

УДК 57.018.34:619:615:612.176

Д. Голишкін, асп., В. Рибальченко, д-р біол. наук,
А. Бичко, канд. біол. наук, Т. Берегова, д-р біол. наук, Т. Фалалєєва, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА ЕЛЕКТРИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОДЕЛЬНИХ БІЛІПІДНИХ МЕМБРАН (IN VITRO)

Дослідити дозозалежний вплив меланіну на провідність та електричну ємність модельних біліпідних мембран (in vitro). Дозозалежний ефект визначали за методом аналізу нестандартних циклічних вольт-амперних характеристик бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ). Електричні параметри БЛМ, а саме провідність та електричну ємність визначали за зміною потенціалу на мембрані. Вперше встановлено безпосередній вплив меланіну на електричні характеристики ліпідного матриксу клітинних мембран. Показано дозозалежний мембранотропний вплив меланіну, що реалізується шляхом підвищення електричної провідності та зменшення ємності ліпідного бішару. Це свідчить про зменшення товщини ізоляційної зони мембрани за умов дії меланіну. Меланін проявляє мембранотропну активність, що реалізується шляхом підвищення провідності та зменшення електричної ємності ліпідного бішару. Найбільш виражений вплив меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран здійснюється при концентрації 10^{-6} М.

Ключові слова: меланін, бімолекулярна ліпідна мембрана, електропровідність, електрична ємність.

Вступ. Пігментація живих організмів є яскравим прикладом адаптивної еволюції живого на землі. Це підтверджується наявністю біологічних пігментів меланінів у представників майже всіх найбільших таксонів [1]. За хімічною структурою меланіни є полімерами хіноїдних сполук, мономерами яких виступають індольні та фенольні угруповання. Унікальні властивості меланінів пов'язані з наявністю в їх структурі неспарених електронів у вигляді стабільних радикальних форм хінона [2]. Наявність неспарених електронів у структурі дозволяє реалізовувати меланінам широкий спектр протекторно-регуляторних функцій таких як антиоксидантну [3], фотопротекторну та антирадикальну, блокуючи цитотоксичні короткоживучі вільні радикали [4], нейропротекторну, підвищуючи регенеративну здатність нервових волокон при ураженні центральної нервової системи за рахунок відновлення кровопостачання уражених тканин [5]. Завдяки властивостям напівпровідника меланін бере участь у біоелектричних процесах в головному мозку [6] та виконує важливу фізіологічну функцію протектора проти дії пероксинітриду, який вважають медіатором нейротоксичних процесів [7]. Так, наприклад, представлені численні літературні дані щодо антиоксидантної активності меланіну до таких окислювачів як перекис водню, гіпохлорид, перманганат калію, а також токсичних кисневих радикалів [8, 9]. У роботах Джекобсон і співавт. [9] наводяться дані про захисний вплив меланіну з *Wanginella dermatidis* і *Alternaria alternata* від дії перманганату калію і гіпохлориду. Однак стійкістю до перекису водню володіють тільки меланін з *Alternaria alternata*. Подібні результати були отримані і при вивченні грибів *Cryptococcus neoformans* [10]. Показано, що меланін цього гриба має антиоксидантну активність, відносно супероксиданіонів, яку можна порівняти з активністю супероксиддисмутази. Слід зазначити, що фермент ефективно функціонує при температурах нижче 37°C, тоді як меланін активний при вищих температурах. Аналогічні дані отримані і при вивченні дії кисневих радикалів на меланізований патогенний гриб *Pyricularia oryzae*: непігментовані мутанти не володіли патогенними властивостями і виявилися набагато чутливішими до дії оксидантів [11]. Меланінізовані штами мікроорганізмів виявилися стійкіші до більш високих концентрацій ультрафіолетового опромінення. Так, наприклад, виживання штамів меланінізованих грибів було зафіксовано за жорстких кліматичних умов Антарктики та радіаційно забрудненого ядерного реактору [12, 13]. Оскільки окисний стрес розвивається не лише за умов дії радіації, але й при стресах іншого генезу, меланін, як пастка для радикалів, одночасно виступає як антистресовий середник.

Так, було досліджено адаптогенний вплив фітомеланіну при дії іонізуючого опромінення та стресу. Авторами було показано, що під впливом комбінованої дії опромінення та стресу спостерігалось підвищення вмісту адреналіну в крові щурів та одночасно знижувався рівень тироксину. У тварин, що вживали фітомеланін, вміст гормонів у крові залишався на рівні контролю [14].

Таким чином, меланін є ефективним кумулятором "шкідливих" неспарених електронів здатний впливати на хід метаболічних реакцій на різних рівнях організації живого організму, у тому числі мембранному. Однак, питання про безпосередній вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу клітинних мембран, як базисного елемента у ланцюзі трансдукції хімічного сигналу залишається досі не розкритим, що ускладнює інтерпретацію молекулярних механізмів реалізації його біологічної активності. Тому метою даного дослідження є дослідити дозозалежний вплив меланіну на провідність та електричну ємність модельних ліпідних мембран (in vitro).

Матеріали і методи. Визначення впливу меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран виконувалося за аналізом нестандартних циклічних вольт-амперних характеристик (ЦВАХ) бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ). Мембрани формували за стандартною методикою Мюллера з використанням азолектину (23 мг/мл) в п-декані ("Біофарм", Україна) в оточенні водного розчину електроліту (100 мМ KCl, х.д.ч.) [15]. Електричні параметри БЛМ (електрична провідність G , нСм/см², електрична ємність C , мкФ/см²) визначали за зміною потенціалу на мембрані (± 100 мВ, частота розгортки 0,01 Гц). Реєстрація ЦВАХ БЛМ проводилась через 10 хвилин після внесення меланіну у навколо мембранний розчин. Досліджуваний діапазон ефеквної концентрації меланіну становив 10^{-9} - 10^{-6} М.

Результати та обговорення. Формування модельної системи БЛМ дозволило встановити вплив меланіну на структуру ліпідного матриксу за змінами основних електричних характеристик, таких як електрична провідність (G , нСм/см²) та електрична ємність (C , мкФ/см²) мембран.

Зареєстровані ЦВАХ не модифікованих меланіном БЛМ складали G_0 $127,81 \pm 29,88$ нСм/см² та C_0 $0,58 \pm 0,11$ мкФ/см² відповідно. Послідовне збільшення концентрації меланіну в розчині електроліту з цис-боку ліпідної мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9} - 10^{-6} М відзначалося експоненційним ростом питомої провідності ліпідної мембрани (максимально на $21,2 \pm 6,8\%$ при концентрації 10^{-6} М). При концентрації меланіну 10^{-5} М процес збільшення провідності припинявся і навіть відзначалося незначне зменшення її величини (Рис. 1).

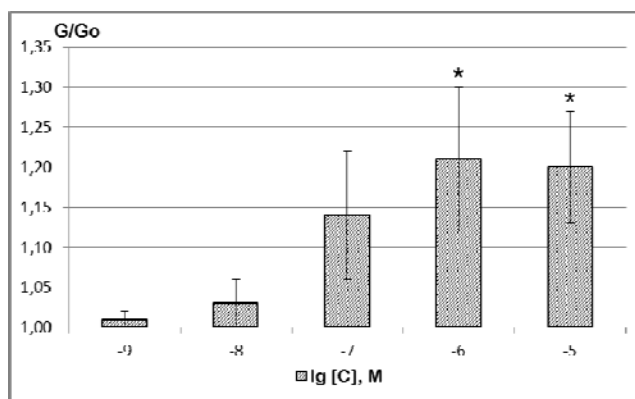


Рис. 1. Електрична провідність БЛМ за умов дії меланіну (G, нСм/см²)

*- $p < 0,05$ у порівнянні з концентрацією меланіну 10^{-9} М.

Електрична ємність мембрани в діапазоні концентрацій меланіну 10^{-9} - 10^{-6} М зменшувалася (максимально на $8,4 \pm 1,7\%$ при концентрації 10^{-6} М). При подальшому

збільшенні концентрації меланіну (10^{-5} М) величина електричної ємності стабілізувалася і навіть мала тенденцію до зростання (Рис.2).

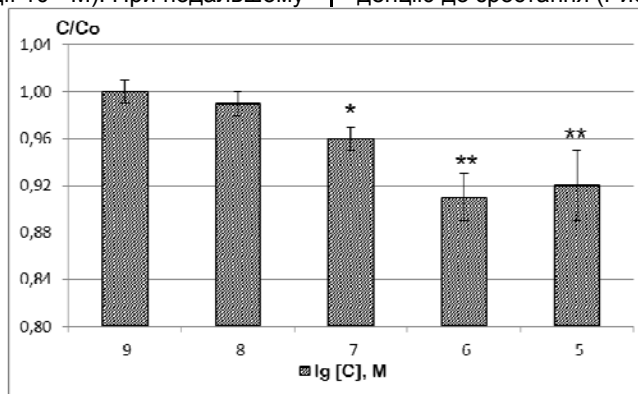


Рис. 2. Електрична ємність БЛМ за умов дії меланіну (C, мкФ/см²)

*, **- $p < 0,05$, $p < 0,01$ у порівнянні з концентрацією меланіну 10^{-9} М.

Отримані результати дозволяють припустити, що молекули меланіну при контакті з ліпідної мембраною проникають через центральну гідрофобну зону залишків жирних кислот фосфоліпідів, що призводять до збільшення питомої провідності ліпідного бішару та зменшенню товщини його ізоляційної зони, про що свідчить зменшення ємності мембрани. Процес прямо залежить від концентрації мембранотропного агента (меланіну). Однак, при концентраціях меланіну 10^{-5} М його дезорганізуючий вплив на ліпідний бішар поступово нівелюється, що можна пов'язати з можливістю самопригнічення (накопиченням на поверхні або в об'ємі мембрани достатньої кількості меланіну для формування додаткового структурного або електростатичного бар'єру). Отримані дані співпадають з дослідженнями проведеними на меланіні грибів-патогенів рослин, що виступає у якості структурної одиниці клітинної стінки *Colletotrichum kahawae*, патогенів кавового насіння [16]. В даному випадку меланін забезпечує тургорний тиск апресорій гриба, що відповідають за утворення перфорацій у клітинах насіння.

Отже, в результаті проведеної роботи можна зробити припущення про те, що меланін виступає базисним елементом трансдукції хімічного сигналу та чинить безпосередній вплив на структуру ліпідного матриксу клітинних мембран. Результатом даної взаємодії є збільшення питомої провідності ліпідного бішару та зменшення товщини його ізоляційної зони, що може пояснювати транспорт молекул меланіну через центральну

гідрофобну зону мембранных фосфоліпідів та реалізацію захисних властивостей пігменту.

Висновки. 1. Меланін проявляє мембранотропну активність, що реалізується шляхом підвищення провідності та зменшення електричної ємності ліпідного бішару. 2. Найбільш виражений вплив меланіну на електричні характеристики біліпідних мембран здійснюється при концентрації 10^{-6} М.

Список використаних джерел

- Plonka P.M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects / Przemyslaw M. Plonka, Maja Grabacka // *Acta Biochimica Polonica* – 2006. – №3. – P. 429-443.
- Eisenman H.C. Synthesis and assembly of fungal melanin / Helene C. Eisenman, Arturo Casadevall // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – P. 931-940.
- Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals / M.M.L. Cunha [et al.] // *BMC Microbiology*. – 2010. – №10 – P. 1-9.
- Dadachova E. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin / Ekaterina Dadachova, Arturo Casadevall // *Current Opinion in Microbiology* – 2008. – №11. – P. 525-531.
- Neuroprotective action of bacterial melanin in rats after corticospinal tract lesions / T.R. Petrosyan [et al.] // *Pathophysiology*. – 2012. – P. 71-80.
- Lacy M.E. Neuromelanin: a hypothetical component of bioelectronic mechanisms in brain function / M.E. Lacy // *Physiol.Chem.Phys.* – 1981. – №4. – P. 319-324.
- Stepien K. Dopamine-melanin protects against tyrosine nitration, tryptophan oxidation and Ca^{2+} -ATPase inactivation induced by peroxynitrite / K. Stepien, A. Zajdel, A. Wilczok // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2000. – №2-3. – P. 189-195.
- Golyshkin D. Influence of melanin on the lesion in the gastric mucosa of rats caused by neuro-muscular tension according to Selye / D. Golyshkin, Ya. Savitsky, T. Falalyeyeva // *Annales universitatis Mariae Curie – Skłodowska*. – 2010. – №2. – P. 251-255.

9. Jacobson E.S. Relationship between superoxide dismutase and melanin in pathogenic fungus / E.S. Jacobson, N.D. Jenkins, J.M. Tood // Infect. Immun. – 1994. – P.4085-4086.

10. Williamson P.R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* / P.R. Williamson // Front Biosci. – 1997. – №10. P. 99-107.

11. Аверьянов А.А. Влияние меланина на цитотоксичность кислородных радикалов / А.А. Аверьянов, В.П. Лапикова, Г.Г. Петелина // Биохимия. – 2009. – №4. – С.1539-1546.

12. Rosa L.H. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica / L.H. Rosa // FEMS Microbiol. Ecol. – 2010. – P.178-189.

13. Zhdanova N.N. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor / N.N. Zhdanova [et al.] // Mycology Research. – 2000. – P.1421-1426.

14. Горчакова Л. А. Адаптогенный вплив фітомеланіну при дії іонізуючого опромінення та стресу / Л.А.Горчакова, Л.П. Дерев'яно, М.Ю. Скачек // Вісник наукових досліджень. – 1999. – № 2. – С. 23-27.

15. Mueller P. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution / P. Mueller [et al.] // Nature. – 1962. – P. 976-983.

16. Chen Z. Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration / Z. Chen // Mycologia. – 2004. P.1199-1208.

Надійшла до редколегії 20.02.14

Д. Голышкин, асп., В. Рыбальченко, д-р биол. наук, А. Бычко, канд. биол. наук, Т. Береговая, д-р биол. наук, Т. Фалалеева, д-р биол. наук КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

ВЛИЯНИЕ МЕЛАНИНА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОДЕЛЬНЫХ БИЛИПИДНЫХ МЕМБРАН (IN VITRO)

Изучить дозозависимое влияние меланина на проводимость и электрическую емкость модельных билипидных мембран (*in vitro*). Дозозависимый эффект определяли методом анализа нестандартных циклических вольт-амперных характеристик бимолекулярных липидных мембран (БЛМ). Электрические параметры БЛМ, а именно электрическую проводимость и электрическую емкость определяли по изменению потенциала на мембране. Впервые установлено непосредственное влияние меланина на структуру липидного матрикса клеточных мембран. Показано дозозависимое мембранотропное влияние меланина, которое реализуется путем повышения проводимости и уменьшения электрической емкости липидного бислоя. Это свидетельствует о уменьшении толщины изоляционной зоны мембраны в условиях воздействия меланина. Меланин проявляет мембранотропную активность, которая реализуется путем повышения проводимости и уменьшения электрической емкости липидного бислоя. Наиболее выраженное влияние меланина на электрические характеристики билипидных мембран реализуется при концентрации 10^{-6} М.

Ключевые слова: меланин, бимолекулярная липидная мембрана, электропроводимость, электрическая емкость.
D. Golyshkin, Phd stud, V. Rybalchenko, DSc, A. Bychko, PhD., T. Beregova, DSc, T. Falalyeyeva, DSc
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

INFLUENCE OF MELANIN ON ELECTRICAL CHARACTERISTICS OF MODEL BILIPID MEMBRANES (IN VITRO)

To examine dose-dependent effects of melanin on conductance and electrical capacity of model bilipid membranes (*in vitro*). Dose-dependent effects were studied on bilayer lipid membranes (BLM) by volt-ampere characteristic method. Both BLM electrical parameters of conductance and electrical capacity were measured by the change in the membrane potential. For the first time direct influence of melanin on cell membrane's bilayer lipid matrix was estimated. It was established dose-dependent membranotropic influence of the melanin that was realized by conductance increasing of BLM and by decreasing of membrane capacity. It testifies decreasing of membrane's insulating zone under melanin's influence. Melanin shows membranotropic activity which is realized by increasing conductivity and decreasing electrical capacitance of the lipid bilayer. The most pronounced melanin's effect on the bilipid membranes electrical characteristics is realized at 10^{-6} M.

Key words: melanin, bimolecular lipid membranes, conductivity, capacity.

УДК 616.4: 577.152

Л. Гарманчук, д-р біол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВИЗНАЧЕННЯ ПОГЛИНАННЯ ГЛЮКОЗИ ПУХЛИННИМИ КЛІТИНАМИ ЗА СТАНДАРТНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ПІД ВПЛИВОМ ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Адаптовано глюкозооксидантний метод визначення глюкози в сироватці крові для оцінки концентрації поглинутої глюкози культивованими пухлинними клітинами. Для цього підраховували живі клітини на різних етапах їх культивування та за різницею концентрації глюкози в середовищі культивування без клітин визначали рівень поглинутої глюкози в розрахунок на одиницю клітин. Метод є економічно доцільним, швидко відтворюваним та високочутливим і може використовуватись в скринінгових тестах *in vitro* щодо впливу різних лікарських препаратів на залучення глюкози в метаболічні шляхи. Показано, що алкілюючий препарат цисплатин та герцептин (гуманізовані моноклональні антитіла проти рецептора епідермального фактора росту II типу) мають протилежний вплив на рівень поглинання глюкози в залежності від терміну інкубації з клітинами та типом клітин.

Ключові слова: сироватка крові, тест-системи, протипухлинні препарати.

Вступ. Альтернативні методи скринінгу на різних типах культивованих клітин передбачають визначення широкого спектру параметрів, які можуть вказувати на механізми дії досліджуваних агентів. На сьогодні розроблено правила стандартизації якості культури клітин і тканин для дослідження ефективності лікарських препаратів та впроваджені Європейським центром валідації альтернативних методів принципи Належної лабораторної практики (GLP) [1-2]. Впровадження даних методів дослідження спонукає до пошуку простих, доступних та економічно-доцільних методів визначення параметрів функціонування клітин за дії різних сполук, включаючи тестування протипухлинної активності потенційних лікарських засобів, у доклінічних дослідженнях яких суттєву нішу займають панелі культивованих

трансформованих клітин [1-4]. Параметри, за якими оцінюється функціональний стан трансформованих клітин стосуються не лише проліферативних/ антипроліферативних показників, експресії/репресії певних генів, а й таких функціонально значимих характеристик – як метаболічні [5-7]. Відомо, що пухлинні клітини отримують енергію шляхом гліколізу і перехід на безкисневу енергетику призводить до автономного та неконтрольного їх росту. Важлива роль метаболітів гліколітичного шляху поповнення енергії за канцерогенезу визначається тим, що до участі регуляції обміну глюкози, залучені шляхи передачі онкогенних та антиапоптичних сигналів, активація ангиогенезу та міграційна здатність пухлинних клітин [5]. Варбургом, ще в 1924 р. було встановлено, що у зрізах пухлинних тканин продукція лакта-