н. А. Сибирная¹

¹Львовский национальный университет
имени Ивана Франко, Украина

²Национальный институт винограда и вина
«Магарач», Украина

E-mail:starankoulyana@gmail.com

Показано, что потребление крысами с питьевой водой природного полифенольного комплекса из виноградного вина в суточной дозе $2,5 \pm 1,1$ мг полифенолов/кг массы в течение 10 сут до радиационного воздействия приводит к повышению активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в лизатах периферической крови на 24-й и 48-й ч после общего рентгеновского облучения в дозе 30 сГр. Активность каталазы, глутатионпероксидазы и содержание ТБК-положительных продуктов в течение 72 ч после облучения сохраняется на уровне контроля. Отмечено снижение активности супероксиддисмутазы на 24-й и каталазы на 24-й и 48-й ч после действия ионизирующего облучения и возрастание содержания продуктов перекисидного окисления липидов во все исследуемые сроки. В лизатах аорты установлено снижение активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы на 48-й ч после радиационного воздействия и повышенное содержание ТБК-положительных продуктов в течение 72 ч. При облучении и введении полифенольного комплекса из виноградного вина в лизатах аорты не выявлено изменений активности супероксиддисмутазы и каталазы, в то время как активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы повышалась через 72 ч после радиационного воздействия. Употребление полифенолов виноградного вина достоверно снижало содержание ТБК-положительных продуктов в лизатах аорты облученных крыс по сравнению с животными, которые подвергались облучению без употребления полифенолов.

Ключевые слова: ионизирующее излучение низкой мощности, антиоксидантные ферменты, ТБК-положительные продукты, природный полифенольный комплекс из виноградного вина.

EFFECT OF POLYPHENOLIC COMPLEX FROM WINE ON RATS ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY AT X-RAY IRRADIATION LOW DOSES

U. V. Datsyuk¹, M. V. Sabadashka¹,
L. A. Datsyuk¹, A. R. Gnatush¹,
E. A. Slast'ya², A. N. Zotov²,
V. G. Gerhzykova², N. A. Sybirna¹

¹Ivan Franko National University of Lviv,
Ukraine

²National Institute for Vine and Wine
«Magarach», Ukraine

E-mail:starankoulyana@gmail.com

It is shown that the consumption of natural polyphenolic complex from grape wine in drinking water in the daily dose 2.5 ± 1.1 mg polyphenols/kg body mass of rats during the 10 day before exposure to radiation leads to increased of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in peripheral blood on 24 and 48 hours after full body X-ray irradiation (30 cGy). The of catalase, glutathione peroxidase activities and the of the reactive thiobarbituric acid substances content in total lysates of peripheral blood within 72 hours after exposure are comparable to those in control rats. Marked decreased of catalase and superoxide dismutase activities at 24, 48 and 24 hours, respectively, was observed after exposure to ionizing radiation and increased content of lipid peroxidation products in all above mentioned time points. The decreased of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in lysates of rats aorta at 48 hour and increased content of the reactive thiobarbituric acid substances during 72 hours after radiation exposure were observed. The consumption of polyphenolic complex from wine did not change the superoxide dismutase and catalase activities in lysates of aorta rats treated with ionizing radiation, whereas glutathione reductase and glutathione peroxidase activities was increased during 72 hours after radiation influence. The content of TBA reactive substances was significantly decreased in lysates of aorta rats that were exposed to radiation and polyphenols of grape wine, compared with those of animals that were exposed to radiation alone.

Key words: low intensity X-ray, antioxidant enzymes, TBC-positive products, natural polyphenol complex from grape wine.

ВИКОРИСТАННЯ ВТОРИННИХ ПРОДУКТІВ ПЕРЕРОБЛЕННЯ РІПАКУ В ХАРЧОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ

О. А. Ракша-Слюсарєва¹

В. О. Круль¹

О. А. Слюсарєв²

¹Донецький національний університет економіки і торгівлі
ім. М. Туган-Барановського, Україна

²Донецький національний медичний університет
ім. М. Горького, Україна

E-mail: rakshaslyusareva@gmail.com

Отримано 09.09.2013

У процесі одержання олії й біодизеля з насіння ріпаку утворюються вторинні продукти переробки, які на цей час раціонально не використовуються. Роботу присвячено проблемам можливого застосування їх у харчовій промисловості.

Під час виготовлення харчового продукту для спеціального дієтичного споживання було застосовано електрофізичний (обробка гідроелектроімпульсом) і фізичні (сушіння, подрібнення, обробка паром) методи оброблення сировини. Завдяки впровадженню технології перероблення ріпакової макухи одержують сировину, яка є придатною для використання в харчовій промисловості. На основі цієї сировини розроблено «Харчовий продукт для спеціального дієтичного харчування «Ріпаковий»». До його складу входить ріпакова макуха із насіння з низьким вмістом глюкозинолатів та ерукової кислоти, що була оброблена гідроелектроімпульсом, піддана сушінню в сухожаровій шафі або конвективній сушарці, подрібненню та знезараженню з використанням розробленої щадної технології для збереження біологічно активних речовин.

Виробництво цього продукту сприятиме вирішенню проблеми раціональної утилізації ріпакової макухи і розширення асортименту харчових продуктів для спеціального дієтичного споживання.

Ключові слова: технологія перероблення ріпакової макухи.

Ріпакова олія є перспективним джерелом одержання екологічно чистого рідкого палива — біодизеля, що швидко розкладається в ґрунті [1]. При цьому використання ріпаку для виготовлення біодизеля і у зв'язку з цим його значне поширення у світі й в Україні загострило проблему утилізації вторинних продуктів перероблення ріпаку [2]. Це стосується й виготовлення ріпакової олії, яка останнім часом набуває дедалі більшої популярності у світі як елемент масового й дієтичного харчування завдяки особливостям жирно-кислотного складу [3], що не має широкого застосування, але є перспективним для України. У подальшому це загострюватиме проблему утилізації відходів.

Після перероблення ріпаку на олію чи біопаливо утворюється такий вторинний продукт, як макуха, обсяги якої зростають. В Україні і світі ріпакова макуха здебільшого або втрачається як рослинна сировина, або використовується для годівлі худоби [4, 5]. Незважаючи на значний вміст у макусі

ріпаку цінних харчових і біологічно активних речовин, використання її у харчуванні людини обмежує наявність у складі глюкозинолатів [6], які надають продуктам гірко-го смаку.

Одним із шляхів утилізації та корисного застосування ріпакової макухи є можливість виготовлення з неї харчових продуктів для спеціального дієтичного споживання і збагачення ними харчових продуктів із заданими властивостями.

Використання цільних — не ізольованих чи екстрагованих за допомогою фізико-хімічних методів вторинних продуктів перероблення ріпаку — раніше було неможливим через неприйнятний для людини гіркий смак. Оброблення ріпакової макухи гідроелектроімпульсом дає змогу змінити її органолептичні показники й зробити придатною для використання у виготовленні харчових продуктів для спеціального дієтичного споживання чи із заданими властивостями [7]. У 2007 р. нами було встановлено можливість

використання ріпакової макухи, обробленої гідроелектроімпульсом, для одержання харчових продуктів. У результаті створено продукт під робочою назвою «Харчова добавка "Ріпак"» [8]. Згодом йому присвоєно назву «Харчовий продукт для спеціального дієтичного харчування "Ріпаковий"» (ХПР) і одержано позитивний висновок Державної санітарно-епідеміологічної експертизи №05.03.02-066/1504 на проект ТУ розробленого продукту.

У модельних дослідженнях на тваринах показано біологічну активність цього продукту, який стимулює імунну систему і справляє радіопротекторну дію [9].

Однак попри набуття достатніх органолептичних властивостей і навіть їх поліпшення щодо запаху й смаку, ХПР не був придатним для самостійного споживання і введення в харчові продукти у зв'язку з виявленими нами випадковими забрудненнями довілля патогенними й умовно патогенними мікроорганізмами сировини у процесі технологічних операцій. Це зумовило необхідність подальшої роботи у напрямі вдосконалення ХПР щодо ймовірної мікробіологічної безпеки.

Матеріали і методи

Матеріалами дослідження були побічні продукти перероблення ріпаку, зокрема ріпакова макуха, одержана після холодного віджиму олії з насіння ріпаку сорту «Оділа» селекції Інституту олійних культур м. Опава Чеської Республіки. Обраний сорт ріпаку не містить генетично модифікованих організмів і має мінімальний вміст глюкозинолатів та ерукової кислоти.

Під час виготовлення ХПР було використано електрофізичний (обробка гідроелектроімпульсом) і фізичні (сушіння, подрібнення, обробка паром) методи оброблення сировини.

Результати та обговорення

Дослідження здійснювали на кафедрі товарознавства та експертизи продовольчих товарів Донецького національного університету економіки і торгівлі ім. М. Туган-Барановського.

Оброблення ріпакової макухи гідроелектроімпульсом проводили в Інституті імпульсних процесів і технологій НАНУ (Миколаїв), у відділі імпульсних методів очищення

випливіків, руйнування неметалевих матеріалів та оброблення напружених металоконструкцій.

Сушіння ріпакової макухи й обробку плодами *Juniperus communis* проводили на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, кафедри товарознавства і експертизи продовольчих товарів Донецького національного університету економіки і торгівлі ім. М. Туган-Барановського та у відділі нестационарного тепломасопереносу в процесах сушіння Інституту технічної теплофізики НАНУ (Київ).

На рисунку наведено схему одержання «Харчового продукту для спеціального дієтичного харчування "Ріпаковий"».

На першому етапі технологічного процесу одержання ХПР відбувається приймання макухи з насіння ріпаку після холодного віджиму з нього олії.

Оброблення макухи гідроелектроімпульсом здійснюється в місткості з водою розрядом високого струму протягом 5–10 с, при цьому напруга генератора становить 20–25 кВ, ємність конденсатора — 1 мкФ,



Схема послідовності технологічних процесів під час одержання «Харчового продукту для спеціального дієтичного споживання "Ріпаковий"»

а енергія розряду в імпульсі — 0,84 кДж. У результаті утворюється водна суспензія ріпакової макухи у співвідношенні частини макухи до води 1:5. Після цього етапу ріпакова макуха позбавляється гіркового смаку.

Далі у сухожаровій шафі або, як альтернатива, у конвективній сушарці проводять сушіння суспензії ріпакової макухи до залишку вологи 3–9% від загальної маси продукту. Сушіння у сухожаровій шафі відбувається за температури теплоносія 50 °С, а в альтернативній конвективній сушарці — за температури теплоносія 60 °С і макухи 50 °С.

Після сушіння ріпакова макуха у вигляді невеликих пластівців має тверду консистенцію і для надання порошкоподібного стану її піддають подрібненню до дисперсності не більше 0,25 мм у шаровому барабанному млині МШН-1.

Для попереджувального знезаражування ХПР від мікробного забруднення, можливого на етапі подрібнення, нами було додатково введено до схеми одержання кінцевого продукту його обробку парами плодів *Juniperus communis* за оригінальним методом [10]. При цьому порошок оброблюють парами плодів із розрахунку 75–85 г на 1 м³ камери чи приміщення для обробки, за відстані більш ніж 25–35 см від джерела нагрівання плодів упродовж 150–240 хв.

Далі ХПР у вигляді порошку фасують у споживчу тару, що її виготовлено з полівінілхлориду, по 0,10; 0,50; 1,0; 2,0 і 3,0 кг. Споживча тара герметично закупорюється таким чином: знімними кришками без закупорювального матеріалу; герметично шаром термозварювального матеріалу; знімними кришками чи герметично шаром термозварювальної фольги (термозварювальний комбінований матеріал, який її замінює) без знімних кришок.

Потім «Харчовий продукт для спеціального дієтичного харчування “Ріпаковий”» пакують і піддають маркуванню, після чого відправляють на зберігання і реалізацію.

Таким чином, використання «Харчового продукту для спеціального дієтичного харчування “Ріпаковий”» може бути доцільним у харчовій промисловості як для самостійного споживання, так і розроблення функціональних продуктів з метою реабілітації населення, що мешкає в умовах несприятливого довкілля, у харчуванні спортсменів, військових контингентів та осіб, які працюють у шкідливих умовах виробництва.

Виробництво цього продукту сприятиме вирішенню проблеми раціональної утилізації ріпакової макухи і розширенню асортименту харчових продуктів для спеціального дієтичного споживання.

REFERENCES

1. Prokopenko A. A. Rape is perspective. *Sel'sk. vesti*. 2005, N 3, P. 29.
2. Grodzins'kij D., Dembnovec'kij O., Levchuk O. Horizons domestic bioenergetics. *Visn. NAN Ukrainy*. 2008, N 1, P. 22–31. (In Ukrainian).
3. Solonnikova N. V., Ksandopulo S. Ju., Prudnikov S. M. Technological properties of rape seeds of new breeding varieties. *Izv. VUZov. Pishh. technol.* 2005, N 4, P. 13–15. (In Russian).
4. Zhmyh rapsa — Opportunity to resolve the Ukrainian problems concerning dairy and beef cattle, pigs and poultry with protein deficiency! Feeding Instructions. Available at: <http://roychapin.info/?lang=ru&topic=article&id=12> (accessed 28 November 2013). (In Russian).
5. Sauer W., Cichon R., Misir R. Amino acid availability and protein quality of canola and rapeseed meal for pigs and rats. *J. Anim. Sci.* 1982, 54(2), 292–301.
6. Verkerk R., van der Gaag M.S., Dekker M., Jongen W. M. Effects of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Cancer Lett.* 1997, 114(1–2), 193–194.
7. Raksha-Sljusareva O. A., Krul' V. O., Sarkisjan L. G. Prospects for the use of protein-lipid complex processing of rapeseed for products enrichment of the functional purpose. *Obladnannja ta tehnologii harchovih virobnictv.* 2009, N 22, P. 320–324. (In Ukrainian).
8. Raksha-Sljusareva O. A., Sarkisjan L. G., Vas'kevich M. A., Dolgih S. Ja., Sljusarev O. A., Kustov D. Ju., Rusalenko L. V., Ljubach V. O., Linnik K. V., The food additive «Rape». Ukraine. *Patent 33600*, June 25, 2008.
9. Raksha-Sljusareva O. A., Sljusarev O. A., Krul' V. O. The study radiomodification effect of food additive «Rape» in experimental studies on animals. *Tehnogenna bezpeka.* 2009, 116(103), P. 45–49. (In Ukrainian).
10. Raksha-Sljusareva O. A., Kvasnikov A. A., Sljusarev O. A., Mishin V. V., Gricenko L. Z., Kustova O. K., Rusalenko L. V. The way of processing of flower pollen and pollen load. Ukraine. *Patent 21363*, March 15, 2007.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАПСА В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

*Е. А. Ракша-Слюсарева¹
В. А. Круль¹
А. А. Слюсарев²*

¹Донецкий национальный университет
экономики и торговли
им. М. Туган-Барановского, Украина
²Донецкий национальный медицинский
университет им. М. Горького, Украина

E-mail: rakshaslusareva@gmail.com

При получении из семян рапса масла и биодизеля образуются вторичные продукты переработки, которые в настоящее время рационально не используются. Работа посвящена проблемам возможного применения их в пищевой промышленности. При изготовлении пищевого продукта для специального диетического потребления были использованы электрофизический (обработка гидроэлектроимпульсом) и физический (сушка, измельчение, обработка паром) методы обработки сырья. Благодаря внедрению технологии переработки рапсового жмыха получают сырье, пригодное для использования в пищевой промышленности. На основе этого сырья авторами разработан «Пищевой продукт для специального диетического потребления «Ріпаковий»». В его состав входит рапсовый жмых из семян с низким содержанием глюкозинолатов и эруковой кислоты, обработанный гидроэлектроимпульсом, прошедший сушку в сухожаровом шкафу или в конвективной сушилке, измельчение и обеззараживание с использованием разработанной щадящей технологии для сохранения биологически активных веществ. Производство этого продукта будет способствовать решению проблемы рациональной утилизации рапсового жмыха и расширению ассортимента пищевых продуктов для специального диетического потребления.

Ключевые слова: технология переработки рапсового жмыха.

USING OF SECONDARY PRODUCTS OF RAPESEED PROCESSING IN THE FOOD INDUSTRY

*E. A. Raksha-Slusareva¹
V. A. Krul¹
A. A. Slusarev²*

¹Tugan-Baranovsky Donetsk National
University of Economics and Trade, Ukraine
²Gorky Donetsk National Medical University,
Ukraine

E-mail: rakshaslusareva@gmail.com

When oil and biodiesel are extracted from rapeseed, secondary derived products are formed, which are not used effectively at the moment. The article deals with the problems of possible their use in food industry. During food product preparation for special dietary consumption we used electrophysical (processing by hydroelectropulse) and physical (drying, grinding, steam treatment) processing of raw materials. Through the developed technology for rapeseed cake processing, we received raw materials suitable for use in food industry. On the basis of these raw materials, the «Nutrition product for special dietary consumption «Ripakovyi»» was developed. It is a part of rapeseed meal obtained from the seeds with low content of glucosinolates and erucic acid processed by hydroelectropulse dried in the cabinet oven or in the convective dryer, crushed and disinfected based on a developed soft technology for biologically active substances conservation. The production of this product solves the problem of rational utilization of rapeseed meal and diversification of foods for special dietary consumption.

Key words: rapeseed meal processing.

CHRONICLE

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ — ПІОНЕР І ЛІДЕР ІНЖЕНЕРНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ОСВІТИ В УКРАЇНІ

*Т. П. Пирог
О. І. Скроцька
В. О. Красінько*

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Одним із визнаних лідерів у формуванні національної інженерно-технічної еліти України є Національний університет харчових технологій (НУХТ), який у цьому році має нагоду відсвяткувати 130-річний ювілей. Його становлення тісно пов'язане з історією розвитку харчової промисловості нашої країни і бере початок з 1884 року, коли тільки почали закладатися засади інженерно-технічної освіти. Саме тоді при Смілянському рафінадному заводі було створено перший інженерно-технічний навчальний заклад — технічні класи. Вони й стали базою для заснування в Києві інституту цукрової промисловості, який згодом перетворився на потужний вищий навчальний заклад з освітніми, науковими та культурними традиціями, яким нині є НУХТ.

Не буде перебільшенням сказати, що ХХІ століття — це доба біотехнології. Біотехнологічні процеси, що вдало поєднують у собі потенціал живих клітин та останні технічні досягнення людства, значно розширили сферу промислового виробництва. Ферментативний катализ замінив собою деякі реакції в синтезі органічних сполук, завдяки науково обґрунтованим біотехнологіям значно інтенсифікувалося виробництво продуктів харчування та лікарських засобів. Численні технології захисту довкілля, що ґрунтуються на використанні мікроорганізмів і рослин, виготовлення біодеградабельних пластмас та біосумісних матеріалів є класичними прикладами екобіотехнологій.

Вища школа повинна випереджати час. У далекому вже 1971 році, НУХТ, який тоді ще мав назву Київський інститут харчової промисловості, здійснив перший випуск спеціалістів-біотехнологів (на той час вони на-

зивалися технологами мікробіологічних та вітамінних виробництв). Тобто, саме НУХТ був першим і упродовж понад 20 років залишався єдиним вищим навчальним закладом в Україні, який готував фахівців для біотехнологічної галузі (мікробіологічної промисловості). Коліскою біотехнологічної освіти в Україні стала кафедра біотехнології і мікробіології (БТМ) цього вузу.

Вже наприкінці 70-х років ХХ ст., зважаючи на дедалі зростаючий попит, кількість випускників-біотехнологів збільшилась удвічі. Нині ліцензований обсяг підготовки бакалаврів за напрямом «Біотехнологія» сягає 120 осіб тільки денної форми навчання, у тому числі 60 місць — держбюджетних, що є найвищим показником в Україні. Фах біотехнолога без відриву від виробництва опановують студенти заочної форми навчання.

Прагнучи до постійного удосконалення форм і методів навчання, глибокої інтеграції навчального процесу з науковими досягненнями і успіхами у практичній реалізації різних видів біотехнологічної діяльності як в Україні, так і за її межами, підготовку фахівців-біотехнологів у НУХТ здійснюють за дворівневою системою. Після чотирирічного курсу навчання студенти здобувають кваліфікацію бакалавра, а закінчивши п'ятий курс — спеціаліста або магістра.

Тільки в Національному університеті харчових технологій випускник бакалаврату за освітньо-професійним напрямом «Біотехнологія» має можливість обирати між тим, чи одержати йому поглиблену інженерну підготовку в межах однієї зі спеціальностей освітньо-кваліфікаційного рівня (ОКР) «спеціаліст»: «Промислова біотехнологія» чи «Фармацевтична біотехнологія», або ж

опанувати наукові основи біотехнологічних процесів у межах однієї з трьох спеціальностей ОКР «магістр»: «Промислова біотехнологія», «Фармацевтична біотехнологія» й «Екологічна біотехнологія та біоенергетика». Наразі НУХТ є єдиним в Україні вищим навчальним закладом, який здійснює підготовку фахівців за спеціалізацією «Біобезпека харчових продуктів» (у межах спеціальності «Промислова біотехнологія») і готує висококласних мікробіологів для харчової промисловості.

Удосконаленню біотехнологічної підготовки конкурентоспроможних фахівців в Україні сприяє й те, що випускники коледжів та технікумів, які навчалися за спорідненими спеціальностями, продовжують здобувати біотехнологічну освіту на кафедрі БТМ НУХТ за скороченим терміном навчання. Крім того, кафедра надає змогу одержати біотехнологічну освіту як другу вищу, оскільки часто буває так, що отриманої першої вищої освіти замало для успішної діяльності.

Однак недостатньо мати бажання, треба мати можливість. Найголовнішою запорукою якісної освіти є рівень викладання навчальних дисциплін. Підготовку біотехнологів на кафедрі біотехнології і мікробіології НУХТ ведуть досвідчені викладачі, чий науковий та освітянський досягнення оцінено на найвищому рівні. Серед викладачів кафедри: 6 докторів наук, професорів, 18 кандидатів наук, доцентів, у тому числі лауреати Державної премії в галузі науки і техніки (д. б. н. Т. П. Пирог, д. б. н. О. В. Карпов), лауреати Премії Президента України для молодих вчених (к. т. н. Ю. М. Пенчук, к. б. н. С. О. Старовойтова) та лауреати Премії Верховної Ради України найталановитішим молодим ученим в галузі фундаментальних і прикладних досліджень та науково-технічних розробок (к. б. н. О. І. Скроцька, к. б. н. І. В. Лич).

Потужна матеріально-технічна база кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ, яка поповнюється й оновлюється впродовж 40 років існування кафедри, дає змогу в повному обсязі відтворювати на лабораторних заняттях усі етапи мікробіологічного дослідження із залученням сучасних методів індикації та ідентифікації мікроорганізмів різних таксономічних груп, моделювати всі основні етапи біотехнологічного процесу, вивчати методи контролю і керування якістю випуску харчової та фармацевтичної продукції.

У розпорядженні кафедри є дві мікробіологічні й одна технологічна лабораторії, які

оснащено всіма необхідними приладами та обладнанням, що дає змогу на високому рівні проводити заняття з дисциплін «Загальна біотехнологія», «Біологія клітин», «Загальна мікробіологія і вірусологія», «Основи імунології», «Генетика», «Мікробіологічні основи НАССР», «Молекулярна біотехнологія», «Технологія пробіотиків», «Технологія білків терапевтичної дії» та ін.

Дуже важливо, що наші випускники отримують відразу три освіти в одній: біологічну, хімічну та інженерну. Глибоке опанування хімічних дисциплін, таких розділів біологічної науки, як «Біологія клітин», «Основи імунології», «Загальна мікробіологія», «Загальна вірусологія», «Генетика», «Молекулярна біотехнологія», одержання спеціальних інженерних знань і вмій у межах вивчення таких предметів, як «Загальна біотехнологія», «Основи проектування біотехнологічних виробництв», «Процеси і апарати біотехнологічних виробництв», «Нормативне забезпечення галузі», «Обладнання біотехнологічних виробництв», «Технології мікробного синтезу лікарських засобів», «Промислова технологія лікарських засобів», «Технології білків терапевтичної дії», робить підготовку інженерних кадрів у НУХТ ґрунтовною та всебічною. Набуття нашими студентами знань і вмій зі створення нормативно-технічної та інженерно-конструкторської документації, знайомство з основами розроблення та впровадження у промисловість стандартів GMP, GLP, GHP, НАССР робить їх найбільш конкурентоздатними в умовах сучасного ринку праці. Наші випускники, маючи університетський рівень підготовки з біологічних та хімічних дисциплін, є високопрофесійними інженерами, здатними створювати регламенти біотехнологічних і фармацевтичних виробництв, розробляти та впроваджувати інші сучасні нормативно-технічні документи.

Для викладачів — керівників випускними роботами студентів рівень кваліфікації й компетенції є вагомою складовою правильної організації та керівництва виконанням інженерно-конструкторських і науково-дослідних робіт, рівнем яких завжди пишалися наші випускники. Викладачі кафедри БТМ прагнуть іти в ногу з часом і постійно підвищують свою кваліфікацію, відвідуючи семінари та конференції, присвячені сучасним досягненням у галузі біотехнології, промислового мікробіологічного та фармацевтичного виробництва, виїжджаючи на

передові підприємства та в науково-дослідні установи галузі.

Найважливішою умовою успішного розвитку вітчизняної біотехнології є підвищення якості інженерної біотехнологічної освіти, формування нової генерації біотехнологів, що висуває особливі вимоги до практичної підготовки майбутніх фахівців. Кафедрою БТМ НУХТ налагоджено тісну співпрацю з провідними підприємствами мікробіологічної, харчової та фармацевтичної промисловості України. Традиційними базами практики наших студентів є такі промислові гіганти, як фармацевтична корпорація «Артеріум», ФФ «Дарниця», «Фармак», «Борщагівський ХФЗ», корпорація «Оболонь» тощо. Рівень інженерної підготовки та компетентність випускників кафедри високо оцінені багатьма промисловими підприємствами, науково-дослідними установами й державними структурами, де вони працюють.

Про необхідність інтеграції навчальної й науково-дослідної діяльності майбутнього спеціаліста з біотехнології безпосередньо свідчать реалії сьогодення. Професійна діяльність біотехнолога нездійсненна на високому рівні без наукового підходу до будь-якого процесу. У зв'язку із цим для підвищення якості підготовки й оволодіння набором компетенцій дуже важливим є залучення студента інженерно-технічного вузу в дослідницький процес у рамках предметної підготовки й вивчення навчальних дисциплін, що безумовно сприяє творчому саморозвиткові й самоактуалізації особистості студента в професійній діяльності.

З метою всебічного сприяння науковій, винахідницькій та іншій творчій діяльності студентів та магістрантів напряму підготовки «Біотехнологія» на кафедрі БТМ НУХТ створений і вже декілька років успішно функціонує науковий гурток «БІОТЕСН».

У розпорядженні молодих науковців — дві науково-дослідні лабораторії, обладнані всім необхідним для проведення наукових досліджень.

Молоді дослідники активно долучаються до вирішення таких актуальних питань сьогодення, як створення ефективних біопрепаратів для очищення ґрунтів та водних джерел від нафтових забруднень, підбір та випробування ефективних дезінфікувальних засобів для харчових виробництв, дослідження мікробіологічних показників новостворених продуктів харчування, пошук

ефективних продуцентів біологічно-активних речовин, зокрема ензимів, тощо. Результати роботи гуртківців високо оцінено й відзначено преміями та нагородами на наукових конкурсах, міжнародних конференціях і симпозіумах (рисунок).

Тільки за останні роки студенти, магістранти та аспіранти кафедри удостоєні низки найпрестижніших премій та дипломів у галузі біотехнології: дипломів лауреатів конкурсу на кращу наукову роботу на тему «Зробимо Україну енергоощадною» (2011 р.), Грамоти Президії Національної академії наук України за серію робіт «Біотехнологічний спосіб переробки відходів виробництва біодизеля у мікробні поверхнево-активні речовини для біоремедіації доквілля» (2012 р.), дипломів I–III ступенів за перемоги у Всеукраїнських конкурсах студентських наукових робіт з природничих, технічних і гуманітарних наук (2007–2013 рр.), дипломів I–III ступенів за перемоги у II турі Всеукраїнської студентської олімпіади з біотехнології (2008–2013 рр.).

Про високий рівень наукових досліджень, що їх проводять на кафедрі біотехнології і мікробіології, свідчить велика зацікавленість провідних науково-дослідних установ у співробітництві. Кращих студентів-біотехнологів, починаючи з третього курсу, охоче залучають до науково-дослідної роботи такі наукові «титани» України, як: Інститут мікробіології і вірусології НАНУ, Інститут біохімії НАНУ, Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ, Інститут ботаніки НАНУ, Інститут продовольчих ресурсів НААНУ, Інститут епідеміології та інфекційних хвороб НАМНУ, Інститут фармакології та токсикології НАМНУ, Інститут геронтології НАМНУ, Інститут колоїдної хімії та хімії води НАНУ та ін. Різноманітність наукової тематики виконуваних студентами досліджень свідчить про високий рівень їх підготовки.

Наукова робота, започаткована у студентські роки, дає добрі плоди. Багато хто з випускників кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ стали видатними фахівцями в різних галузях сучасної науки й зробили успішну кар'єру в інститутах НАН України, провідних промислових підприємствах та профільних організаціях. За роки свого існування кафедра підготувала понад 60 кандидатів та 6 докторів наук. Відмітною рисою випускників кафедри є те, що це високо ґрунтовані, фундаментально підготовлені, мотивовані до професійної діяльності фахівці.



Останні нагороди студентів кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ

Кафедра біотехнології і мікробіології НУХТ є лідером у сфері підготовки підручників у галузі біотехнології. Так, тільки за останні роки було видано такі підручники та навчальні посібники з грифом МОН України: «Мікробіологія харчових виробництв» (Т. П. Пирог, Л. Р. Решетняк, В. М. Поводзинський, Н. М. Грегірчак, 2007 р.), «Загальна біотехнологія» (Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова, 2009 р.), «Мікробіологія харчових виробництв. Лабораторний практикум» (Н. М. Грегірчак, 2009 р.), «Клітинна та генна інженерія» (О. В. Карпов, С. В. Демидов, С. С. Кир'яченко, 2010 р.), «Методи молекулярної біотехнології. Лабораторний практикум» (О. І. Мартиненко, 2010 р.), «Загальна мікробіологія» (Т. П. Пирог, 2010 р.), «Технології мікробного синтезу лікарських засобів» (Л. М. Буценко, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог, 2010 р.), «Технологія пробіотиків» (С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог, 2012 р.). Одержали гриф МОН та подані до друку навчальні посібники: «Біологія клітин» (В. О. Красінько, І. М. Волоши-

на, І. В. Лич, С. В. Ігнатенко) та «Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології» (Н. М. Грегірчак, М. М. Антонюк, Л. М. Буценко).

Постійний аналіз новітніх тенденцій фундаментальної біотехнологічної науки та своєчасне корегування освітніх стандартів і навчальних програм з урахуванням вимог часу є невід'ємним елементом сучасної системи підготовки біотехнологів для роботи у сферах науки і виробництва. Саме тому співробітники кафедри БТМ НУХТ беруть активну участь у створенні нормативних документів, стандартів вищої освіти, розробляючи сучасні засади біотехнологічної освіти в Україні. Упродовж останніх років кафедра представлена у складі комісії з біотехнології Науково-методичної ради Міністерства освіти і науки України (голова — проф. Т. П. Пирог, члени комісії — доц. Н. М. Грегірчак, доц. Ю. М. Пенчук).

Перед Україною нині стоять глобальні завдання, пов'язані з інтенсивною інтеграцією країни у світовий економічний простір, формуванням сприятливого інвестиційного клімату, підвищенням конкурентоспроможності вітчизняної промисловості. Реалізувати ці завдання мають конкретні люди, передусім фахівці з дипломами інженерів. І наш ювіляр, Національний університет харчових технологій, сьогодні досягає найдинамічніших результатів, готуючи достойну зміну інженерних кадрів нашої країни. Цьому сприяє активна освітянська та наукова діяльність, складовими яких є тісна і плідна співпраця з промисловими підприємствами та науковими установами НАН України. Колектив кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій не зупиняється на досягнутому, а впевнено нарощує свій потенціал та робить усе можливе для підготовки молодих талановитих інженерів і науковців у галузі біотехнології.

BOOK REVIEWS

РЕЦЕНЗИЯ НА МОНОГРАФИЮ «БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ АЗОТА»

колективу авторів: Коць С. Я., Моргун В. В., Патика В. П., Даценко В. К.,
Кругова О. Д., Кириченко О. В., Мельникова Н. М., Михалків Л. М.,
Маліченко С. М., Маменко П. М., Кірізій Д. А., Береговенко С. К.,
Тихонович І. А., Проворов М. О., Петриченко В. Ф., Надкернична О. В.



Монографія «Биологическая фиксация азота» у чотирьох томах є результатом співпраці колективу авторів, які працюють у галузі симбіотичної й асоціативної азотфіксації упродовж багатьох десятиліть. Одні з них стояли біля витоків розвитку цього напрямку досліджень у колишньому СРСР і в незалежній Україні, другі — активно працюють і сьогодні. Це спеціалісти в галузі мікробіології, фізіології рослин, біофізики, біохімії, генетики, агрохімії, біотехнології, екології. У монографії наведено як історичні факти, що стосуються розвитку цього напрямку в XIX–XX ст., так і узагальнено новітні досягнення в дослідженні питань біологічного перетворення молекулярного азоту фітобактеріальними симбіозами й асоціаціями у першому 10-літті XXI ст.

Азот є одним із основних біогенних елементів планети Земля, головним компонентом живої матерії. Біологічна продуктивність біосфери суттєво залежить від джерел зв'язаного азоту, який постачають мікроорганізми, що здатні асимілювати атмосферний азот; органічні (рештки живої матерії) та мінеральні добрива. Останнє з них — високоенерговитратне й екологічно небезпечне, хоча достатньо ефективно для досягнення швидких результатів в одержанні високих врожаїв сільськогосподарських культур, однак украй негативне як антропогенний фактор забруднення навколишнього середовища і продуктів споживання людей, а також як мутаген і канцероген у вигляді нітрозосполук.

Актуальність виходу монографії «Биологическая фиксация азота» пов'язана з вирішенням нагальних питань сьогодення — відновлення й збереження родючості ґрунтів, яка втрачається внаслідок надмірного використання хімічних засобів захисту і живлення рослин, а також отримання екологічно чистої продукції, що є безпечною для здоров'я людей. Це зумовлює потребу в розробленні нових біотехнологічних підходів у сучасному агровиробництві, прикладом чого можуть бути мікробні біотехнології, які застосовують у рослинництві. На сьогодні дедалі більше дослідників різних галузей біології залучаються до розв'язання завдань біологічного перетворення молекулярного азоту, що здійснюється діазотрофними мікроорганізмами у симбіозах й асоціаціях з рослинами в природних екосистемах і агрофітоценозах, створених людиною. Комплексне застосування нових методів молекулярної біології, біотехнології та генетичної інженерії поряд із класичними методами мікробіології, фізіології рослин, агрохімії дають змогу вирішувати фундаментальні питання, що стосуються виявлення закономірностей та особливостей формування і функціонування фітобактеріальних систем різної ефективності, а також розкривають практичні шляхи корекції симбіотичних взаємовідносин із метою створення високоефективних симбіозів, спрямованих на підвищення існуючого на сьогодні рівня біологічного перетворення азоту атмосфери на органічні азотовмісні сполуки.

Перший том — «Бобово-ризобіальний симбіоз» — складається із шести розділів і містить інформацію про історію відкриття явища азотфіксації; кругообіг азоту в природі та його форми, що є доступними для рослин; процес біологічної азотфіксації та живі організми, які здатні його здійснювати. Детально описано біологічні особливості бульбочкових бактерій як основних постачальників зв'язаного азоту (в симбіозі з різними видами бобових рослин вони здатні накопичувати в орному шарі ґрунту від 40 до 500 кг азоту на 1 га): систематика бактерій, морфолого-культуральні та симбіотичні властивості (специфічність до рослини-хазяїна, конкурентоспроможність, вірулентність, азотфіксувальна активність), що визначають ефективність симбіотичних систем. Подано характеристику ензимів, які беруть участь у процесі перетворення й підтримання біогеохімічного циклу азоту — нітрогенази і нітратредуктази, розглянуто особливості синтезу нітрогенази й процесу фіксації азоту бульбочковими бактеріями в умовах *ex planta*. Наведено основні етапи розвитку кореневих бульбочок у бобових рослин. Значну увагу приділено молекулярним факторам, що відповідають за встановлення симбіотичних взаємозв'язків на етапі доконтактної взаємодії симбіонтів (хемотаксис бактерій до речовин корневих екзометаболітів, вплив ексудатів пророслого насіння і коренів на фізіологічні параметри росту, розвитку й функціонування бактерій) і ранніх етапах симбіозу (флавоноїдів, лектинів, полісахаридів, гормонів тощо). Охарактеризовано молекулярні компоненти азотфіксувальних бактерій (екзополісахариди, ліпополісахариди, глюкани) і розкрито їхню роль у формуванні й функціонуванні фітобактеріальних симбіозів. Досить цікавими є результати досліджень фізіологічного стану рослин, що перебувають у симбіозі з бактеріями, зокрема окисно-відновних ензимів — пероксидази і каталази, які задіяні в ендогенній регуляції активних форм кисню як відповідь рослини на дію зовнішніх чинників, зокрема бактеризацію насіння. Особливу увагу приділено ролі генотипів макро- і мікросимбіонтів під час утворення бобово-ризобіальних систем, питанням селекції вискоелективних штамів бульбочкових бактерій, що їх використовують в агробіотехнології як мікробні добрива для інокуляції насіння бобових культур і впливу окремих екологічних факторів на розвиток і продуктивність симбіозів.

Другий том — «Бобово-ризобіальний симбіоз» — складається із семи розділів і містить інформацію щодо рослинних лектинів та їхньої ролі у процесах формування й функціонування бобово-ризобіальних систем. Наведено загальну характеристику і структурно-біологічні особливості фітолектинів, сучасні уявлення про можливі функції лектинів у рослинних організмах, застосування цих протеїнів у біотехнології та клінічній діагностиці. Розглянуто роль різних класів фітогормонів та особливості формування і функціонування симбіотичних азотфіксувальних систем під впливом регуляторів росту рослин гормоноподібної дії, що також може бути використано для розроблення біотехнологічних прийомів у рослинництві. Окремий розділ присвячено протеомному аналізу — інструментальному методу, який дає змогу виявити й охарактеризувати протеїни, що експресуються в коренях рослин у відповідь на інокуляцію мікроорганізмами. Розкрито значення мікробних угруповань ґрунту в процесі формування бобово-ризобіального симбіозу. Висвітлено фундаментальне питання взаємозв'язку двох планетарно-глобальних процесів — фотосинтезу й азотфіксації як основних складових продукційного процесу бобових рослин. Приділено також увагу питанням ефективності функціонування симбіотичних систем залежно від генотипів макро- і мікросимбіонтів, їхньої комплементарності та умов вирощування рослин. Описано препарати бульбочкових бактерій як перспективні біотехнологічні агенти, а також розглянуто ефективність їх застосування в агровиробництві.

У третьому томі — «Генетика азотфіксації, генетическая инженерия штаммов», — який складається із чотирьох розділів, узагальнено новітні досягнення в дослідженні генетики азотфіксації. Наведено характеристику генетичних методів, які застосовують для одержання нових штамів азотфіксувальних мікроорганізмів, — трансформації, трансдукції, кон'югації, злиття сферопластів, транспозонового мутагенезу, а також викладено експериментальні результати з отримання штамів бульбочкових бактерій генно-інженерними методами, зокрема методом кон'югації та транспозонового мутагенезу, і дослідження їхньої ефективності у симбіозі з бобовими рослинами. Розкрито особливості геному ризобій, одержаних методом транспозонового мутагенезу. Докладно розглянуто молекулярно-генетичні основи взаємодії азотфіксувальних мікроорганізмів з рослинами, зокрема бобово-ризобіальний симбіоз, симбіози рослин із ціанобактеріями, мікоризні симбіози, які є одним з основних джерел іммобілізації

важкодоступних для рослин сполук фосфору. Охарактеризовано генотипні внески рослин і мікроорганізмів у ефективність симбіозів, а також еколого-генетичні підходи до конструювання рослинно-мікробних систем.

У четвертому томі — «Асоціативная азотфіксація», — який містить шість розділів, узагальнено результати досліджень асоціативної азотфіксації. Проаналізовано питання щодо специфіки формування й функціонування симбіозів небобових рослин і азотфіксувальних мікроорганізмів, подано характеристику біологічних особливостей широкого кола діазотрофів. Детально описано утворення спонтанних бульбочок у небобових рослин, зокрема симбіоз квіткових рослин з актиноміцетами роду *Frankia* та папороті роду *Azolla* із ціанобактеріями *Anabaena azolla*. Розглянуто перспективи створення штучних симбіозів (паранодуляція) на рослинах шовковиці та моркви, а також окреслено практичні шляхи підвищення активності азотфіксації у цих системах, що відкриває можливість застосування результатів даних досліджень у розробленні біотехнологічних способів вирощування певних сільськогосподарських культур. Подано результати досліджень генетичної детермінації асоціативної азотфіксації, що свідчать про необхідність одночасного поліпшення генотипів макро- і мікросимбіонтів із наступним їх об'єднанням в оптимальних комбінаціях для створення ефективних асоціативних азотфіксувальних систем. Особливу увагу приділено ризосферним бактеріям *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, які виявляють комплексну позитивну дію на рослини і ґрунт. Проаналізовано новітні дані з дослідження азотфіксувальних, фосформобілізуєчих бактерій, мікроорганізмів, які продукують біологічно активні й антибіотичні сполуки, здійснюють біоремедіацію ґрунтів. Висвітлено практичні аспекти застосування зазначених бактерій у агробіотехнології для інокуляції насіння сільськогосподарських культур. Всебічно розкрито роль біологічної азотфіксації в сучасному агропромисловому виробництві, охарактеризовано мікробіологічні препарати, створені українськими науковцями, а також деякі біотехнологічні прийоми виробництва цих препаратів. Показано вплив інтродукованих азотфіксувальних мікроорганізмів на ризосферну мікрофлору рослин. Окремий розділ присвячено методам дослідження ґрунтових мікроорганізмів: обліку чисельності діазотрофів у кореневій зоні рослин, скринінгу активних штамів із ґрунту і ризосферної зони, оцінці перспективності подальшого застосування бактерій як основи або компонентів мікробних інокулюмів. Детально розглянуто ізотопний і ацетиленовий (базовий у дослідженнях з азотфіксації) методи визначення нітрогеназної активності в ґрунті, на коренях рослин, у системі «рослина — мікроорганізми» *in situ*, а також на прикладі азотфіксувальних бактерій роду *Azospirillum* — імунохімічні методи, використовувані для ідентифікації діазотрофних мікроорганізмів.

Чотиритомне видання «Биологическая фиксация азота» є актуальним, доцільним і своєчасним. Монографія буде корисною для спеціалістів у галузі фізіології рослин, сільськогосподарської мікробіології, рослинництва, агробіотехнології, агрохімії, екології, генетики, а також для викладачів, аспірантів, студентів вищих і середніх навчальних закладів профільних напрямів.

Завідувач кафедри мікробіології та сучасної біотехнології
Відкритого міжнародного університету розвитку людини «Україна»,
доктор біологічних наук, професор
А. Ф. Антипчук

ДО УВАГИ

біохіміків, молекулярних біологів, біофізиків, фізіологів, генетиків, фахівців у галузі біотехнології, біоорганічної хімії, мікробіології, імунології, клітинної біології, ендокринології, екології, лабораторної діагностики — всіх, хто цікавиться біохімічними основами і механізмами життєдіяльності організмів.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ

Національна академія наук України (НАНУ), Українське біохімічне товариство (УБТ), Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ, Київський національний університет імені Тараса Шевченка повідомляють, що **06–10 жовтня 2014 р. в м. Києві** на базі Київського національного університету імені Тараса Шевченка за підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України, Міністерства охорони здоров'я України, Національної академії медичних наук України та Федерації європейських біохімічних товариств (FEBS) відбудеться **черговий XI Український біохімічний конгрес**.

XI Український біохімічний конгрес — це визначна подія не тільки для біохіміків і молекулярних біологів, але й для фахівців суміжних спеціальностей, для тих, хто використовує біохімічні методи та моделі у своїй науковій роботі і хто цікавиться найновішими досягненнями світової біохімічної науки, що наразі переживає небувалий прогрес, який можна порівняти хіба що з розвитком інформаційних технологій. Окрім того, це — підведення підсумків і відзначення досягнень вітчизняних науковців у цій галузі за останні чотири роки, а також визначення перспектив її розвитку в Україні.

Тематика конгресу включатиме фундаментальні питання сучасної біохімії та молекулярної біології, біотехнології, імунохімії, медичної та харчової біохімії, біохімії сільськогосподарських тварин і рослин, екологічних аспектів біохімії, викладання сучасної біохімії та історії її розвитку тощо.

Основні секції роботи конгресу:

- 1 — Структура, властивості та функції біологічних макромолекул і надмолекулярних комплексів.
- 2 — Регуляція метаболічних процесів та клітинних функцій.
- 3 — Медична біохімія.
- 4 — Біотехнологія. Біобезпека і біозахист.
- 5 — Біохімія сільськогосподарських тварин і рослин та харчова біохімія.
- 6 — Викладання біохімії та суміжних дисциплін і шляхи вдосконалення фахової підготовки молодих учених. Історія біохімічної науки.

Важливі дати:

30 травня 2014 р. — останній термін реєстрації для участі у конгресі з пільговим реєстраційним внеском (розміри реєстраційних внесків наведено на сайті конгресу) та останній строк подання рефератів усних і стендових доповідей для публікації у спеціальному випуску *Ukrainian Biochemical Journal* (*Український біохімічний журнал*). Для публікації достатньо реєстрації одного з авторів, але для участі у роботі конгресу кожен учасник має бути зареєстрований окремо.

! Реєстрація учасників проводитиметься до початку конгресу, але після 30 травня вже не за пільговим, а за повним тарифом.

- 06 жовтня (понеділок) 2014 р. — день заїзду учасників і відкриття XI Українського біохімічного конгресу, яке включатиме урочисту церемонію, пленарні лекції, концерт та прийом;
- 07 жовтня — засідання Українського біохімічного товариства під час роботи конгресу;
- 10 жовтня 2014 р. — останній день роботи конгресу і його закриття.

Детальнішу інформацію можна знайти на веб-сайті конгресу: <http://www.bioinfo.org.ua>, який також розміщено і на сайті Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України: <http://www.biochemistry.org.ua>.

Запрошуємо широкі кола біохімічної спільноти України, усіх, хто цікавиться «хімією життя», до участі в роботі XI Українського біохімічного конгресу!

ПЕРЕДПЛАТА — 2014

З питань організації передплати в Україні, оформлення замовлень та обробки передплатної документації звертайтеся, будь ласка, до

1. «Каталогу видань України»:

Підписний індекс 37796.

2. Передплатного агентства «Укрінформнаука»:

тел. / факс +38 (044) 239-64-57, моб. +38 (050) 154-77-83.

Електронна пошта: innovation@nas.gov.ua.

Поштова адреса: вул. Володимирська, 54, кімн. 144, м. Київ-30, 01601.

З питань організації підписки в Росії звертайтеся, будь ласка, до компанії «Інформнаука»:

тел.: 8 (495) 787 38 73, факс: 8 (499) 152 54 81.

Електронна-пошта: perova@viniti.ru

Поштова адреса: ТОВ «Інформнаука», вул. Усієвича, 20, м. Москва, 125190, Росія.



Ви можете оформити передплату або придбати свіжі номери журналу «Biotechnologia Acta» в електронній бібліотеці PressPoint: www.presspoint.ua