

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем

«До захисту»
Зав. кафедри молекулярної
і медичної біофізики,
д.ф.-м.н, професор кафедри
молекулярної і медичної біофізики
(науковий ступінь, вчене звання)
_____ Берест В. П.
(підпис)
«__» _____ 20 р

ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА

МЕМБРАННІ ЕФЕКТИ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ЛАЗЕРНОГО ТА ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

Науковий керівник

к.б.н., доцент кафедри молекулярної
і медичної біофізики
(науковий ступінь, вчене звання,
посада, місце роботи)

_____ Січевська Л. В.
(підпис)

Виконав студент групи РБ-61,
спеціальність: 105 Прикладна
фізика та наноматеріали

_____ Губський М. А.
(підпис)

Харків – 2024

АНОТАЦІЯ

Губський М. А. Мембранні ефекти комбінованої дії лазерного та іонізуючого випромінювання. Дипломна робота. Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2024. 61 с., 23 рис., 3 табл., 69 джерел.

МОДЕЛЬНІ МЕМБРАНИ, ЦИТОХРОМ С, КАРДІОЛІПІН, ЛАЗЕРНЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ, ІОНІЗУЮЧЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ, КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ, ФОСФАТИДИЛХОЛІН.

Об'єкт дослідження: молекулярні комплекси цитохрому С із модельними ліпідними мембранами.

Предмет дослідження: механізми взаємодії цитохрому С з модельними ліпідними мембранами за умов впливу іонізуючого та лазерного випромінювання.

Мета роботи: вивчення ефектів, зміни кінетичних параметрів взаємодії цитохрому С із модельними ліпідними мембранами за умов комбінованої дії електромагнітного лазерного та іонізуючого випромінювання.

Методи дослідження: спектрофотометрія, He-Ne лазер, ізотопна установка, апроксимація експериментальних кінетичних залежностей.

Результати дослідження: на основі аналізу експериментальних даних, роботи з графіками та апроксимації експериментальних кінетичних залежностей визначено вплив комбінованої дії He-Ne лазерного та іонізуючого випромінювання на кінетичні параметри взаємодії цитохрому С з ліпідними мембранами. Встановлено закономірності зміни амплітуд та констант швидкості кінетичних фаз. Виявлено стабілізуючий ефект кардіоліпіну на мембрани.

Отримані результати можуть використовуватися для подальшого вивчення мембранних ефектів за дії різних видів випромінювання, з'ясування взаємозв'язку кінетичних параметрів при опроміненні та розробки методів радіаційного захисту.

ABSTRACT

Hubskiy M. A. Membrane effects of combined action of laser and ionizing radiation. Diploma work. V. N. Karazin Kharkiv National University, 2024. 61 p., 23 figures, 3 tables, 69 references.

MODEL MEMBRANES, CYTOCHROME C, CARDIOLIPIN, LASER RADIATION, IONIZING RADIATION, KINETIC PARAMETERS, PHOSPHATIDYLCHOLINE.

Object: molecular complexes of cytochrome C with model lipid membranes.

Subject: mechanisms of interaction of cytochrome C with model lipid membranes under the influence of ionizing and laser radiation.

Purpose: to study the effects, changes in the kinetic parameters of cytochrome C interaction with model lipid membranes under the combined action of electromagnetic laser and ionizing radiation.

Methods: spectrophotometry, He-Ne laser, isotope unit, approximation of experimental kinetic dependencies.

Results: based on the experiments, graphs and data approximation, the influence of He-Ne laser and ionizing radiation on the kinetic parameters of cytochrome C interaction with lipid membranes was determined. The regularities of changes in the amplitudes and rate constants of the kinetic phases were established. The stabilizing effect of cardiolipin on the membranes was revealed.

The results obtained can be used for further study of membrane effects under the influence of various types of radiation, elucidation of the relationship between kinetic parameters during irradiation and development of radiation protection methods.

Зміст

| | |
|--|----|
| ВСТУП..... | 6 |
| 1 МОДЕЛЬНІ ЛІПІДНІ МЕМБРАНИ. ЇХ МОЛЕКУЛЯРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ..... | 8 |
| 1.1 Модельні мембрани..... | 8 |
| 1.1.1 Ліпосоми..... | 8 |
| 1.1.2 Пористі мембрани..... | 9 |
| 1.1.3 Мембрани на твердій основі..... | 10 |
| 1.1.4 Мембрани на основі крапель..... | 11 |
| 1.2 Молекулярні характеристики модельних ліпідних мембран..... | 13 |
| 1.2.1 Основні відомості про молекулярні характеристики модельних ліпідних мембран..... | 13 |
| 1.2.2 Динамічна поведінка модельних ліпідних мембран..... | 16 |
| 2 ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТОХРОМУ С І ЙОГО ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ З МОДЕЛЬНИМИ МЕМБРАНАМИ..... | 18 |
| 2.1 Фізико-хімічні характеристики цитохрому С..... | 19 |
| 2.1.1 Конформаційна динаміка та білкові взаємодії..... | 20 |
| 2.1.2 Клітинні функції та регуляторні ролі..... | 20 |
| 2.2 Особливості взаємодії цитохрому С з модельними мембранами..... | 22 |
| 2.2.1 Структурні адаптації та мембрано-індуковані конформаційні зміни..... | 24 |
| 2.2.2 Функціональне значення та біологічна значущість..... | 25 |
| 3 ВПЛИВ НЕ-НЕ-ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА МОДЕЛЬНІ ЛІПІДНІ МЕМБРАНИ ТА ЦИТОХРОМ С..... | 26 |
| 3.1 Вплив лазерного випромінювання на модельні ліпідні мембрани..... | 28 |
| 3.2 Вплив лазерного випромінювання на молекули цитохрому..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 4 ЕФЕКТИ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА РІВНІ ЛІПОСОМАЛЬНИХ МЕМБРАН..... | 35 |
| 4.1 Основні відомості про ефекти іонізуючого випромінювання на ліпосомальні мембрани..... | 35 |
| 4.2 Мембрано-білкові взаємодії та функціональні наслідки впливу іонізуючого випромінювання на ліпосомальні мембрани | 37 |
| 5 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ..... | 38 |
| 5.1 Отримання модельних ліпідних мембран..... | 38 |
| 5.2 Спектрофотометричне визначення параметрів зв'язування цитохрому С з модельними мембранами..... | 38 |
| 5.3 Лазерне опромінення препаратів модельних мембран..... | 39 |
| 5.4 Гамма-опромінення модельних біомембран..... | 40 |
| 5.5 Статистична обробка результатів дослідження | 40 |
| 6 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ..... | 41 |
| 6.1 Впливу лазерного випромінювання на модельні ліпідні мембрани та цитохром С | 41 |
| 6.2 Комбінована дія лазерного та іонізуючого випромінювання на модельні ліпідні мембрани та цитохром С | 47 |
| ВИСНОВКИ..... | 54 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... | 55 |

ВСТУП

Ліпідні мембрани — це тонкі структури, що складаються з жирових молекул і білків, які утворюють бар'єр між середовищами з різним хімічним складом. Вони є основним компонентом клітинних мембран і виконують ряд важливих функцій, слугуючи динамічними платформами для різноманітних біофізичних та біохімічних процесів. Фізико-хімічні властивості ліпідних мембран, включаючи їхню плинність, фазову поведінку та ліпідний склад, відіграють ключову роль у визначенні їхньої взаємодії із зовнішніми подразниками, включаючи різні види випромінювання [1].

Випромінювання He-Ne лазера, що характеризується когерентною і монохроматичною природою, стало універсальним інструментом для дослідження структурних і динамічних властивостей ліпідних мембран [2]. Вивчаючи вплив He-Ne лазерного випромінювання на модельні ліпідні мембрани, можна отримати цінну інформацію про механізми, що лежать в основі зміни оптичної щільності досліджуваного матеріалу, а також уведених кінетичних параметрів.

Крім того, вплив іонізуючого випромінювання на ліпосомальні мембрани є важливим напрямком досліджень у радіаційній біології. Іонізуюче випромінювання, що охоплює спектр енергетичних частинок і електромагнітних хвиль, викликає каскад біохімічних і біофізичних змін у ліпідних мембранах, що в кінцевому підсумку впливає на клітинний гомеостаз і функції [3]. Розуміння складних ефектів іонізуючого випромінювання на рівні ліпосомальних мембран має важливе значення для розшифрування механізмів радіаційно-індукованого пошкодження клітин і вивчення потенційних стратегій пом'якшення його згубних наслідків, що напряду впливає на життя людини.

Взаємодія цитохрому C, ключового переносника електронів у дихальному ланцюзі мітохондрій, з модельними мембранами та кардіоліпіном

додає ще один рівень складності до цієї багатогранної взаємодії. Фізико-хімічні характеристики цитохрому С та особливості його взаємодії з модельними мембранами дають важливе уявлення про молекулярні механізми, що лежать в основі клітинного енергетичного метаболізму та сигнальних шляхів [4].

Складна взаємодія між ліпідними мембранами і різними формами їх опромінення є предметом глибокого інтересу як у біофізиці, так і в радіаційній біології. Розуміння молекулярних характеристик модельних ліпідних мембран та їхньої реакції на різні види випромінювання має вирішальне значення для розгадки основних механізмів пошкодження, загибелі та виживання клітин. У цій роботі представлені основні відомості про модельні ліпідні мембрани, цитохром С, його взаємодію з модельними мембранами, теоретичні засади дії He-Ne лазера та іонізуючого радіаційного опромінення на модельні ліпідні мембрани, а також експериментальні дані та їх опрацювання щодо першого виду впливу.

1 МОДЕЛЬНІ ЛІПІДНІ МЕМБРАНИ. ЇХ МОЛЕКУЛЯРНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1.1 Модельні мембрани

Ліпідні мембрани є важливими структурними компонентами клітин, які забезпечують їм цілісність та функціонування. У біофізиці, для розуміння основних принципів, які керують поведінкою мембрани, використовують модельні системи - спрощені системи, що дозволяють досліджувати фізико-хімічні властивості мембран в контрольованих умовах, що є їх основною перевагою.

Для створення модельних мембран використовують кілька поширених методів, кожен з яких призводить до унікальних структурних властивостей.

1.1.1 Ліпосоми

Однією з найпоширеніших модельних систем є ліпосоми (рис. 1.1), що представляють собою кулькоподібні структури, утворені з фосфоліпідів, які утворюють два шари фосфоліпідів, зводячись разом хвостами в серединній частині, а зворотніми частинами спрямованими назовні. Ця асиметрична організація фосфоліпідних молекул відіграє ключову роль у функціонуванні мембрани [5].

Ліпосоми можуть бути сформовані за допомогою різних методів, таких як тонкоплівкова гідратація, зворотньофазове випаровування або екструзія. Ці методи дозволяють контролювати створення ліпосом з певними розмірами, складом і властивостями, пристосованими до різних дослідницьких потреб.

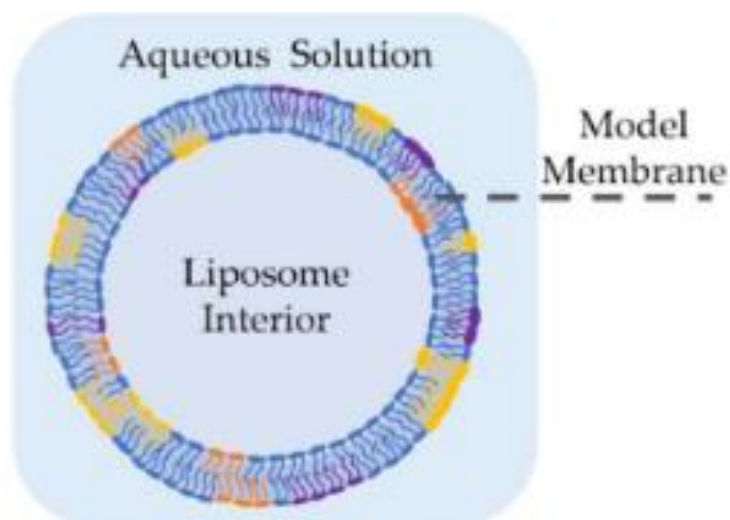


Рисунок 1.1 – Поперечний переріз ліпосоми, або ліпідної везикули [5]

Ліпосоми широко використовуються в системах доставки ліків, розробці вакцин, генній терапії та як модельні системи для вивчення біофізики мембран, ліпідно-білкових взаємодій та проникності мембран [5].

1.1.2 Пористі мембрани

Пористі мембрани - це планарні ліпідні бішари, що утворюються на межі розділу гідрофобного сепаратора між двома водними розчинами. Ці мембрани мають високу механічну стабільність, електричний опір і широко використовуються в електрофізіологічних дослідженнях для вивчення іонних каналів, транспортерів і мембранних білків.

Пористі мембрани зазвичай створюють за допомогою методу Монталь-Мюллера, коли ліпідні моношари розподіляють на межі розділу фаз вода-повітря, а потім переносять на пористу підкладку для формування бішару (рис. 1.2). Цей метод дозволяє точно контролювати властивості та функціональність мембран.

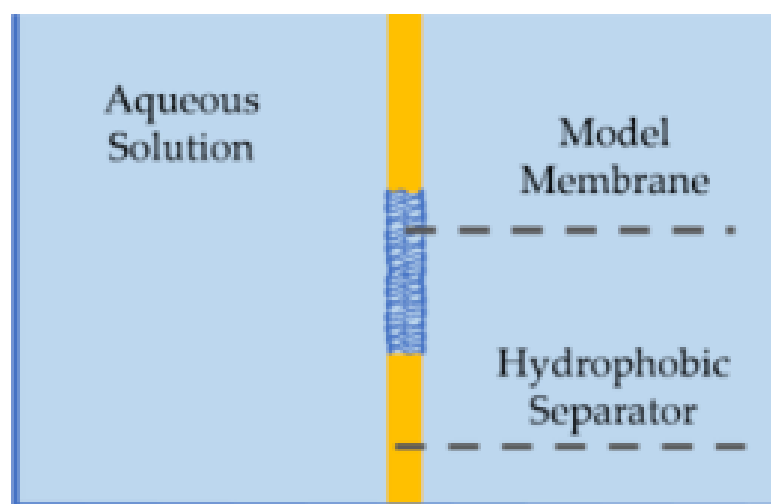


Рисунок 1.2 – Отримання пористої мембрани [5]

Пористі мембрани є важливими інструментами для вивчення функції мембранних білків, взаємодії ліків з мембранами і розуміння біофізичних властивостей ліпідних бішару в контрольованих умовах [5].

1.1.3 Мембрани на твердій основі

Мембрани на твердій основі - це ліпідні бішари, нанесені на тверду підкладку, що забезпечують механічну стабільність і полегшують вивчення мембранно-білкових взаємодій, злиття мембран і скринінг ліків. Ці мембрани пропонують платформу для поверхнево чутливих методів, таких як поверхневий плазмонний резонанс та атомно-силової мікроскопії.

Мембрани з твердою основою можуть бути сформовані різними методами, включаючи осадження Ленгмюра-Блоджетта, злиття везикул або перенесення Ленгмюра-Шефера (рис. 1.3). Ці методи дозволяють створювати чітко окреслені ліпідні шари на твердих поверхнях для детальних біофізичних і біохімічних досліджень.

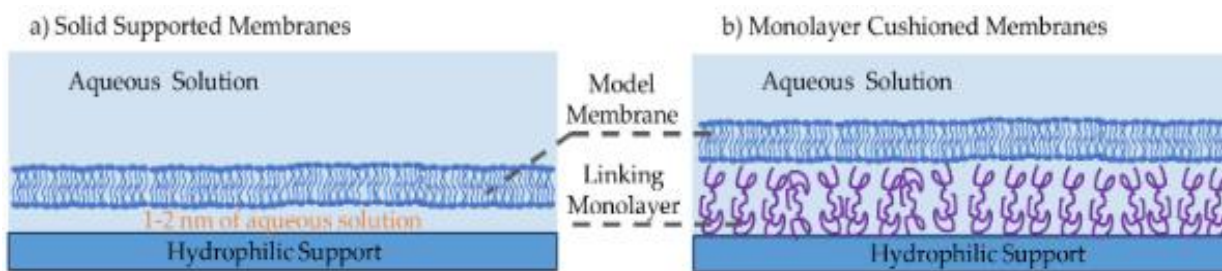


Рисунок 1.3 – Модельні мембрани, що сформовані на твердій підкладці у двох конфігураціях. (а) Мембрани на твердій основі формуються на плоскій поверхні гідрофільної твердої основи. (б) Введення сполучної інтерстиціальної області між твердою основою і мембраною призводить до збільшення об'єму водного середовища під мембраною. З'єднувальний моношар може бути утворений за допомогою полімеру, білка, тіоліпідів або інших амфіфільних молекул [5]

Цей вид мембран має вирішальне значення для дослідження мембранно-білкових взаємодій, мембранного злиття, взаємодії ліків з мембраною, а також для розробки біосенсорів для виявлення біомолекул з високою чутливістю і специфічністю [5].

1.1.4 Мембрани на основі крапель

Краплинні мембрани передбачають інкапсуляцію ліпідних бішару в краплі емульсії, що дозволяє вивчати біофізику мембран, мембранно-білкові взаємодії та проникність мембран в обмеженому середовищі (рис. 1.4). Ці мембрани пропонують унікальну платформу для дослідження мембранної динаміки та властивостей.

Мембрани на основі крапель можуть бути створені шляхом емульгування ліпідних розчинів з водними фазами, що призводить до утворення ліпідних бішарів всередині крапель. Цей метод дозволяє вивчати поведінку мембран в контрольованих умовах і досліджувати мембрано-білкові взаємодії в обмеженому просторі.

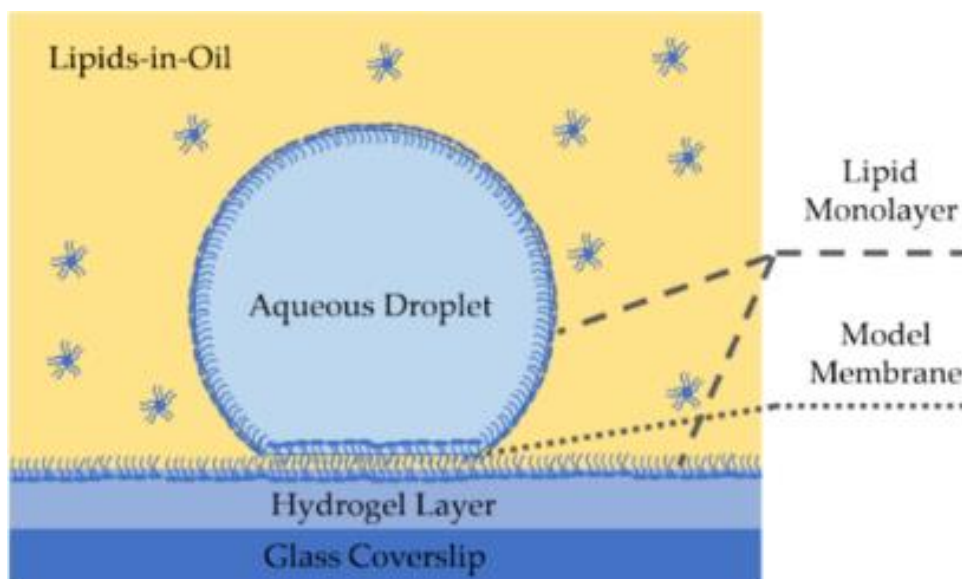


Рисунок 1.4 – Вид збоку краплі на гідрогелевому бішарі, або мембрані, утвореній на межі розділу фаз вода-гідрогель в олійному середовищі [5]

Мембрани на основі крапель є важливими для вивчення процесів злиття мембран, мембрано-білкових взаємодій, механізмів доставки ліків і розуміння біофізичних властивостей ліпідних бішару в складних середовищах. Вони дають уявлення про динаміку та поведінку мембран, які важко спостерігати в традиційних модельних системах [5, 6].

Моделі ліпідних мембран стали важливим інструментом для вивчення структурних властивостей і взаємодій клітинних мембран на молекулярному рівні. Досягнення в методах формування мембран, молекулярному моделюванні та фізико-хімічних характеристиках дозволили отримати цінну інформацію про складну поведінку цих систем. Оскільки дослідження в цій галузі продовжують розвиватися, можна очікувати подальших звершень у розумінні функцій мембран та їхнього впливу на різні біологічні процеси.

1.2 Молекулярні характеристики модельних ліпідних мембран

1.2.1 Основні відомості про молекулярні характеристики модельних ліпідних мембран

Ліпідні мембрани (рис. 1.5) складають первинну структурну основу клітинних мембран, організовуючи найважливіші клітинні функції, такі як передача сигналів, молекулярний транспорт і міжклітинна взаємодія. Моделі ліпідних мембран, синтезовані *in vitro* для імітації складних біологічних мембран, стали важливим інструментом для дослідження фізико-хімічних властивостей і динамічної поведінки клітинних мембран [7].

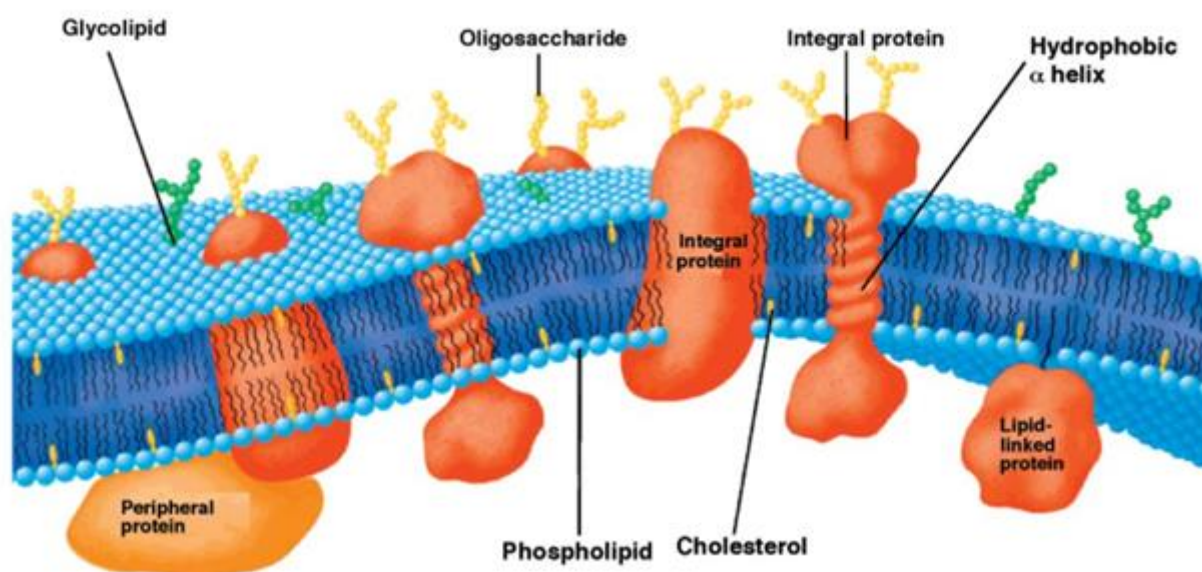


Рисунок 1.5 – Ліпідна мембрана [8]

Модельні ліпідні мембрани зазвичай складаються з амфіфільних молекул ліпідів, які спонтанно самозбираються у двошарові структури у водному середовищі [7]. Фосфоліпіди, які є основними компонентами біологічних мембран, часто використовують для виготовлення модельних ліпідних мембран завдяки їхній здатності утворювати стабільні бішари. Крім того, холестерин зазвичай включають до складу модельних мембран, щоб

імітувати ліпідний склад мембран еукаріотичних клітин і модулювати плинність та проникність мембран.

Молекулярна організація модельних ліпідних мембран демонструє надзвичайну складність, на яку впливають такі фактори, як склад ліпідів, товщина бішару та міжмолекулярні взаємодії [7]. Рентгенівська дифракція виявила пластинчасту структуру ліпідних шарів, виявивши розташування ліпідних молекул у площині мембрани.

Молекулярна структура фосфоліпідів визначає багато характеристик модельних мембран, таких як їхні фізичні властивості та проникність для різних речовин. Наприклад, наявність насичених чи ненасичених хвостових груп може впливати на структурну компактність мембрани та її рівень густини. Крім того, наприклад, холестерол або гліколіпіди, можуть впливати на еластичність та стійкість мембрани [9].

Також, додаткові компоненти, такі як холестерол, можуть бути включені до ліпосом з метою моделювання більш реалістичних умов клітинних мембран. Холестерол відіграє важливу роль у регулюванні рівня рідкості та проникності мембран [10].

Іншою важливою характеристикою модельних ліпідних мембран є їхній заряд. Багато фосфоліпідів мають зарядові голівки, що можуть впливати на взаємодію мембран з різними молекулами та біологічними системами [11].

Модельні ліпідні мембрани є потужним інструментом для вивчення біохімічних процесів, які відбуваються в клітинних мембранах. Розуміння їхніх молекулярних характеристик допомагає у глибшому аналізі функцій та властивостей біологічних мембран.

Основні ліпіди, які утворюють мембрани, володіють унікальним поєднанням гідрофобних та гідрофільних властивостей, що робить їх майже нерозчинними у воді у мономерному стані. Ця хімічна властивість призводить до того, що при контакті з водою, гідрофільні головки ліпідів стараються максимально занурюватися в водну фазу, водночас забезпечуючи гідрофобним хвостам внутрішню орієнтацію [12]. Цей механізм надає ліпідам унікальну

здатність формувати різноманітні структури, які можуть бути стійкими при агрегації. Коли ці ліпіди розподілені на межі води та повітря, вони утворюють мономолекулярний шар (рис. 1.6).

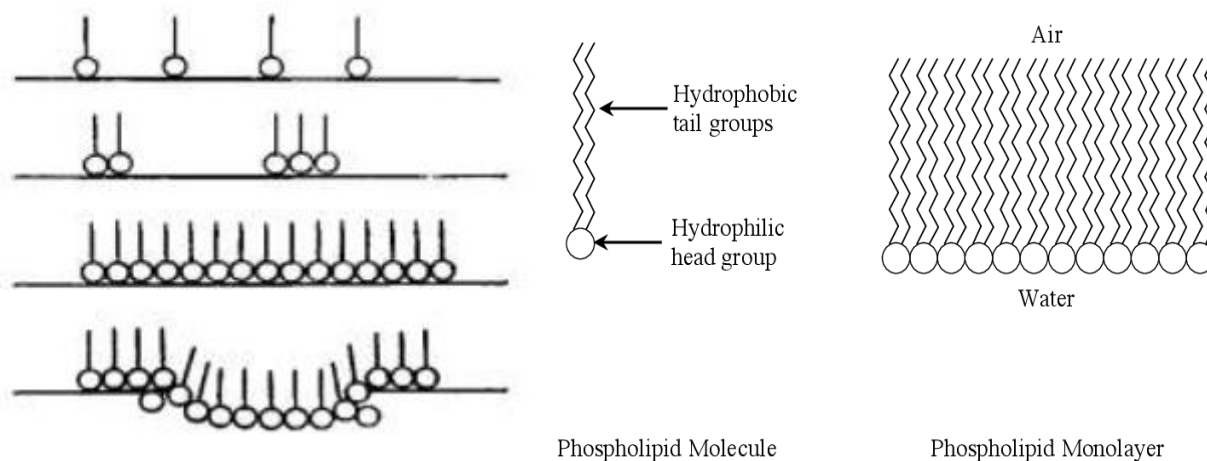


Рисунок 1.6 – Формування фосфоліпідного моношару [13]

Формується стан, подібний до двовимірного газу (рис. 1.7, А). Під дією зовнішніх факторів, таких як стискання, міжмолекулярні взаємодії виявляються, що призводить до формування так званих розтягнутих рідких плівок (рис. 1.7, Б). У цьому стані молекули ліпідів володіють усіма ступенями свободи, проте головки фіксуються на поверхні розділу фаз, тоді як вуглеводневі ланцюги молекул схильні до агрегації та взаємопроникнення [12].

Зі збільшенням тиску у моношарі реалізується найбільш щільна упаковка молекул, що зазвичай означає їх вертикальну орієнтацію. Цей процес супроводжується певним рівнем рухливості вуглеводневих ланцюгів, які виявляють більшу рухливість у площині поверхні, ніж полярні голівки, оскільки вони мають сильну гідратовану оболонку. У цьому стані можна спостерігати конденсовану рідку плівку (рис. 1.7, В).

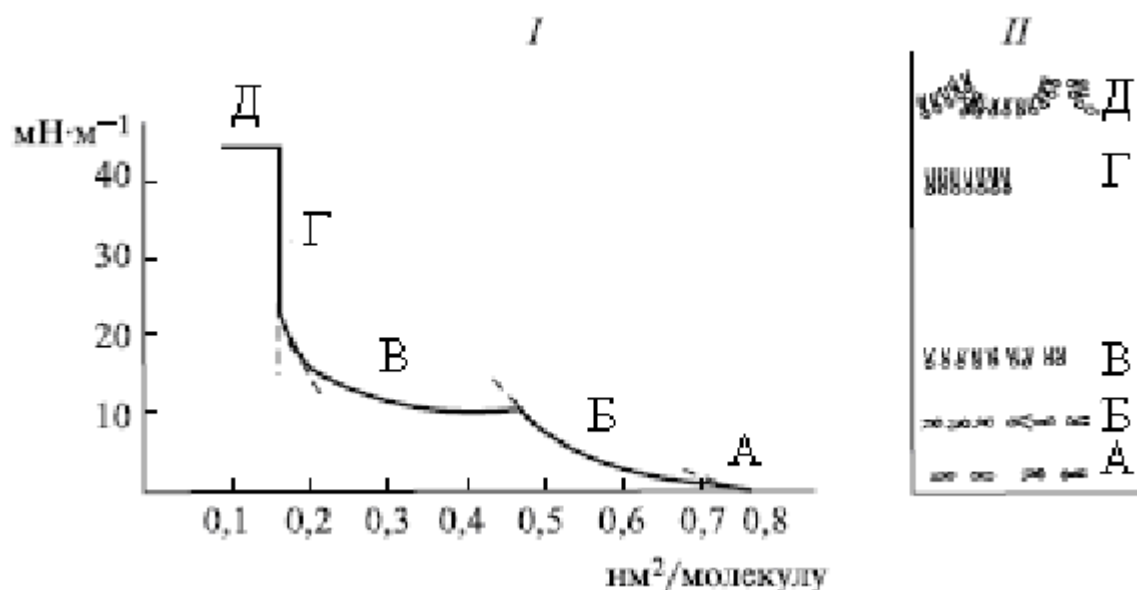


Рисунок 1.7 – Крива площа-тиск для моношару ліпідів (I) та схема розміщення ліпідних молекул на межі поділу фаз повітря-вода (II): А – стан двомірного газу, Б – розтягнута рідка плівка, В – конденсована рідка плівка, Г – твердий стан, Д – стан колапсу [14]

Подальше збільшення тиску може призвести до руйнування гідратних оболонок полярних головок, що призводить до того, що моношар стає практично нестисливим і переходить у твердий стан (рис. 1.7, Г). Перевищення певного граничного тиску може спричинити руйнування моношару, що називають станом колапсу (рис. 1.7, Д) [17].

1.2.2 Динамічна поведінка модельних ліпідних мембран

Модельні ліпідні мембрани демонструють динамічну поведінку, подібну до біологічних мембран, що зазнають різних структурних перетворень у відповідь на зовнішні стимули. Плинність мембрани, критичний параметр, що регулює мембранну динаміку, залежить від таких факторів, як температура, склад ліпідів і кривизна мембрани. Методи флуоресцентної мікроскопії в поєднанні з флуоресцентно-міченими ліпідами дозволяють візуалізувати

мембранну динаміку в реальному часі, пропонуючи безпрецедентне розуміння процесів дифузії ліпідів, формування доменів і злиття мембран [15, 16].

Більше того, моделювання молекулярної динаміки стало потужним інструментом для вивчення динамічної поведінки модельних ліпідних мембран на атомному рівні. Інтегруючи експериментальні дані з комп'ютерними моделями, дослідники можуть з'ясувати механізми, що лежать в основі мембраноопосередкованих процесів, таких як білково-ліпідні взаємодії, перевертання ліпідів та злиття мембран. Ці міждисциплінарні підходи значно поглибили наше розуміння молекулярної динаміки, що регулює структуру і функції мембран.

2 ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТОХРОМУ С І ЙОГО ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ З МОДЕЛЬНИМИ МЕМБРАНАМИ

Цитохром С - це глобулярний білок, що складається з 104 амінокислотних залишків, з високим вмістом α -спіралі та мінімальною β -листовою структурою, що дозволяє йому легко асоціюватися з мембранами (рис. 2.1). За фізіологічних умов існує рівновага між розчинною нативною та мембранозв'язаною формами цитохрому С [18].

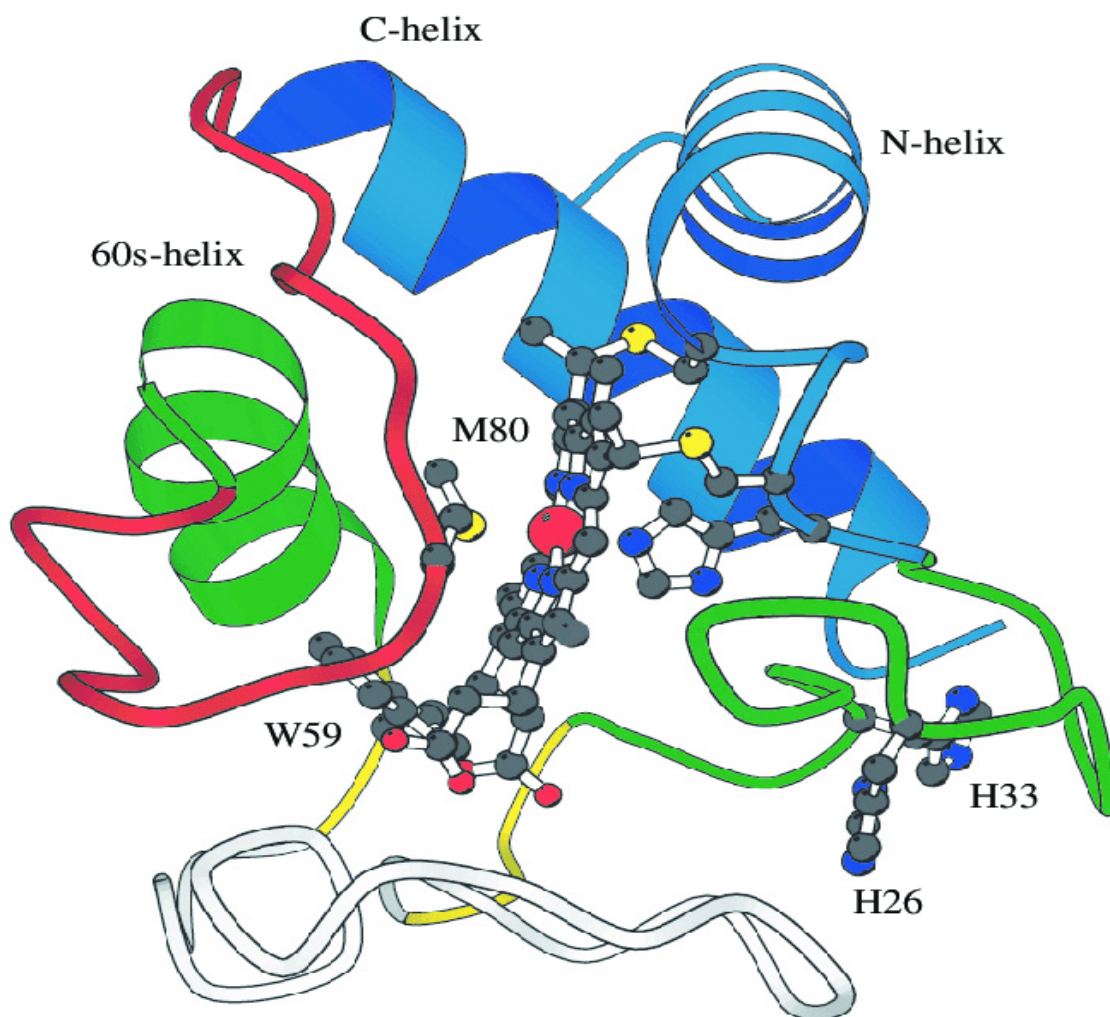


Рисунок 2.1 – Структура цитохрому С [19]

Цитохром С є невеликим гемовим білком, який міститься в мітохондріях еукаріотичних клітин, керує безліччю біологічних процесів, що мають вирішальне значення для функціонування та виживання клітин.

2.1 Фізико-хімічні характеристики цитохрому С

Цитохром С являє собою компактну глобулярну структуру, що складається з одного поліпептидного ланцюга, згорнутого у високо впорядковану третинну конформацію. Ця тривимірна структура, стабілізована мережею внутрішньомолекулярних водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій, інкапсулює важливий кофактор: протеїнову групу гему, ковалентно зв'язану з білковою матрицею [20].

Група гему, розташована в гідрофобному ядрі цитохрому С, слугує епіцентром його біохімічної активності. Складаючись з іона двовалентного заліза, координованого в межах плоского порфіринового кільця, гемова група надає цитохрому С характерних спектроскопічних особливостей, завдяки чому він піддається дослідженню за допомогою різних спектроскопічних методів, включаючи спектроскопію поглинання в ультрафіолетовій області, флуоресцентну спектроскопію та резонансну спектроскопію комбінаційного розсіювання [21].

В основі функціональності цитохрому С лежить його редокс-активна гемова група, яка піддається оборотним окисно-відновним реакціям для передачі електронів у мітохондріальному електронному транспортному ланцюзі. Окислювально-відновний потенціал цитохрому С, налаштований координаційним оточенням його гемового заліза, диктує термодинамічну доцільність реакцій перенесення електронів з його спорідненими окислювально-відновними партнерами, а саме цитохром С оксидазою і цитохром С редуктазою [22].

Взаємодія між окисно-відновними станами цитохрому С - переважно між двовалентним (Fe^{2+}) і тривалентним (Fe^{3+}) - та його спорідненість до

донорів і акцепторів електронів визначає його участь у клітинному диханні, окиснювальному метаболізмі та виробництві енергії. Більше того, окисно-відновна активність цитохрому С виходить за межі його канонічної ролі у транспорті електронів, впливаючи на клітинні сигнальні шляхи, регуляцію окисно-відновних процесів та апоптотичні сигнальні каскади.

2.1.1 Конформаційна динаміка та білкові взаємодії цитохрому С

Функціональність цитохрому С нерозривно пов'язана з його динамічним конформаційним ландшафтом, що характеризується спонтанними коливаннями між кількома структурними станами. Ця конформаційна динаміка, що охоплює діапазон часових шкал від пікосекунд до мілісекунд, модулює взаємодію цитохрому С з його партнерами по зв'язуванню, впливаючи на кінетику перенесення електронів, події білкового розпізнавання та шляхи апоптотичного сигналізування [23].

Спорідненість цитохрому С до його редокс-партнерів тісно пов'язана з його конформаційною гнучкістю, причому переходи між відкритими і закритими конформаціями визначають ефективність і специфічність реакцій перенесення електронів. Структурні дослідження із застосуванням таких методів, як рентгенівська кристалографія, ЯМР-спектроскопія та моделювання молекулярної динаміки, надали неоціненну інформацію про конформаційний ансамбль цитохрому С та його значення для біологічних функцій.

2.1.2 Клітинні функції та регуляторні ролі цитохрому С

Окрім своєї канонічної ролі переносника електронів в окислювальному фосфорилуванні, цитохром С бере активну участь у регуляції апоптозу, виступаючи ключовим медіатором запрограмованої клітинної смерті (рис. 2.2). При отриманні апоптотичних стимулів цитохром С вивільняється з

мітохондріального міжмембранного простору в цитозоль, де він вступає в білкову взаємодію з апоптичним фактором активації протеази 1 (Apaf-1), ініціюючи збірку апоптосомного комплексу та активацію наступних каскадів каспаз [24].

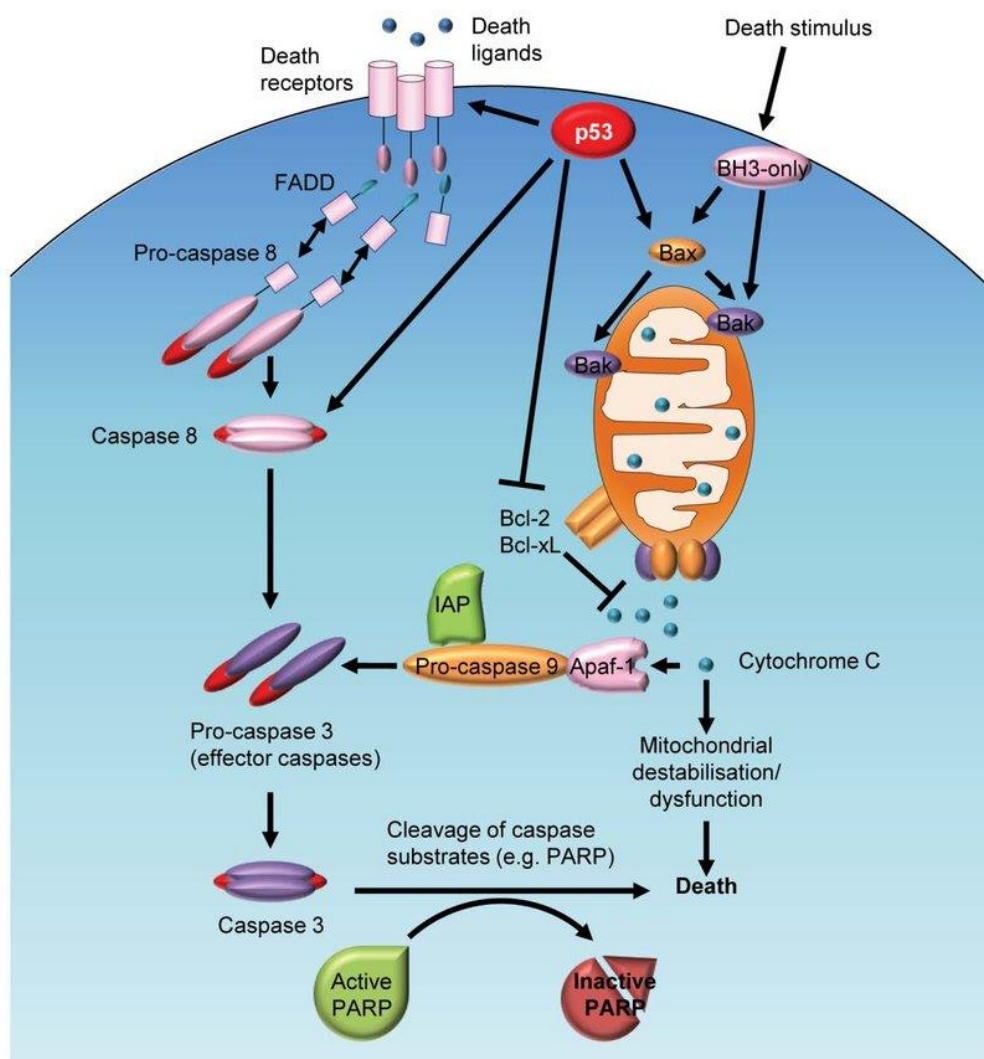


Рисунок 2.2 – Схема апоптозу за участю мітохондріального цитохрому С [25]

Взаємозв'язок між окисно-відновною та апоптичною функціями цитохрому С підкреслює його багатогранну роль у клітинному гомеостазі, шляхах стрес-реакції та патогенезі захворювань. Порушення регуляції апоптичної сигналізації, опосередкованої цитохромом С, пов'язане з різними патологічними станами, включаючи рак, нейродегенеративні захворювання та

серцево-судинні розлади, що підкреслює терапевтичний потенціал впливу на цитохром С-залежні шляхи втручання в перебіг хвороби [26].

Отже, цитохром С є парадигмою білкової функціональності, яка поєднує його фізико-хімічні властивості з різноманітними клітинними процесами, необхідними для життя: від ролі переносника електронів в окислювальному метаболізмі до участі в апоптотичній сигналізації та визначенні клітинної долі.

2.2 Особливості взаємодії цитохрому С з модельними мембранами

Цитохром С демонструє універсальність у взаємодії з клітинними мембранами. Розуміння тонкощів мембранних взаємодій цитохрому С є важливим для розгадки його різноманітних фізіологічних ролей, включаючи транспорт електронів, регуляцію апоптозу та окислювально-відновлювальну сигналізацію.

Спорідненість цитохрому С до мембран виникає внаслідок електростатичної та гідрофобної взаємодії з ліпідними бішарами, що зумовлено його амфіпатичною природою та позитивно зарядженими поверхневими ділянками. При зіткненні з модельними мембранами, що імітують склад мітохондріальних мембран, цитохром С зазнає швидких подій зв'язування, що характеризуються транзиторними взаємодіями з ліпідними головними групами та вбудовуванням у гідрофобне ядро бішару (рис. 2.3).

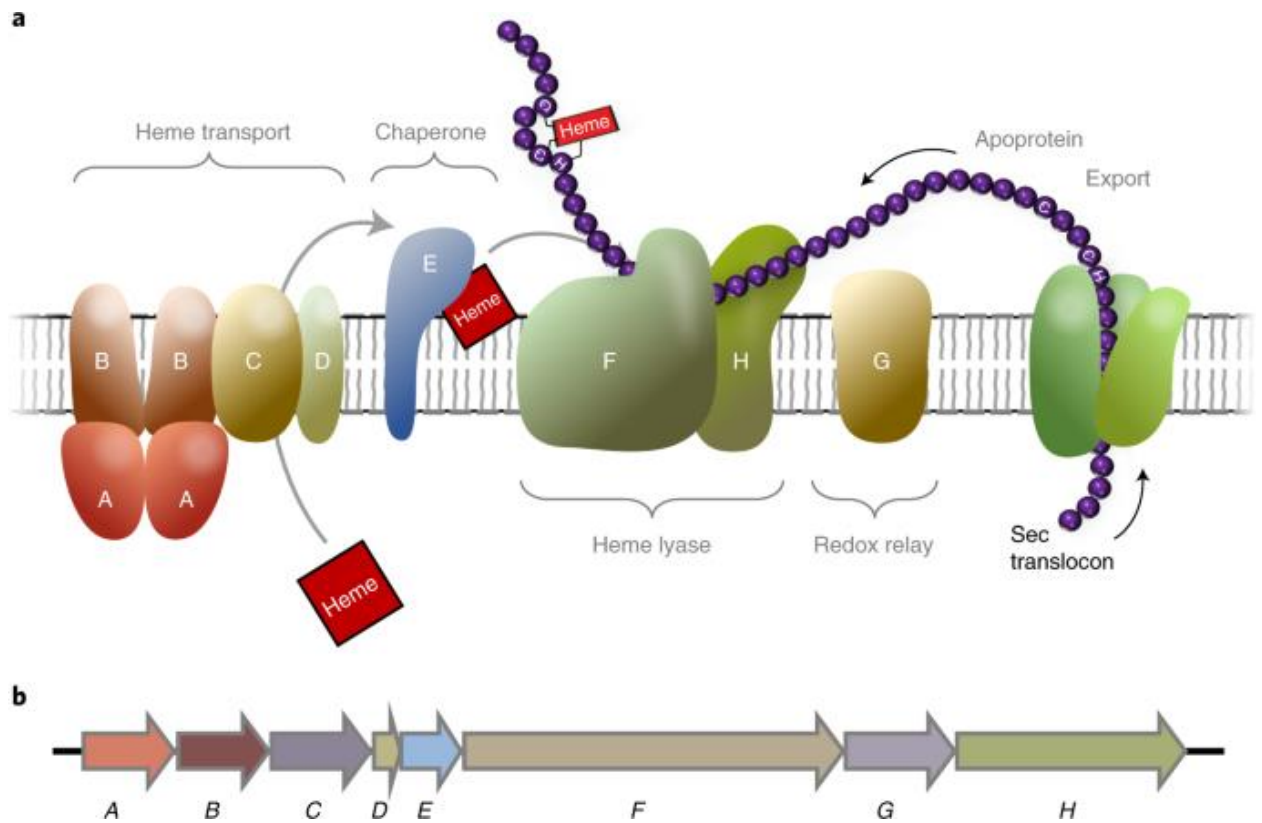


Рисунок 2.3 – Мембранозв'язаний цитохром С [27]

На специфічність мембранних взаємодій цитохрому С впливає ліпідний склад і фізико-хімічні властивості мембрани. Негативно заряджені ліпіди підвищують афінність зв'язування цитохрому С через електростатичну взаємодію з позитивно зарядженими залишками на поверхні білка. Крім того, плинність мембрани, щільність упаковки ліпідів і стан ліпідної фази модулюють поведінку цитохрому С при поділі та глибину проникнення в мембрану, впливаючи на його структурну конформацію і функціональну активність [28].

Біологічні функції цитохрому С опосередковані його взаємодією з кардіоліпіном - аніонним мітохондріальним фосфоліпідом з унікальними фізико-хімічними властивостями (рис. 2.4) [29]. Припускають, що молекула цитохрому С містить два типи сайтів зв'язування аніонних фосфоліпідів, які відповідають за електростатичну взаємодію між залишками Lys72, Lys73 і депротонованою р-фосфатною групою (А-сайт) та водневий зв'язок між Asn52 і протонованим фосфатом (С-сайт) [30].

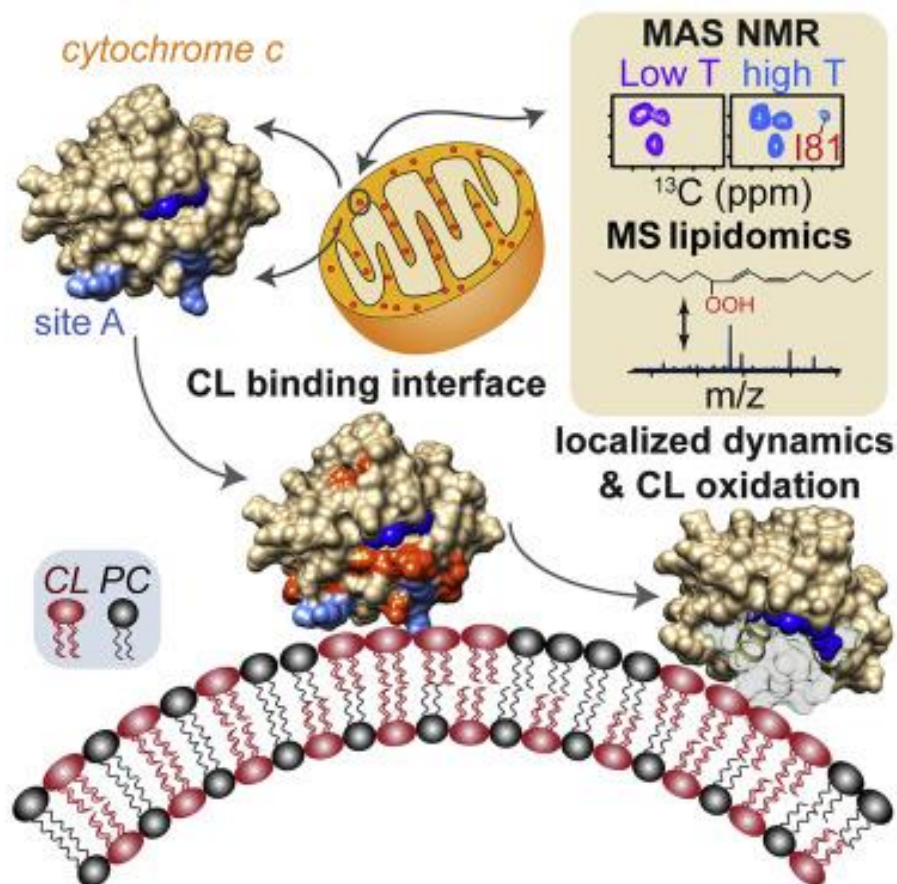


Рисунок 2.4 – Взаємодія цитохрому С з кардіоліпіном на модельних ліпідних мембранах [31]

2.2.1 Структурні адаптації та мембрано-індуковані конформаційні зміни цитохрому С

Після зв'язування з мембраною цитохром С зазнає структурних адаптацій, набуваючи різних конформаційних станів, пристосованих до його ліпідного оточення. Біофізичні дослідження з використанням таких методів, як спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР), рентгенівська кристаліграфія та моделювання молекулярної динаміки, виявили мембраноіндуковані конформаційні зміни в цитохромі С, включаючи зміни у вторинній структурі, доступності гему та білково-ліпідних взаємодій.

Зв'язування цитохрому С з модельними мембранами викликає локальні збурення в упаковці ліпідів і викривлення бішару, що призводить до

деформації мембрани і кластеризації цитохрому С на мембранних інтерфейсах. Ці мембрано-індуковані структурні зміни впливають на окисно-відновні властивості цитохрому С, кінетику перенесення електронів та апоптичну сигнальну активність, що підкреслює важливість мембранного контексту для модуляції його фізіологічної функції [32].

2.2.2 Функціональне значення та біологічна значущість цитохрому С

Взаємодія цитохрому С з модельними мембранами має глибокі функціональні наслідки для його фізіологічної ролі в клітинному метаболізмі та сигнальних шляхах. Мембранозв'язаний цитохром С слугує важливим компонентом мітохондріального електронного транспортного ланцюга, забезпечуючи ефективне перенесення електронів між дихальними комплексами та сприяючи виробленню АТФ.

Мембранні взаємодії цитохрому С відіграють ключову роль в апоптичній сигналізації, де вивільнення цитохрому С з мітохондрій запускає активацію каспаз і апоптичну загибель клітин. Мембранозв'язаний цитохром С демонструє підвищену пероксидазну активність, сприяючи окисленню ліпідів і проникненню мембран під час індукції апоптозу.

Крім того, зв'язок цитохрому С з модельними мембранами впливає на його взаємодію з іншими білками, включаючи цитохром С оксидазу та апоптичні регуляторні білки, модулюючи клітинний редокс-гомеостаз та апоптичну чутливість. Розуміння тонкощів мембранних взаємодій цитохрому С дає уявлення про функцію мітохондрій, реакцію на окислювальний стрес і патогенез різних захворювань, включаючи рак і нейродегенеративні розлади [33].

3 ВПЛИВ НЕ-НЕ-ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА МОДЕЛЬНІ ЛІПІДНІ МЕМБРАНИ ТА ЦИТОХРОМ С

Не-Не-лазерне випромінювання, або неонове лазерне випромінювання, є одним із видів низькоенергетичного лазерного випромінювання. Дослідження впливу цього типу випромінювання на модельні ліпідні мембрани та цитохром С має пряме важливе значення для розуміння його впливу на живі організми у цілому.

У численних публікаціях описані знеболюючі, протизапальні та біомодулюючі ефекти лазерного випромінювання [34]. Показовими ефектами на клітинному рівні є: збільшення синтезу ДНК, збільшення синтезу колагену, прискорення мембранного транспорту та покращення проникності мембран, модуляція імунологічної відповіді системи та прискорення дисоціації оксигемоглобіну [35-43]. Дані літератури свідчать, що клінічні ефекти лазерного випромінювання залежать від: довжини хвилі, потужності, дози енергії, типу тканини, що опромінюється, та методу подачі енергії (безперервний чи імпульсний) [43, 44]. Дослідження показують, що лазерне випромінювання малої потужності (особливо в червоному та інфрачервоному діапазонах) прискорює проліферацію клітин, головним чином, через активацію дихального ланцюга мітохондрій і клітинних сигнальних каскадів (рис. 3.1) [45-48], а також модуляцію активності металопротеїназ клітинного матриксу та експресії генів [49].

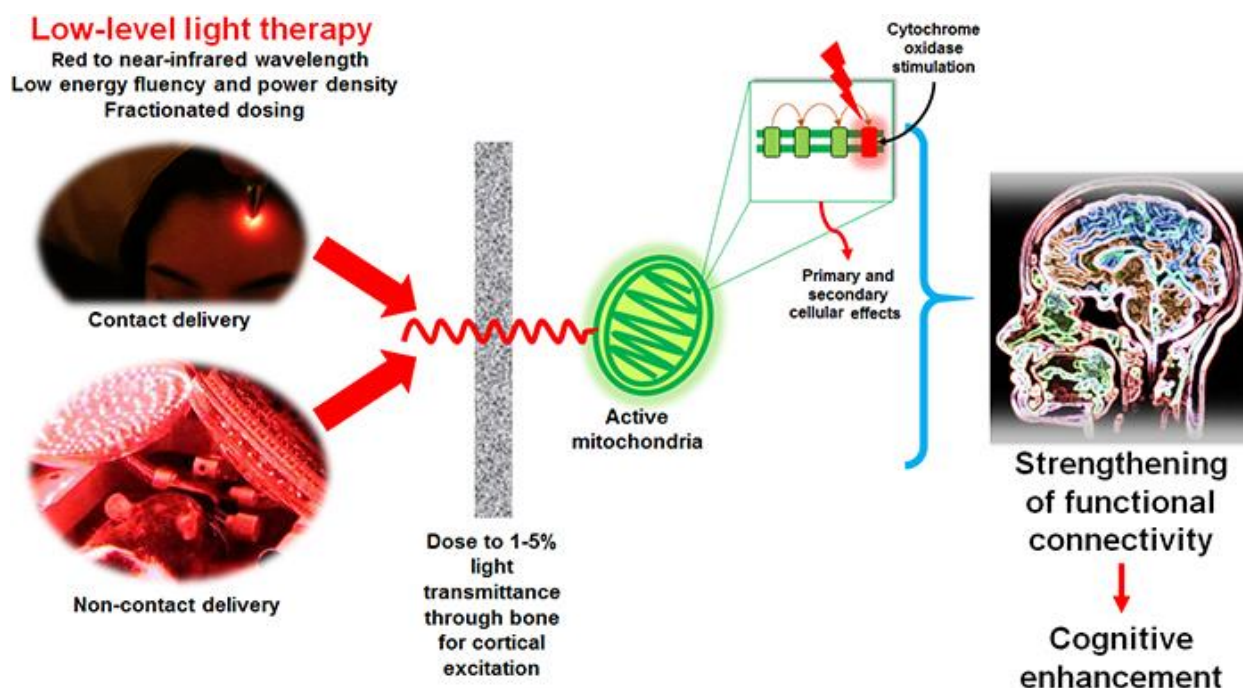


Рисунок 3.1 – Вплив довготривалого інфрачервоного лазерного випромінювання на активність цитохром С оксидази та мозкової біоенергетики [50]

Лазерне випромінювання поглинається клітинами завдяки хромофорам, які вони містять. За поглинання відповідають специфічні білки, які називаються цитохроми, розміщені в дихальному ланцюзі мітохондрій. Іншими прикладами хромофорів є амінокислоти, нуклеїнові кислоти, нікотинамід-аденіндинуклеотид або гемоглобін. Лазерне випромінювання викликає як ефекти прийому, так і поглинання на клітинному рівні. Ефект поглинання, викликаний індукцією частинок, проявляється у збільшенні загальної енергії клітини, яка включає внутрішню енергію клітини. Ефект рецепції базується на інтенсифікації клітинного метаболізму. Поглинання лазерного випромінювання цитохромами активує електронно-транспортний ланцюг, що індукує зростання виробництва АТФ і, як наслідок, прискорює метаболізм. Ефективна енергія збільшується за рахунок внутрішньої енергії. Біостимулююча дія лазерного випромінювання викликає фотоактивацію ферментів.

Ефекти біостимулюючої дії включають зміни клітинного метаболізму, такі як збільшення синтезу АТФ, збільшення синтезу білків, ДНК і РНК, прискорення клітинного поділу, підвищення активності ферментів, збільшення кількості мітохондрій і підвищення мембранного потенціалу. Важливим ефектом стимуляції є збільшення активності та кількості Т-лімфоцитів, які впливають на процеси регенерації, локально вивільняючи фактори росту [35-40].

3.1 Вплив лазерного випромінювання на модельні ліпідні мембрани

Відомо, що лазерне випромінювання може впливати на фізичні та хімічні властивості ліпідних мембран.

- **Перекисне окислення:** дослідження показали, що лазерне випромінювання може змінювати рівень перекисного окислення ліпідів у мембранах, що впливає на їхню структуру та функцію (рис. 3.2).

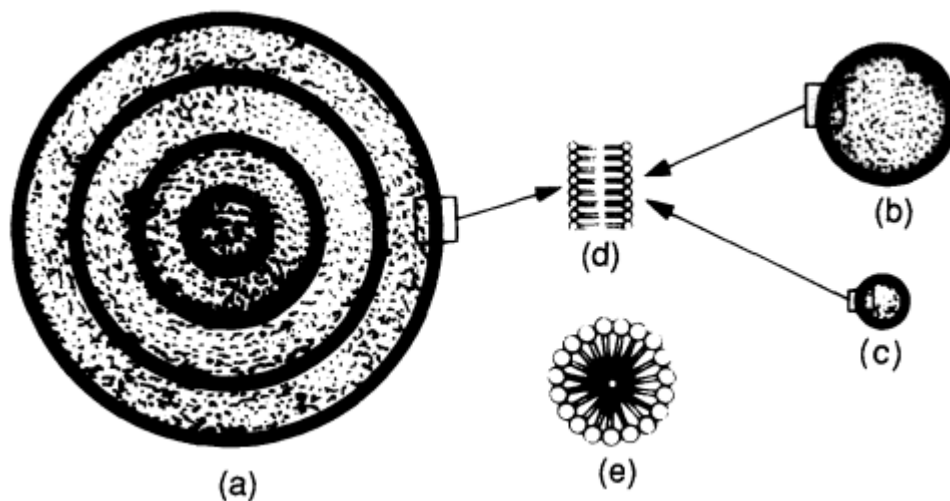


Рисунок 3.2 – Перекисне окислення ліпідів у ліпосомах: а) Мультиламелярна ліпосома (MLV); б) Велика уніламелярна ліпосома (LUV); в) Мала уніламелярна ліпосома (SUV); д) Збільшене зображення вставки в а, б і в, що показує ліпідний бішар; е) Міцелярна структура ліпідів [51]

Безпосередній вплив лазерного випромінювання може викликати різноманітні фізичні та хімічні зміни в структурі ліпосом, включаючи розігрівання, зміни в мембранній пермеабільності та інші. Ці зміни можуть спричинити пошкодження ліпідних мембран, що може призвести до збільшення процесів перекисного окислення ліпідів.

Однак, також існує можливість опосередкованого впливу лазерного випромінювання на процес перекисного окислення ліпідів через активацію або інгібування реакцій, що залучені у цей процес. Наприклад, лазерне випромінювання може впливати на активність ферментів, які відповідають за антиоксидантні механізми в ліпосомах, такі як супероксиддисмутаза або каталаза.

- **Термічні ефекти:** лазерне випромінювання взаємодіє з ліпідними мембранами на молекулярному рівні, що призводить до поглинання енергії молекулами ліпідів. Це поглинання викликає локальне нагрівання, впливаючи на теплову динаміку мембрани. Зміни температури змінюють плинність ліпідного бішару, впливаючи на ліпідно-білкові взаємодії, що мають вирішальне значення для клітинних процесів, таких як передача сигналів і мембранний трафік. Крім того, температурно-залежні фазові переходи в ліпідних мембранах можуть модулювати організацію мембранних компонентів, впливаючи на клітинні відповіді на стимули навколишнього середовища [52].

- **Фотохімічні реакції:** лазерне опромінення може ініціювати каскад фотохімічних реакцій у ліпідних мембранах. Після поглинання фотонів молекули ліпідів зазнають електронних переходів, що призводить до утворення збуджених станів або реактивних проміжних продуктів. Подальші реакції можуть включати генерацію ліпідних радикалів, пероксидів або інших продуктів фотоокислення. Ці активні речовини можуть поширювати ланцюгові реакції перекисного окислення ліпідів, що призводить до окислювального пошкодження і дестабілізації ліпідного бішару. Як наслідок, зміни у складі та цілісності мембран впливають на мембраноасоційовані

процеси, такі як транспорт іонів, злиття мембран та білково-ліпідні взаємодії [53].

- **Механічний стрес:** індукований лазером механічний стрес порушує ліпідні мембрани через прямі та непрямі механізми. Інтенсивна лазерна енергія може створювати локальний дисбаланс тиску, викликаючи деформацію мембрани та зміни її кривизни. Крім того, ударні хвилі, що генеруються лазерним випромінюванням, поширюються через мембрану, викликаючи динамічні флуктуації в структурі ліпідного бішару. Механічний стрес змінює біомеханічні властивості мембрани, впливаючи на стабільність мембрани та відповіді клітин на механічні подразники. Крім того, лазерно-індуковані механічні збурення можуть викликати реорганізацію цитоскелету і клітинне ремоделювання, модулюючи клітинну адгезію, міграцію і шляхи механотрансдукції [54].

- **Мембранна пермеабілізація:** фемтосекундні (10^{-15} с) лазерні імпульси зробили революцію в галузі біофізики мембран, уможлививши точний контроль над процесами мембранної пермеабілізації. Індукована лазером фотопорація створює тимчасові нанопори в ліпідних мембранах, що дозволяє селективно транспортувати іони, малі молекули або макромолекули через мембранний бар'єр. Просторово-часовий контроль, який забезпечують фемтосекундні лазери, дозволяє цілеспрямовано доставляти терапевтичні агенти, нуклеїнові кислоти або біомолекулярні зонди в клітини або ліпідні везикули. Крім того, оборотна природа фотопорації полегшує моніторинг клітинних реакцій на екзогенні стимули в режимі реального часу, пропонуючи розуміння мембранної динаміки та механізмів клітинної комунікації [55].

- **Структурні зміни:** лазерне випромінювання індукує структурне ремоделювання ліпідних мембран, впливаючи на їхню організацію та морфологію. Зміни кривизни ліпідного бішару, його структури та організації доменів впливають на мембрано-білкові взаємодії, кластеризацію рецепторів та мембраноасоційовані сигнальні шляхи. Крім того, індуковані лазером структурні зміни модулюють біофізичні властивості мембрани, такі як

проникність, еластичність і розподіл поверхневого заряду. Ці зміни в мембранній архітектурі впливають на клітинні процеси, наприклад, на ендоцитоз, екзоцитоз та мембрано-цитоскелетні взаємодії, що в кінцевому підсумку формує морфологію, полярність та функцію клітини [56].

- **Біологічні застосування:** лазерні методи стали важливими інструментами для дослідження біофізичних властивостей і фізіологічних функцій ліпідних мембран. Методи оптичної маніпуляції, такі як оптичний пінцет і лазерні пастки, дозволяють точно контролювати деформацію мембран, злиття везикул і процеси біомолекулярної збірки. Індукована лазером фотопорація полегшує неінвазивну доставку терапевтичних агентів, генетичного матеріалу або флуоресцентних зондів у живі клітини або модельні ліпідні мембрани, уможлиблюючи дослідження механізмів клітинного поглинання та шляхів внутрішньоклітинного транспорту [57].

3.2 Вплив лазерного випромінювання на молекули цитохрому

- **Теплові ефекти:** Лазерне випромінювання може сприяти коливальним і обертальним переходам енергії всередині молекули. Поглинання фотонів хромофорами цитохромів призводить до локального нагрівання, впливаючи на теплову динаміку структури білка. Ці теплові ефекти можуть змінювати конформаційну гнучкість молекул цитохромів, впливаючи на їхню ферментативну активність, кінетику перенесення електронів і стабільність. Крім того, індуковані температурою зміни конформації цитохромів можуть модулювати білкові взаємодії та афінність, тобто міцність зв'язування активних центрів однієї молекули з реакційно-здатними групами іншої молекули, лігандів, що в кінцевому підсумку впливає на окислювально-відновні процеси та метаболічні шляхи в клітині [58].

- **Фотохімічні реакції:** Молекули цитохромів чутливі до фотохімічних реакцій, індукованих лазерним випромінюванням, особливо у видимій та ближній інфрачервоній областях спектра, де їхні хромофори поглинають

світло. Поглинання фотонів гемовими групами цитохромів може ініціювати фотохімічні процеси, такі як дисоціація лігандів, окисно-відновні реакції або конформаційні зміни білків. Ці фотохімічні реакції можуть призводити до утворення реакційно-здатних проміжних продуктів, перехідних або радикальних форм в активному центрі цитохрому. Отже, лазерно-індуковані фотохімічні процеси можуть модулювати функції цитохрому, змінюючи його каталітичну активність, ефективність перенесення електронів і взаємодію з редокс-партнерами (rH) [59].

- **Механічний стрес:** Лазерне випромінювання може чинити механічний вплив на молекули цитохрому через непрямі механізми, такі як генерація акустичних хвиль і кавітаційні ефекти, а також через пряму взаємодію зі структурою білка. Високоінтенсивні лазерні імпульси можуть викликати хвилі тиску, які поширюються через розчинник і навколишні біомолекули, чинячи механічну дію на молекули цитохрому. Крім того, сфокусовані лазерні промені можуть викликати локальні збурення в структурі цитохрому, що призводить до конформаційних змін або навіть зміни процесу розгортання білка. Ці механічні навантаження можуть порушувати функцію цитохрому, погіршуючи його стабільність, каталітичну активність і зв'язування з субстратами або кофакторами [60].

- **Фотоіндуковане перенесення електронів:** Лазерне випромінювання може запускати процеси фотоіндукованого перенесення електронів у молекулах цитохромів, що призводить до утворення радикальних форм або заряджених проміжних продуктів. Поглинання фотонів гемовими групами цитохромів ініціює електронні переходи, що призводить до утворення збуджених станів зі зміненим окисно-відновним потенціалом. Ці збуджені стани можуть вступати в швидкі реакції перенесення електронів із сусідніми донорами або акцепторами електронів, сприяючи окисно-відновній циклічності та потоку електронів у білковому каркасі цитохрому. Індуковані лазером процеси переносу електронів також можуть модулювати активність

цитохрому, впливаючи на його роль у клітинному диханні, окислювальному метаболізмі та функціонуванні електронно-транспортного ланцюга [61].

- **Структурні зміни:** Лазерне випромінювання викликає структурні зміни в молекулах цитохромів, впливаючи на їх третинну і четвертинну структуру, а також на їх динамічні властивості. Зміни конформації цитохромів, спричинені лазерним випромінюванням, можуть впливати на стабільність, гнучкість і доступність білка до розчинників, змінюючи його каталітичні властивості та характеристики зв'язування лігандів. Крім того, індуковані лазером структурні зміни можуть порушувати цитохром-білкові взаємодії, що призводить до змін у розпізнаванні ферменту-субстрату, алостеричної регуляції або утворення білкових комплексів. Ці структурні зміни модулюють функцію цитохрому та його локалізацію в клітинних компартментах, впливаючи на його участь у метаболічних шляхах та сигнальних мережах [62].

- **Біологічні наслідки:** Розуміння впливу лазерного випромінювання на молекули цитохромів має важливе значення як для фундаментальних досліджень, так і для біомедичних застосувань. Лазерні методи, такі як резонансна спектроскопія комбінаційного розсіювання та спектроскопія з часовою роздільною здатністю, дають цінну інформацію про взаємозв'язок між структурою і функцією цитохромів та динаміку окисно-відновних процесів на молекулярному рівні. Опосередковане лазером маніпулювання активністю цитохромів і процесами перенесення електронів відкриває можливості для розробки нових терапевтичних стратегій, спрямованих на боротьбу з оксидативним стресом, мітохондріальною дисфункцією та метаболічними порушеннями (рис. 3.3).

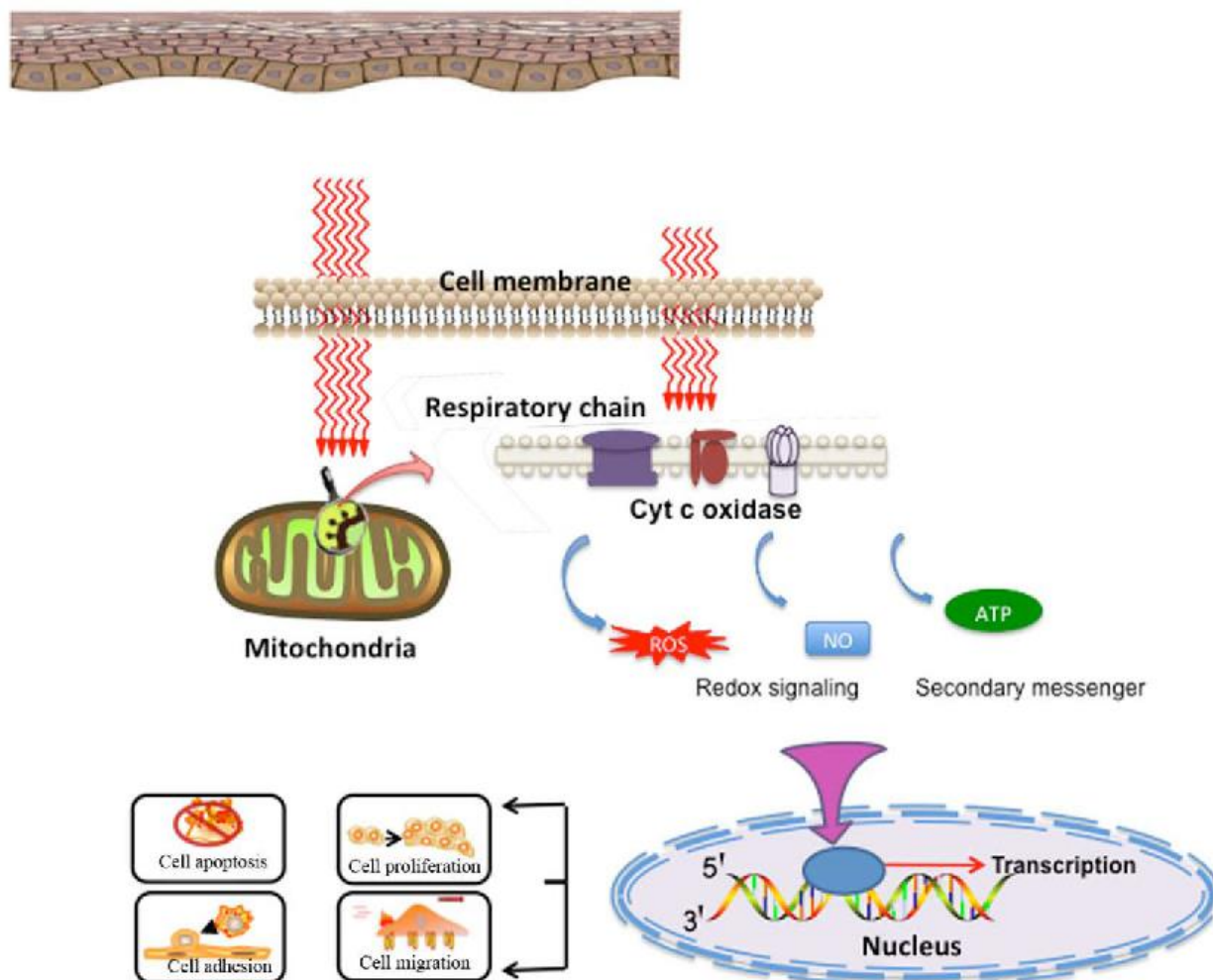


Рисунок 3.3 – Низькорівнева лазерна (світлова) терапія (LLLT) шкіри [63]

Крім того, лазерні підходи до контролю функції цитохромів мають застосування в біоенергетиці, біокаталізі та біосенсориці, сприяючи розробці передових діагностичних інструментів і біотехнологічних застосувань [64].

4 ЕФЕКТИ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА РІВНІ ЛІПОСОМАЛЬНИХ МЕМБРАН

Іонізуюче випромінювання, потужний модулятор клітинних функцій та біомолекулярної структури, чинить глибокий вплив на біологічні мембрани, включаючи ліпосоми - синтетичні везикули, які широко використовуються як моделі клітинних мембран.

4.1 Основні відомості про ефекти іонізуючого випромінювання на ліпосомальні мембрани

Іонізуюче випромінювання, включаючи рентгенівське, гамма-випромінювання та заряджені частинки, генерує активні форми кисню (АФК) в ліпосомальних мембранах шляхом радіолізу води та безпосередньої взаємодії з молекулами ліпідів. АФК, такі як гідроксильні радикали (-ОН), супероксидні радикали (O_2^{--}) та синглетний кисень (1O_2) ініціюють каскади перекисного окислення ліпідів, слугуючи його потужними медіаторами, що призводить до окислювального пошкодження мембранних ліпідів, білків і ДНК (рис. 4.1).

Ліпосомальні мембрани особливо чутливі до радіаційно-індукованого перекисного окислення ліпідів через наявність ненасичених жирних кислот, які служать первинними мішенями для атаки АФК. Радіаційно-індуковане перекисне окислення ліпідів порушує цілісність, плинність і проникність мембран, порушуючи структуру і функції ліпосом [65].

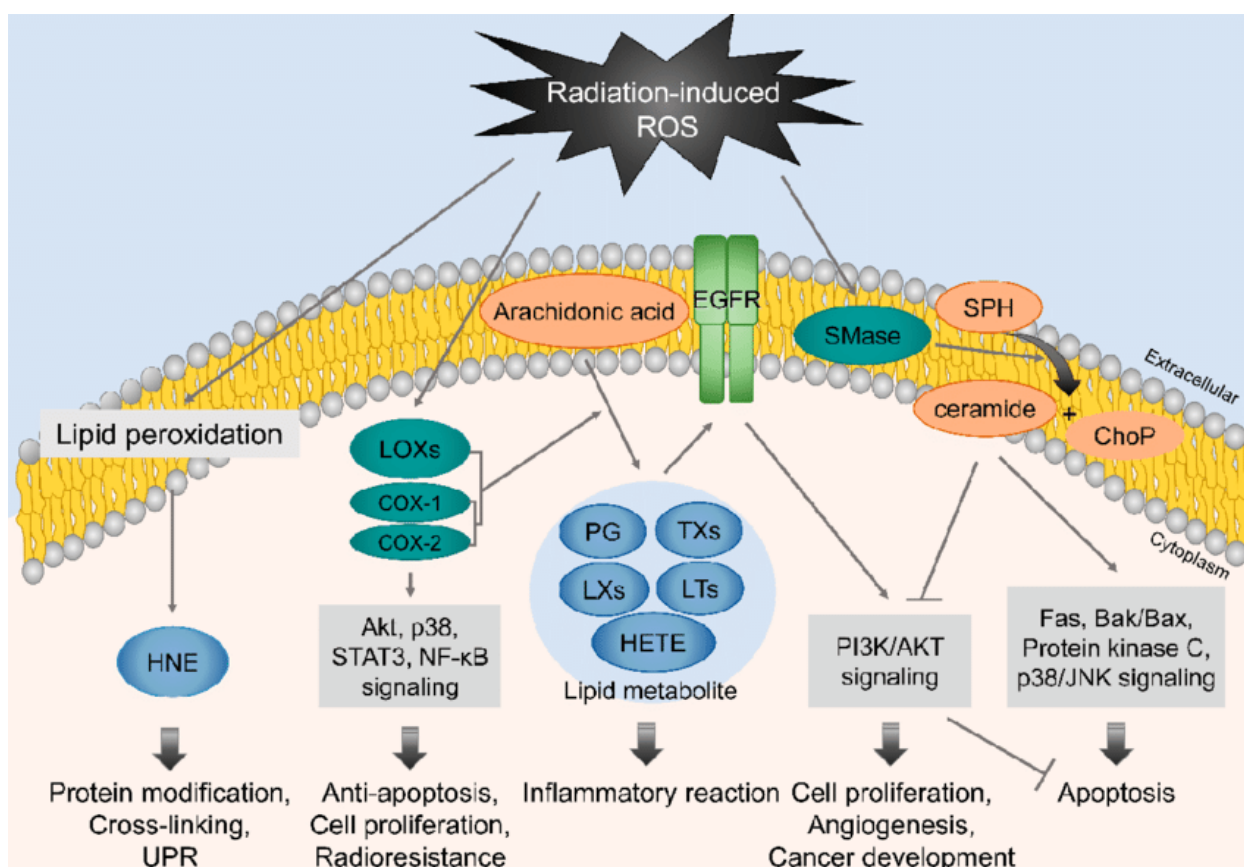


Рисунок 4.1 - Радіаційно-індуковане перекисне окиснення ліпідів [66]

Іонізуюче випромінювання змінює біофізичні властивості ліпосомальних мембран, модулюючи плинність ліпідного бішару та фазову поведінку. Радіаційно-індуковане перекисне окиснення ліпідів та окиснення ліпідів, опосередковане АФК, порушує упаковку ліпідів та організацію мембрани, що призводить до змін плинності, в'язкості та фазових переходів мембран.

Воно індукує фазові переходи в мембрані, переводячи ліпосомальні мембрани з рідкокристалічної фази в гелеву, або індукуючи фазовий поділ і формування доменів. Ці зміни в структурі мембрани та фазовій поведінці впливають на інкапсуляцію ліків, кінетику вивільнення та стабільність ліпосом, що має значення для застосування для доставки ліків [67].

4.2 Мембрано-білкові взаємодії та функціональні наслідки впливу іонізуючого випромінювання на ліпосомальні мембрани

Іонізуюче випромінювання впливає на мембрано-білкові взаємодії ліпосом, впливаючи на стабільність, активність і локалізацію мембраноасоційованих білків. Радіаційно-індуковане перекисне окислення ліпідів та утворення АФК порушують ліпідно-білкові взаємодії, що призводить до денатурації, агрегації та функціональних порушень білків.

Мембранозв'язані білки, включаючи транспортери ліків, рецептори та іонні канали, чутливі до радіаційно-індукованого окислювального стресу, який змінює їхню конформацію, афінність зв'язування лігандів та сигнальну активність. Ці зміни у функціонуванні мембранних білків впливають на клітинну відповідь на променеву терапію, хіміотерапію та стратегії цільової доставки ліків з використанням ліпосомальних носіїв [68].

5 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

5.1 Отримання модельних ліпідних мембран

У роботі використовували яєчний ФХ, КЛ (Sigma) і цитохром С (Fluka) з серця бика. Ліпосоми формували з ФХ і його сумішей з КЛ шляхом інжекції етанольного розчину ліпідів в 13 мл 10 мМ буфера ТРІС НСІ (рН 7,4) з подальшим видаленням етанолу діалізом проти N - кратного надлишку буфера. Розрахунок кількості ліпідів для приготування ліпосом із загальною концентрацією ліпиду 10 мМ проводився за Таблицею 5.1. В якості вихідних препаратів використовували 10% етанольний розчин лецитину (100 мг / мл), 0,5% етанольний розчин кардіоліпіну (5 мг / мл).

Таблиця 5.1 – Розрахунок кількості ліпідів для приготування ліпосом з фосфатидилхоліну і його сумішей з кардіоліпіну

| Склад ліпосом | Позначення проби | Об'єм розчинів ліпідів в етанолі, μМ | |
|---------------|------------------|--------------------------------------|------|
| | | ФХ | КЛ |
| ФХ | L ₀ | 93 | - |
| ФХ:КЛ (10%) | L ₁₀ | 76.1 | 338 |
| ФХ:КЛ (20%) | L ₂₀ | 62 | 620 |
| ФХ:КЛ (40%) | L ₄₀ | 39.9 | 1063 |

5.2 Спектрофотометричне визначення параметрів зв'язування цитохрому С з модельними мембранами

Кінетичні залежності зміни оптичної щільності цитохрому С з модельними бішаровими мембранами різного фосфоліпідного складу

реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 на довжині хвилі 407 нм. Кінетичні залежності описували рівнянням:

$$D/D_0 = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t}, \quad (5.1)$$

де D_0, D - поглинання світла цитохромом С в буфері і в суспензії ліпосом відповідно, A_1, A_2 - амплітуди кінетичних 1 і 2 фаз, відповідно; k_1, k_2 - кінетичні константи. Кінетичні параметри визначали за допомогою методу найменших квадратів.

Абсорбція кривих зв'язування цитохрому С з модельними мембранами різного фосфоліпідного складу реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 на довжині хвилі 407 нм, в інтервалі концентрацій цитохрому 0-1,2 мкм.

5.3 Лазерне опромінення препаратів модельних мембран

Лазерне опромінення здійснювалося He-Ne лазером $\lambda = 663$ нм, $P = 1$ мВт.

Щільність потужності лазерного випромінювання розраховували за формулою:

$$W = \frac{P}{S} = \frac{P}{\pi \cdot \frac{D^2}{4}} \left[\frac{\text{Вт}}{\text{м}^2} \right], \quad (5.2)$$

де S - площа, D - діаметр лазерного випромінювання.

При діаметрі пучка $D = 0,005$ м і потужності $P = 10^{-3}$ Вт, щільність потужності дорівнювала:

$$W = \frac{10^{-3}}{3,14 \cdot \frac{0,005^2}{4}} = 50,9 \left[\frac{\text{Вт}}{\text{м}^2} \right]. \quad (5.3)$$

Енергія лазерного опромінення обчислювалася за формулою:

$$E = W \cdot Q \cdot t = W \cdot \frac{\pi \cdot D^2}{4} \cdot t \text{ [Дж]}, \quad (5.4)$$

де Q і $D = 0,005$ м, площа і діаметр пробірки з досліджуваним речовиною, $W = 50,9 \left[\frac{\text{Вт}}{\text{м}^2} \right]$ - щільність потужності лазерного випромінювання; $t = 10$ хв. - час експозиції випромінювання. В даному випадку енергія випромінювання дорівнює:

$$E = 50,9 \cdot 3,14 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{600}{4} \approx 24 \text{ [Дж]} \quad (5.5)$$

5.4 Гамма-опромінення модельних біомембран

Опромінення гамма-радіацією суспензій модельних мембран здійснювали на ізотопній установці "Дослідник" / ^{60}Co / з потужністю джерела 5 Гр / хв. Опромінення здійснювали в кюветах з поліетилену з товщиною стінок 1 мм.

Комбіноване опромінення здійснювали за схемою: 10 хвилин експозиції лазерним випромінюванням потім опромінення іонізуючим гама-випромінюванням, поглинена доза становила 100, 200 Гр.

5.5 Статистична обробка результатів дослідження

Статистична обробка даних здійснювалася із застосуванням програмного пакету Аналіз даних MS Excel. Достовірність апроксимації (R) експериментальних даних відповідною функцією (5.1) складала не менше 0,9 (n=3-4).

6 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

6.1 Впливу лазерного випромінювання на модельні ліпідні мембрани та цитохром С

Досліджуваними матеріалами виступали ліпосоми різного ліпідного складу та цитохром С. Фосфоліпідхолін та цитохром С використовували у пропорціях 3 мл та 200 мкл відповідно. Після базового вимірювання (за відсутності кардіоліпіну), до матеріалу додавали концентрацію кардіоліпіну: 10%, 20%, 40% (за виключенням комбінованої дії лазера та іонізуючого випромінювання).

На графіках крапки відповідають отриманим даним про оптичну щільність цитохрому С, а лінії є лініями апроксимації за кінетичними параметрами відповідного виміру.

Спочатку розглянемо контрольні заміри зміни оптичної щільності цитохрому С при взаємодії з модельними мембранами різного ліпідного складу, що не зазнавали будь-якого опромінення (рис. 6.1).

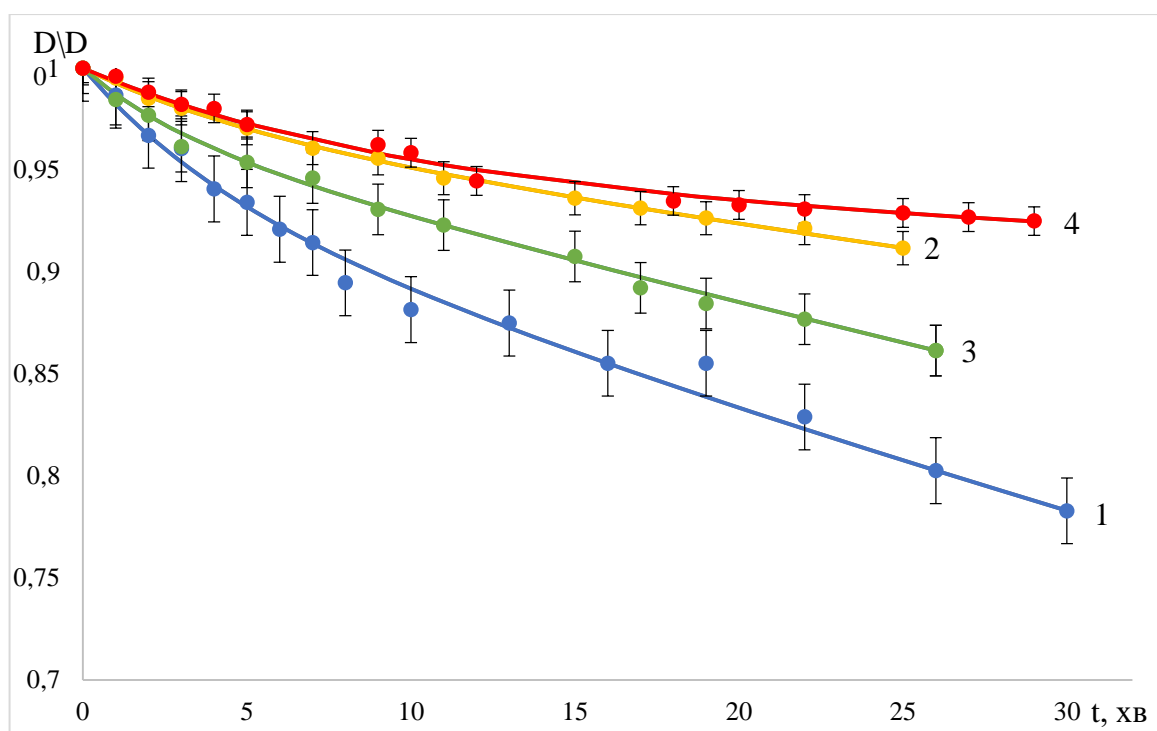


Рисунок 6.1 – Зменшення оптичної щільності Цитохрому С при взаємодії з контрольними модельними мембранами різного ліпідного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%; 4 – ФХ+КЛ40%. Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ

Рисунок 6.2 показує заміри зміни оптичної щільності цитохрому С при взаємодії з опроміненими He-Ne лазером модельними мембранами різного ліпідного складу (рис. 6.2).

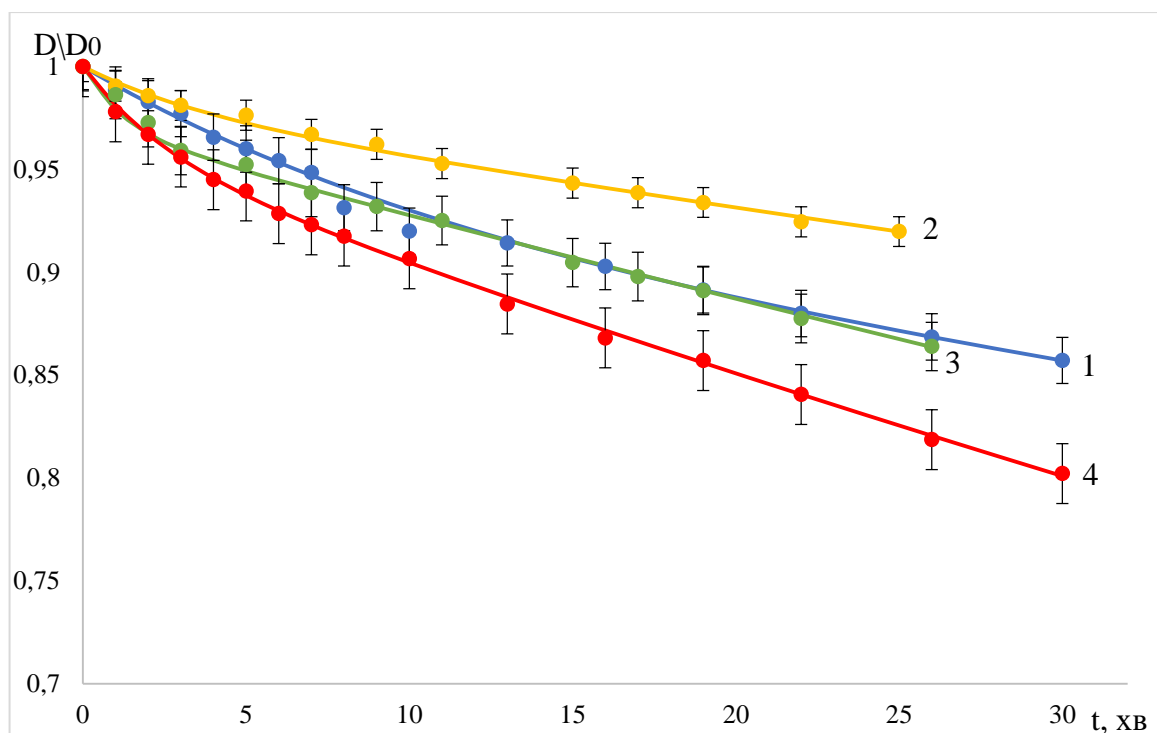


Рисунок 6.2 – Зменшення оптичної щільності Цитохрому С при взаємодії з опроміненими He-Ne лазером модельними мембранами різного ліпідного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%; 4 – ФХ+КЛ40%.

Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ

Далі розглянемо повністю обернену ситуацію, а саме зміну оптичної щільності опроміненого He-Ne лазером цитохрому С при взаємодії з модельними мембранами різного ліпідного складу (рис. 6.3).

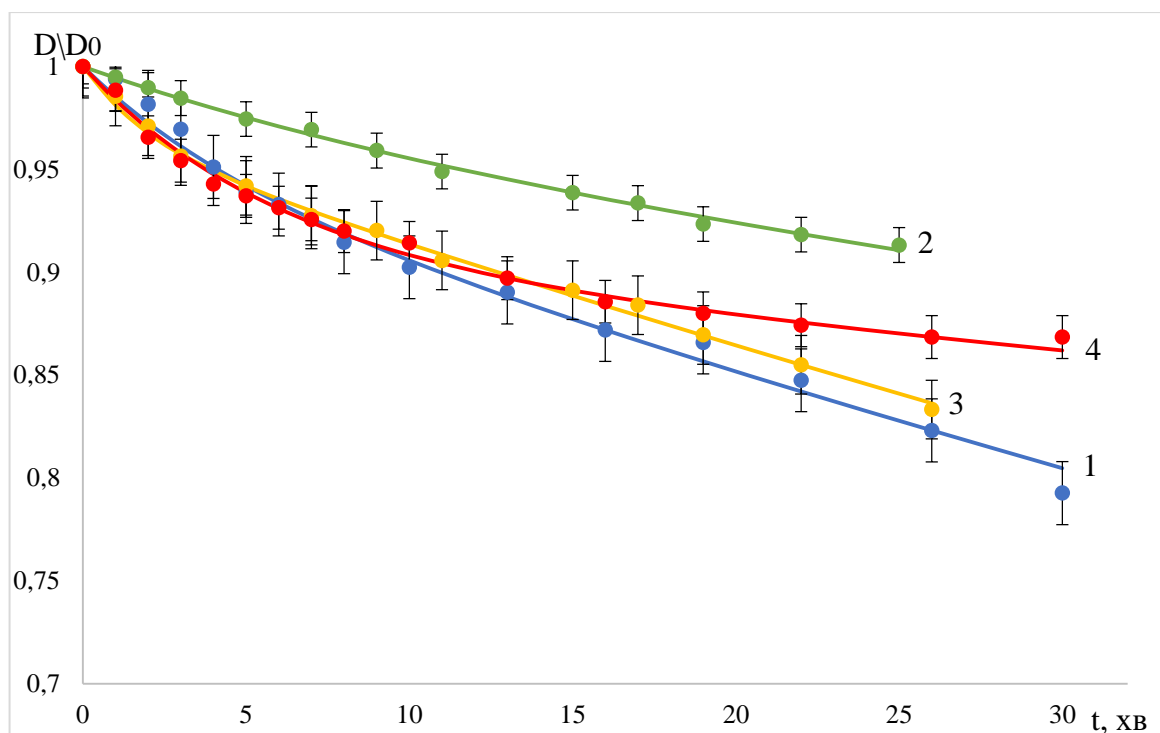


Рисунок 6.3 – Зменшення оптичної щільності опроміненого He-Ne лазером Цитохрому С при його взаємодії з модельними мембранами різного ліпідного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%; 4 – ФХ+КЛ40%.

Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ

Перейдемо до Рисунку 6.4 - зміни оптичної щільності опроміненого комплексу He-Ne лазером цитохрому С та модельних мембран різного ліпідного складу (рис. 6.4).

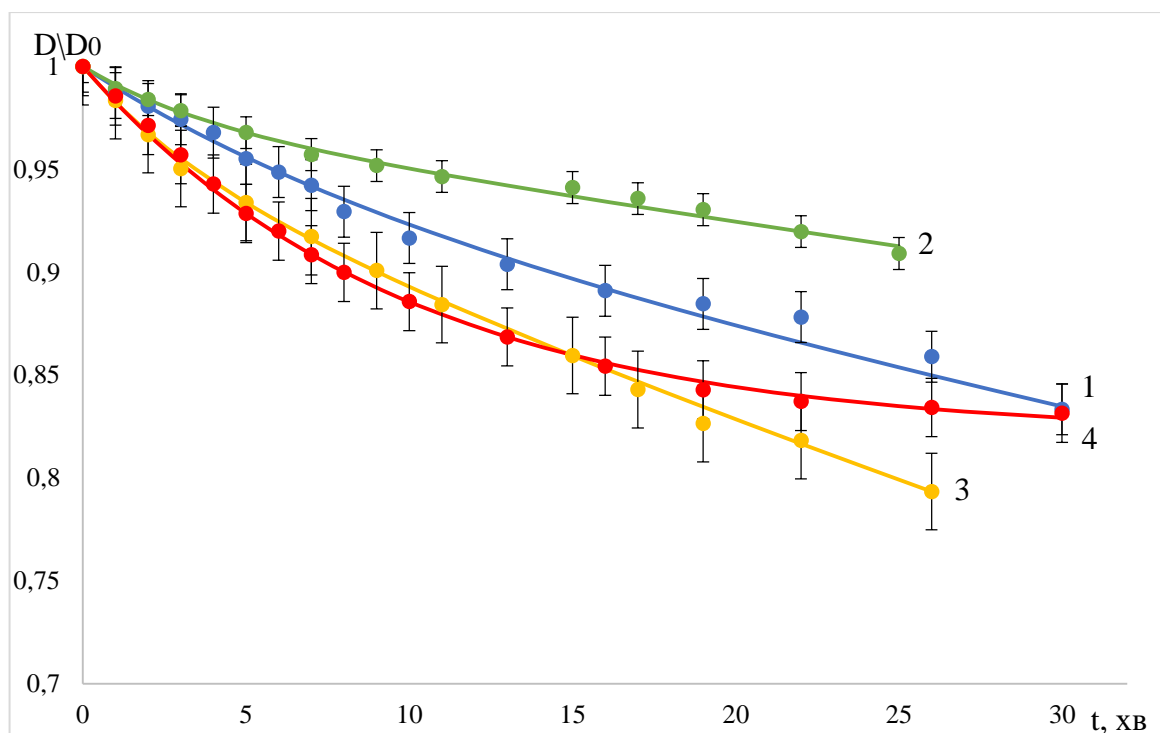


Рисунок 6.4 – Зменшення оптичної щільності опроміненого He-Ne лазером комплексу Цитохрому С та модельних мембран різного ліпідного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%; 4 – ФХ+КЛ40%. Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ

Отримані в роботі результати з впливу He-Ne-лазерного випромінювання на модельні мембрани дозволяють побачити певні фактичні закономірності мембранних ефектів, напряму пов'язані зі зменшення оптичної щільності цитохрому С.

По-перше, взаємодія цитохрому С з модельними мембранами різного ліпідного складу фактично завжди викликає зменшення оптичної щільності першого. По-друге, додавання різної концентрації кардіоліпіну за різних вхідних даних сприяє різній зміні стійкості цитохрому С до зменшення його ОЩ. По-третє, 20-ти відсоткова концентрація кардіоліпіну завжди менш ефективніша в підвищенні резистивності цитохрому С, ніж 10-ти відсоткова. Також варто зазначити, що зміна параметру оптичної щільності чисельно найрізкіше відбувається за перші 8-10 хвилин реакції, а потім сповільнюється.

Зведене порівняння кінетичних параметрів, за яких спостерігався найкращий рівень апроксимації, представлено в Таблиці 6.1, звідки видно наступне.

Таблиця 6.1 – Кінетичні параметри комплексотворення Цитохрому С з модельними ліпідними мембранами в контрольних зразках та після опромінення ліпосом He-Ne лазером (напівжирним шрифтом виділені параметри, що мають значну чисельну розбіжність з контрольними параметрами)

| | | A1 | k1 | A2 | k2 |
|---------------------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Контроль | ФХ | 0,9427 | 0,0062 | 0,0572 | 0,2308 |
| | ФХ+КЛ10% | 0,9704 | 0,0025 | 0,0296 | 0,1798 |
| | ФХ+КЛ20% | 0,9691 | 0,0045 | 0,0308 | 0,3127 |
| | ФХ+КЛ40% | 0,9415 | 0,0007 | 0,0584 | 0,1043 |
| Опромінені Ліпосоми | ФХ | 0,9238 | 0,0027 | 0,0762 | 0,0901 |
| | ФХ+КЛ10% | 0,9795 | 0,0025 | 0,0205 | 0,2715 |
| | ФХ+КЛ20% | 0,9702 | 0,0045 | 0,0298 | 0,7980 |
| | ФХ+КЛ40% | 0,9602 | 0,0060 | 0,0398 | 0,3864 |
| Опромінений цитохром С | ФХ | 0,9523 | 0,0056 | 0,0477 | 0,2166 |
| | ФХ+КЛ10% | 0,9661 | 0,0025 | 0,0339 | 0,0943 |
| | ФХ+КЛ20% | 0,9653 | 0,0055 | 0,0347 | 0,4894 |
| | ФХ+КЛ40% | 0,9076 | 0,0017 | 0,0924 | 0,1725 |
| Опромінений комплекс | ФХ | 0,9456 | 0,0042 | 0,0544 | 0,1183 |
| | ФХ+КЛ10% | 0,9735 | 0,0026 | 0,0265 | 0,2696 |
| | ФХ+КЛ20% | 0,9568 | 0,0072 | 0,0432 | 0,2743 |
| | ФХ+КЛ40% | 0,8208 | 0,0000 | 0,1792 | 0,1017 |

A1 (амплітуда першої кінетичної фази) базового випадку починає зростати на декілька сотих, а при 40% кардіоліпіну знову спадає у всіх

випадках. k_1 (кінетична константа першої фази) базового випадку навпаки починає спадати при 10% КЛ, коли знову підіймається при 20%, іноді (у випадках опромінених модельних мембран та опроміненого комплексу) навіть перевищуючи значення контрольного вимірювання.

A_2 (амплітуда другої кінетичної фази) базового випадку у наступних двох замірах - 10% та 20% кардіоліпіну - завжди спадає, але знову збільшується при 40% у всіх випадках, крім опромінених модельних мембран, перевищуючи контрольний. k_2 (кінетична константа другої фази) має дуже дисперсійний характер у перший трьох замірах (контрольному, опромінених модельних мембранах, опроміненого цитохрому С), проте більш-менш стабілізується у останньому, а саме у випадку опроміненого комплексу.

6.2 Комбінована дія лазерного та іонізуючого випромінювання на модельні ліпідні мембрани та цитохром С

Зміни кінетичних параметрів досліджуваних зразків у випадку комбінованої дії лазера та іонізуючого випромінювання реєстрували при двох поглинених дозах: 100 г та 200 г. Вплив такої комбінації застосовували окремо для на модельні мембрани різного ліпідного складу та на цитохром С.

Рисунок 6.5 показує заміри зміни оптичної щільності цитохрому С при взаємодії з опроміненими комбінованою дією He-Ne лазера та іонізуючого випромінювання (100 г поглиненої дози) модельними мембранами різного ліпідного складу(рис. 6.5).

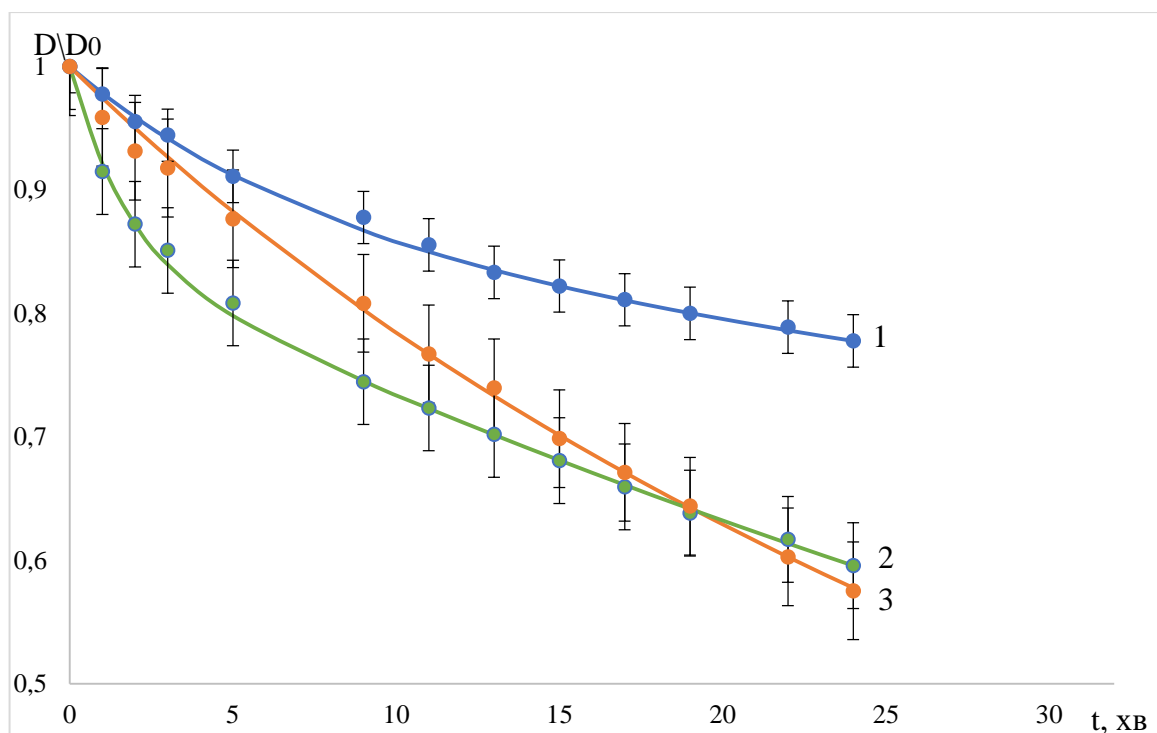


Рисунок 6.5 – Зменшення оптичної щільності Цитохрому С при взаємодії з опроміненими комбінованою дією He-Ne лазеру та іонізуючого випромінювання модельними мембранами різного ліпідного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%. Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ, поглинена доза іонізуючого випромінювання – 100 г

Рисунок 6.6 показує повністю обернену ситуацію, а саме зміну оптичної щільності опроміненого комбінованою дією He-Ne лазеру та іонізуючого випромінювання (100 г поглиненої дози) цитохрому С при взаємодії з модельними мембранами різного ліпідного складу (рис. 6.6).

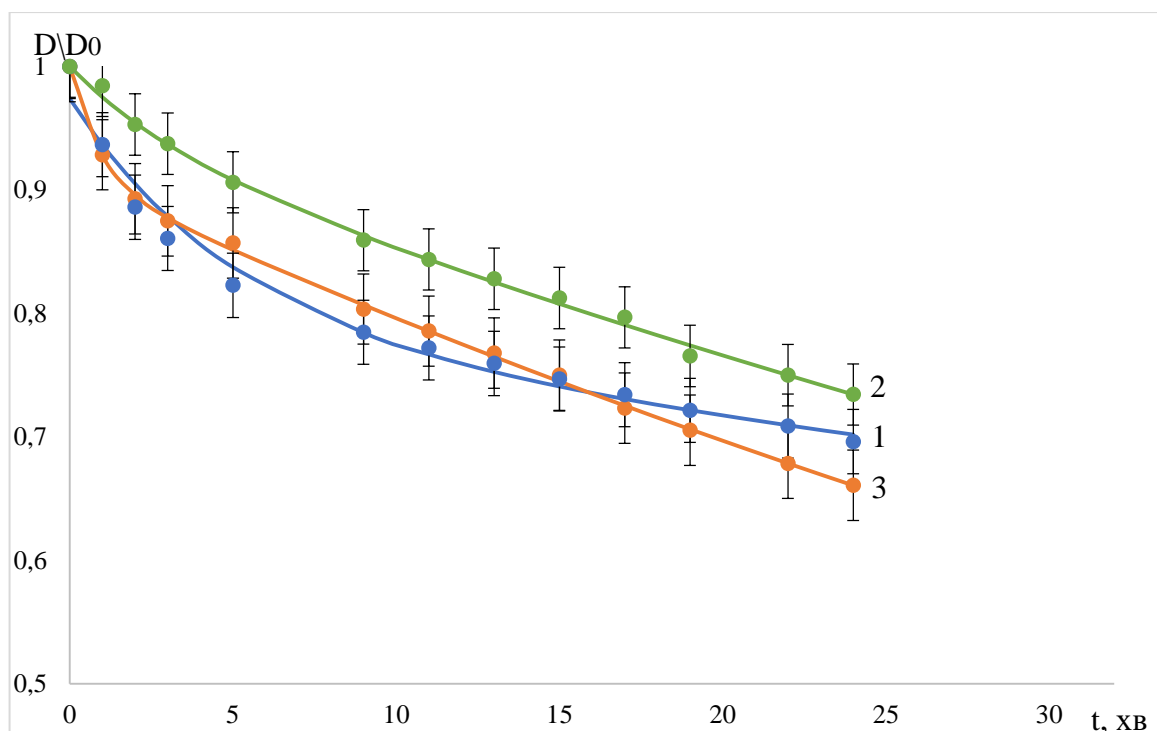


Рисунок 6.6 – Зменшення оптичної щільності опроміненого комбінованою дією He-Ne лазеру та іонізуючого випромінювання Цитохрому С при його взаємодії з модельними мембранами різного ліпідного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%. Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ, поглинена доза іонізуючого випромінювання – 100 г

Рисунок 6.7 показує заміри зміни оптичної щільності цитохрому С при взаємодії з опроміненими комбінованою дією He-Ne лазеру та іонізуючого випромінювання (200 г поглиненої дози) модельними мембранами різного ліпідного складу(рис. 6.7).

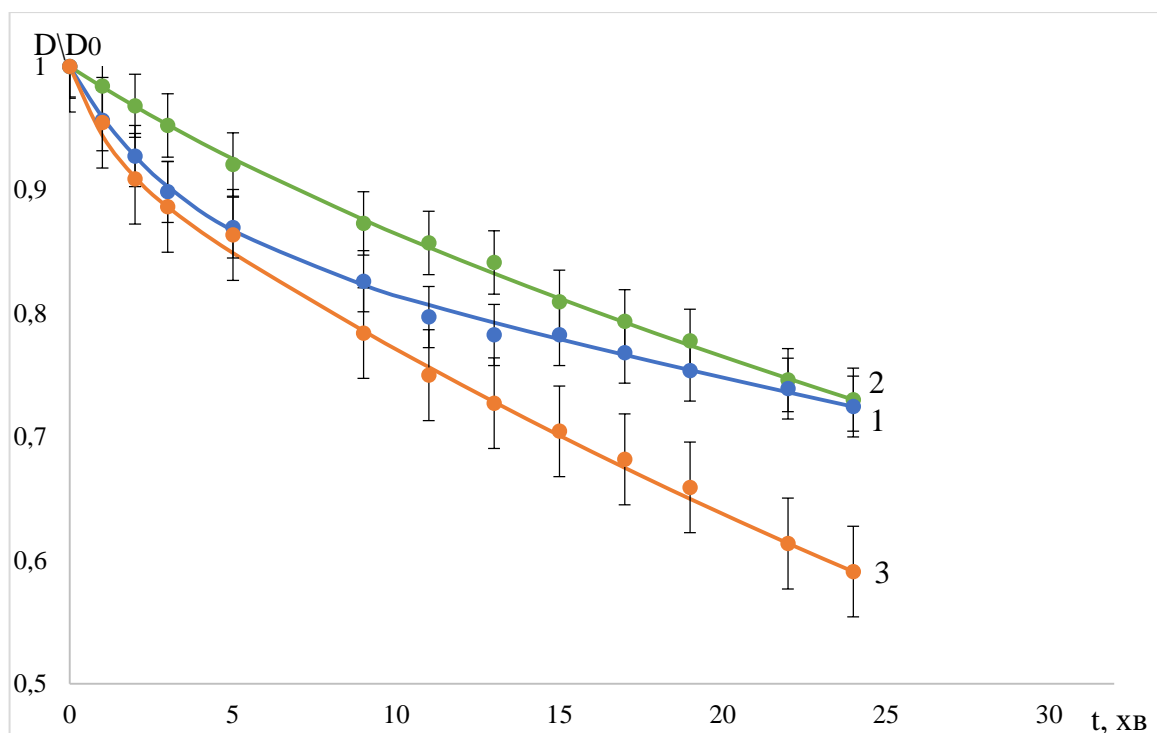


Рисунок 6.7 – Зменшення оптичної щільності Цитохрому С при взаємодії з опроміненими комбінованою дією He-Ne лазера та іонізуючого випромінювання модельними мембранами різного ліпідного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%. Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ, поглинена доза іонізуючого випромінювання – 200 г

Рисунок 6.8 показує повністю обернену ситуацію, а саме зміну оптичної щільності опроміненого комбінованою дією He-Ne лазера та іонізуючого випромінювання (200 г поглиненої дози) цитохрому С при взаємодії з модельними мембранами різного ліпідного складу (рис. 6.8).

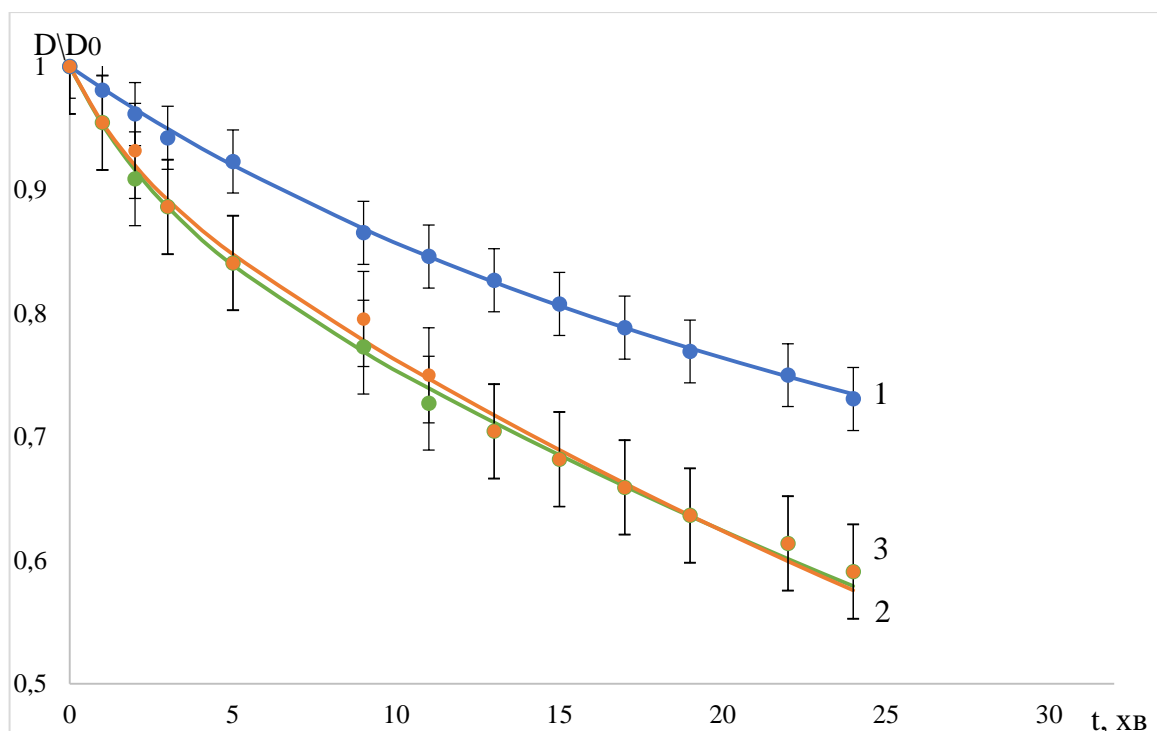


Рисунок 6.8 – Зменшення оптичної щільності опроміненого комбінованою дією He-Ne лазера та іонізуючого випромінювання Цитохрому С при його взаємодії з модельними мембранами різного ліпідного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%. Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ, поглинена доза іонізуючого випромінювання – 200 г

Зведене порівняння кінетичних параметрів, за яких спостерігався найкращий рівень апроксимації, представлено в Таблиці 6.2, звідки можна побачити наступне.

Таблиця 6.2 – Кінетичні параметри комплексоутворення Цитохрому С з модельними ліпідними мембранами в контрольних зразках та після опромінення ліпосом комбінацією He-Ne лазера та іонізуючого випромінювання (напівжирним шрифтом виділені параметри, що мають значну чисельну розбіжність з контрольними параметрами)

| | | A1 | k1 | A2 | k2 |
|----------|----------|--------|--------|--------|--------|
| Контроль | ФХ | 0,9427 | 0,0062 | 0,0572 | 0,2308 |
| | ФХ+КЛ10% | 0,9704 | 0,0025 | 0,0296 | 0,1798 |

| | | | | | |
|--------------------------------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | ФХ+КЛ20% | 0,9691 | 0,0045 | 0,0308 | 0,3127 |
| Опромінені | ФХ | 0,8562 | 0,0043 | 0,1437 | 0,1321 |
| Ліпосоми (100 г) | ФХ+КЛ10% | 0,9237 | 0,0201 | 0,0762 | 0,0955 |
| | ФХ+КЛ20% | 0,8512 | 0,0148 | 0,1487 | 0,5862 |
| Опромінений цитохром С (100 г) | ФХ | 0,8769 | 0,0079 | 0,1230 | 0,3226 |
| | ФХ+КЛ10% | 0,9570 | 0,0113 | 0,0429 | 0,1425 |
| | ФХ+КЛ20% | 0,9325 | 0,0190 | 0,0674 | 0,4932 |
| Опромінені Ліпосоми (200 г) | ФХ | 0,7852 | 0,0047 | 0,1888 | 0,1961 |
| | ФХ+КЛ10% | 0,9454 | 0,0105 | 0,0545 | 0,3172 |
| | ФХ+КЛ20% | 0,9098 | 0,0133 | 0,0902 | 1,0870 |
| Опромінений цитохром С (200 г) | ФХ | 0,8258 | 0,0066 | 0,1741 | 0,0723 |
| | ФХ+КЛ10% | 0,9063 | 0,0186 | 0,0936 | 0,3863 |
| | ФХ+КЛ20% | 0,9309 | 0,0199 | 0,0690 | 0,4966 |

Для опромінених ліпосом та цитохрому С (100 г) значення А1 (амплітуда першої кінетичної фази) нижчі за контрольні. Найбільший спад спостерігається для опромінених ліпосом (200 г), де амплітуда значно знижується. За присутності кардіоліпіну А1 зростає, досягаючи пікових значень при 10% КЛ. При 20% КЛ спостерігається спад амплітуди порівняно з 10%, однак у випадку опроміненого цитохрому С (200 г) значення залишається вищим. У всіх випадках, окрім базових опромінених ліпосом та цитохрому С, де відбулися незначні зміни, спостерігається підвищення значення k_1 (кінетична константа першої фази), особливо за наявності 10% і 20% КЛ. Найвищі значення k_1 досягаються при 20% КЛ, зокрема для цитохрому С.

Значення А2 (амплітуда другої кінетичної фази) зростають у всіх опромінених зразках порівняно з контрольними. Особливо це помітно для базового випадку ліпосом (200 г). У присутності 10% та 20% КЛ значення амплітуди знижується, однак залишається вищим за контрольні параметри. k_2 (кінетична константа другої фази) має дуже дисперсійний характер у перший

трьох замірах (контрольному, опромінених модельних мембранах, опроміненого цитохрому С), проте більш-менш стабілізується у останньому, а саме у випадку опроміненого комплексу. Для опромінених ліпосом та цитохрому С (200 г) з 20% КЛ спостерігається суттєве зростання значень (до 1,0870 у випадку ліпосом), що вказує на значне прискорення другої фази за даних умов.

Узагальнюючи, можна побачити два найбільш примітних явища:

1) друга кінетична фаза (A_2 та k_2) зазнає значних змін, особливо для опромінених ліпосом (200 г), що свідчить про суттєвий вплив іонізуючого та лазерного опромінення на ці параметри.

2) кінетичні параметри для опроміненого цитохрому С (100 г) з 20% КЛ та для опроміненого цитохрому С (200 г) все ж з тими ж 20% КЛ мають зовсім незначні розбіжностей. Тобто навіть збільшивши дозу опромінення вдвічі в даному випадку це майже не спричинило ніяких критичних змін. Через що можна зробити заключення, що комбінована дія лазера та іонізуючого випромінення з 20% вмістом КЛ становить деякий опір вже опроміненій дозою зразку.

ВИСНОВКИ

Встановлено важливість молекулярних механізмів взаємодій між цитохромом С і модельними ліпідними мембранами, а також впливу різних фізичних чинників, таких як лазерне та іонізуюче випромінювання.

He-Ne лазерне випромінювання (632,8 нм) впливає на білок-ліпідні взаємодії в модельних клітинних системах ліпосом з різним ліпідним складом. Найбільший ефект досягається за наявності 40% кардіоліпіну у складі фосфатидилхолінових ліпосом, що відповідає моделі внутрішньої мітохондріальної мембрани. Цей ефект виявляється у перебудові як білкової частини цитохрому С, так і зв'язку гем-глобін. Той же самий з'являється при комбінованій дії He-Ne лазерного та іонізуючого випромінювання. Але ефект такої комбінації стає більш “потужнішим”.

Взаємодія опроміненого цитохрому с з ліпідним бішаром модельних мембран характеризується зміною параметрів комплексотворення. Спостерігається тенденція зростання кінетичних параметрів білок-ліпідних взаємодій за участі опроміненого цитохрому С у порівнянні з неопроміненим контролем. Формування білок-ліпідних комплексів за участі опроміненого цитохрому С і модельних мембран супроводжується конформаційними змінами як білкової частини, так і зв'язку гем-глобін.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Doktorova M., Heberle F. A., Eicher B., Standaert R. F., Katsaras J., and London E. (2017). The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(9), 1607-1618.
2. Pfeiffer C., Reichenbach T., Koppelstätter F., Schieber M., and Schneider M. F. (2016). Laser scanning confocal microscopy as a new approach for the characterization of liposomal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 94-104.
3. Bernal M. A., Andrés-Prieto F., Pérez-Laguna V., Blázquez-Castro A., Ortega I., Zapata F., and Pedreño M. (2019). Influence of gamma radiation on liposome membrane fluidity: A DSC and ESR study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 223, 104785.
4. Furt F., Simon-Plas F., Mongrand S., and Boutté Y. (2020). Lipids of the Plant Plasma Membrane. In *Annual Plant Reviews Online* (pp. 207-239). CRC Press.
5. El-Beyrouthy J, Freeman E. Characterizing the Structure and Interactions of Model Lipid Membranes Using Electrophysiology. *Membranes* (Basel). 2021 Apr 27;11(5):319. doi: 10.3390/membranes11050319. PMID: 33925756; PMCID: PMC8145864.
6. Khakbaz, P., Monje-Galvan, V., Zhuang, X., Klauda, J.B. (2019). Modeling Lipid Membranes. In: Geiger, O. (eds) *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8_52
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, New York.
8. Encyclopedia Pub. (n.d.). AI Marketing Automation: What You Need to Know. Encyclopedia. URL: <https://encyclopedia.pub/entry/2937>

9. Simons K, Vaz WL. (2004). Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 33:269–295.
10. Sackmann E. (1995). Supported membranes: scientific and practical applications. *Science*, 271(5245), 43-48.
11. Yeagle PL. (1989). *The structure of biological membranes*. CRC Press, Boca Raton, FL.
12. Pryor, W. A. Methods of detecting free radicals and free radical mediated pathology in environmental toxicology. In: Bhatnager R. S., editor. *Molecular basis of environmental toxicity*. Michigan: Ann Arbor Science Publishers Inc.; 1980:3-36.
13. Möhwald, H. (1995). *Chapter 4 - Phospholipid Monolayers*.
14. Freeman, E. (2021). Characterizing the Structure and Interactions of Model Lipid Membranes Using Electrophysiology. *Membranes*, 11(5), 319.
15. Yagi, K. *Lipid peroxides in biology and medicine*. New York: Academic Press Inc.; 1982.
16. Cullis, P. R.; de Kruijff, B.; Hope, J. M.; Verkleij, A. J.; Nayar, R.; Farren, S. B.; Tilcock, C. P. S.; Hadden, T. D.; Bally, M. B. Structural properties of lipids and their functional roles in biological membranes. In: Aloia R. C., editor. *Membrane fluidity in biology*, Vol. 1. New York: Academic Press; 1983:39-81.
17. URL:
https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Upload/Bogutska_statti/bioph_membr_2011.pdf
18. Cortese J.D., Voglino A.L., Hackenbrock C.R. Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome c // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – P. 6402–6409.
19. Englander, S. W., Mayne, L., & Krishna, M. M. G. (2007). Protein folding and misfolding: Mechanism and principles. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 40(4), 287-326.
20. Li, H., & Robertson, A. D. (2004). Cytochrome c: a structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(19-20), 2539-2549.

21. Allen, J. P., & Williams, J. C. (1998). Cytochrome c and c1 heme lyase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1367(1-3), 49-61.
22. Dey, A., & Jenney Jr, F. E. (2009). Resonance Raman studies of cytochromes. *Methods in Enzymology*, 456, 43-65.
23. Iverson, T. M., & Gray, H. B. (2001). Electron transfer in proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 214-220.
24. Salerno, J. C., & Tollin, G. (1981). Redox properties of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 670(3), 317-333.
25. Lin, Y. H., & Wang, Y. M. (2017). Role of cyclin E in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 66(4), 735-747.
26. Pettigrew, G. W., & Moore, G. R. (1987). *Cytochromes c: biological aspects*. Springer Science & Business Media.
27. Brausemann, A., Zhang, L., Ilcu, L. *et al.* Architecture of the membrane-bound cytochrome c heme lyase CcmF. *Nat Chem Biol* 17, 800–805 (2021).
28. Kagan, V. E., & Bayir, H. (2000). Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 211-221.
29. Lewis R.N.A., McElhaney R.N. The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1788. – P. 2069-2079.
30. Rytömaa M., Kinnunen P.K.J. Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 1770–1774.
31. Yang, C., Liu, Y., Zhao, X., & Wang, Y. (2019). Role of Importin-4 in the modulation of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuropharmacology*, 155, 18-25.
32. Guan, J., & Mishur, R. J. (2019). Cytochrome c oxidase in the spotlight: making a good enzyme in the post-genomic era. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(11), 957-972.

33. Kagan, V. E., & Tyurin, V. A. (2003). The role of cytochrome c oxidase and cardiolipin in the mechanism of mitochondrial cell death. *Journal of Experimental Biology*, 206(15), 2315-2329.
34. Chow RT, Johnson MI, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. *The Lancet*. 2009; 374(9705): 1897 – 908.
35. Hegedüs B, Viharos L, Gervain M, Gálfi M. The Effect of Low-Level Laser in Knee Osteoarthritis: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(4): 577–84.
36. Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. *PM&R*. 2010; 2(12 Suppl 2): 292–305.
37. Ivandic BT, Ivandic T. Low-Level Laser Therapy Improves Visual Acuity in Adolescent and Adult Patients with Amblyopia. *Photomed Laser Surg*. 2012; 11: 167–71.
38. Mahram M, Rajabi M. Treatment of Lymphedema Praecox through Low Level Laser Therapy (LLLT). *J Res Med Sci*. 2011; 16(6): 848–51.
39. Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NH, Silva CA, Martins MD, Bussadori SK, et al. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. *Indian J Exp Biol*. 2011; 49(6): 423–8.
40. Wu Q, Xuan W, Ando T, Xu T, Huang L, Huang YY, Dai T, Dhital S, et al. Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths. *Lasers Surg Med*. 2012; 24: 218–26.
41. Pagnutti S. Scientific Report MLS Therapy. Cutting Edge Laser Technology Press. Italy, 2004; 5–23.
42. Mognato M, Squizzato F, Facchin F, Zaghetto L, Corti L. Cell growth modulation of human cells irradiated in vitro with low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2004; 22(6): 523–6.

43. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009; 7(4): 358–83.
44. Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg*. 2008; 26: 323–8.
45. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci*. 2009; 16: 4–14.
46. Freitinger–Skalicka Z, Navratil L, Zolzer F, Hon Z. The Assessments of the Intracellular Antioxidant Protection of the Organism after LLLT Irradiation. *AIP Conference Proceedings* 2009; 1142(1): 87–91.
47. Dremza IK, Lapshina EA, Kujawa J, Zavodnik IB. Oxygen-related processes in red blood cells exposed to tert-butyl hydroperoxide. *Redox Report*. 2006; 11(4): 185–92.
48. Wade ZS, Barrett DW, Davis RE, Nguyen A, Venkat S, Gonzalez-Lima F. Histochemical mapping of the duration of action of photobiomodulation on cytochrome c oxidase in the rat brain.
49. El-Toni, A. M., Habila, M. A., Labis, J. P., ALOthman, Z. A., Alhoshan, M., Elzatahry, A. A., & Zhang, F. (2016). Design, synthesis and applications of core–shell, hollow core, and nanorattle multifunctional nanostructures. *Nanoscale*, 8(5), 2510-2531.
50. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MAC, Bjordal JM, Alves LP, et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B*. 2007; 89: 50–5.
51. Gavish L, Perez L, Gertz SD. Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg Med*. 2006; 38: 779–86.
52. Smith, J. D., & Morgan, C. G. (2001). Laser-induced modification of lipid bilayer membranes for the study of ion channels. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(5-6), 337-344.

53. Vighi, E., et al. (2019). Lipid peroxidation in biomembranes: A fluorescent method for the evaluation of the action of polyphenols. *Methods in Molecular Biology*, 1930, 219-230.
54. Liu, H., et al. (2016). Optical manipulation of lipid bilayer membranes using a supercontinuum laser beam. *Optics Express*, 24(9), 9298-9306.
55. Husakou, A., & Herrmann, J. (2009). Supercontinuum generation of higher-order solitons by fission in photonic crystal fibers. *Physical Review Letters*, 87(20), 203901.
56. Quinn, A. S., et al. (2009). High-speed, cell-compatible, all-optical manipulation of membrane curvature. *Optics Express*, 17(25), 23129-23143.
57. Neuman, K. C., & Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature Methods*, 5(6), 491-505.
58. Hochstrasser, R. M., & Mourant, J. R. (1998). Picosecond absorption spectroscopy of cytochrome c folding using a range of excitation wavelengths. *Journal of Physical Chemistry B*, 102(19), 3722-3729.
59. Bizzarri, A. R., Cannistraro, S., & Satriano, C. (2001). Cytochrome c oxidase: structure, function, and laser photolysis investigations. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 1(4), 169-177.
60. Bartels, F. W., et al. (2004). Microscopic acoustic and cavitation behavior of the femtosecond optical breakdown process in water. *Journal of the Optical Society of America B*, 21(9), 1773-1781.
61. Marcus, R. A. (2003). *Electron transfer reactions in chemistry: theory and experiment* (Vol. 47). Springer Science & Business Media.
62. Gray, H. B., & Winkler, J. R. (2005). Electron transfer in proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 295-345.
63. Avci, P., Gupta, A., Sadasivam, M., Vecchio, D., Pam, Z., Pam, N., & Hamblin, M. R. (2013). Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 32(1), 41–52.

64. Zaytsman, A., et al. (2011). Resonance Raman studies of the active site architecture in cytochrome c oxidase and its interaction with nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(4), 431-437.
65. Wardman, P. (2007). Chemical radioprotection of DNA: free radical scavenging. *European Journal of Cancer*, 43(15), 2369-2378.
66. Kim, W., Lee, S., Seo, D., Kim, D., Kim, K., Kim, E., Kang, J., Seong, K. M., Youn, H., & Youn, B. (2019). Cellular stress responses in radiotherapy.
67. Caracciolo, G. (2015). Liposome-protein corona in a physiological environment: challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. *Nanomedicine*, 11(3), 543-557.
68. He, C., & Yin, L. (2013). A review of novel strategies of oxygen-independent and hypoxia-activated prodrugs for tumor-targeted therapy. *Journal of Drug Targeting*, 21(4), 277-292.
69. Khan, D. R., & Ahmed, M. (2019). Understanding and exploiting nanomaterial–protein corona. *Current Pharmaceutical Design*, 25(37), 3909-3925.