

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

Факультет радіофізики біологічної електроніки та комп'ютерних систем

Кафедра молекулярної та медичної біофізики

До захисту допущено

Кафедрою молекулярної та медичної біофізики протокол № _____ від _____

завідувач кафедри _____
(підпис)

Володимир БЕРЕСТ. _____
(ім'я, прізвище)

« ____ » _____ 2025 р.

Кваліфікаційна робота

здобувача другого (магістерського) рівня вищої освіти

Особливості білок-ліпідних взаємодій в присутності селенвмісних сполук

Спеціальність 105 Прикладна фізика та наноматеріали

Освітня програма Біофізика

Виконавець _____ Володимир РАБАДА. _____
(підпис) (ім'я, прізвище)

Науковий керівник _____ Лариса СІЧЕВСЬКА. _____
(підпис) (ім'я, прізвище)

Зміст

ВСТУП.....	5
1 Модельні білок-ліпідні комплекси. Особливості взаємодії.....	6
1.1 Структура модельних біологічних мембран.....	6
1.2 Фізико-хімічні особливості гемоглобіну.....	9
1.3 Взаємодія гемоглобіну з ліпосомальними мембранами.....	11
1.4 Особливості взаємодії Se-вмісних гетероциклів з модельними мембранами.....	12
1.4.1 Біологічна активність Se-вмісних макромолекул.....	12
1.4.2 Фізико-хімічні властивості Se-органічних гетероциклів.....	14
1.4.3 Взаємодія Se-вмісних комплексів з біомембранами.....	15
2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	18
2.1 Отримання ліпосом методом етанольної інжекції.....	18
2.2 Гетероциклічні сполуки.....	19
2.3 Фізичні основи методу абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії.....	20
2.4 Дослідження структури модельних ліпідних мембран методом флуоресцентних зондів.....	22
2.5 Кінетика конформаційних змін гемоглобіну в комплексі з ліпосомальними мембранами різного складу в присутності селеновмісних комплексів.....	23
3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	24
Висновки.....	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	36

АНОТАЦІЯ

Рабада В.О. Особливості білок-ліпідних взаємодій в присутності селеновмісних сполук.

Дипломна робота зі спеціальності 105 – прикладна фізика та наноматеріали – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2025. 36 сторінка, 20 малюнків, 4 таблиць, 29 джерел, 10 слайдів.

Проведено комплексне дослідження особливостей взаємодії 5-суано-2-methyl-6-(methylselanyl)-4-(thiophen 2 yl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxamide з модельними білок ліпідними системами. Вивчено спектральні характеристики комплексу Se при його взаємодії з ліпосомами різного фосфоліпідного складу.

Встановлено, що при взаємодії з ліпідними мембранами речовина, що досліджується, перерозподіляється в гідрофобну область бішару, що може впливати на білок-ліпідні взаємодії модельних мембран. Методом абсорбційної спектрофотометрії досліджено кінетику спектральних змін молекул гемоглобіну в смузї Core за різних умов утворення білок-ліпідних комплексів.

Зроблено спробу оцінити зміну кінетичних параметрів процесу комплексоутворення в присутності різних концентрацій Se-вмісних сполук, а також часу інкубації досліджуваних комплексів у середовищі модельних мембран.

Встановлено зміни структури гемової групи білка при взаємодії з ліпідним бішаром ліпосом як в умовах наростаючої концентрації Se-з'єднань, що містять, так і в умовах різної тимчасової інкубації комплексів в середовищі модельних мембран.

Ключові слова: біомембрани, гемоглобін, ліпосоми, селеновмісні комплекси.

ABSTRACT

Rabada V.O. Features of protein-lipid interactions in the presence of selenium-containing compounds.

Diploma paper in specialty 105 – applied physics and nanomaterials – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2025.

36 pages, 20 figures, 4 tables, 29 sources, 8 - 10 slides.

A comprehensive study of the features of the interaction of 5-cyano-2-methyl-6-(methylselanyl)-4-(thiophen 2 yl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxamide with model protein lipid systems was conducted. The spectral characteristics of the Se complex during its interaction with liposomes of different phospholipid composition were studied.

It was established that when interacting with lipid membranes, the substance under study is redistributed into the hydrophobic region of the bilayer, which can affect the protein-lipid interactions of model membranes. The kinetics of spectral changes of hemoglobin molecules in the Soret band under different conditions of protein-lipid complexes formation were studied by absorption spectrophotometry.

An attempt was made to evaluate the change in the kinetic parameters of the complexation process in the presence of different concentrations of Se-containing compounds, as well as the incubation time of the studied complexes in the environment of model membranes.

Changes in the structure of the heme group of the protein during interaction with the lipid bilayer of liposomes were established both under conditions of increasing concentration of Se-containing compounds and under conditions of different time incubation of complexes in the environment of model membranes.

Keywords: biomembranes, hemoglobin, liposomes, selenium-containing complexes.

ВСТУП

Біологічні мембрани є структурною основою багатьох функціональних систем клітини. У відповідності з сучасними уявленнями мембрана – це кооперативна система, яка стабілізується впорядкованими міжмолекулярними нековалентними взаємодіями. Вона виступає головним регулятором фундаментальних фізіологічних процесів: метаболізму, транспорту речовин, збереження та перетворення енергії. Структурні перебудови мембран обумовлюють ефективні механізми специфічної регуляції клітинних процесів.

Ліпосомальні біомембрани є зручною моделлю дослідження взаємодії біологічно активних речовин з ліпідним бішаром.

В даний час представляє великий інтерес дослідження взаємодії селенвмісних сполук з біологічними мембранами. Селен - есенціальний елемент, який входить до складу деяких білків, в першу чергу глутатіонпероксидази та інших пероксидаз. Селен активний імуномодулятор, бере участь в синтезі тироїдних гормонів, володіє антиоксидантними властивостями, тим самим захищаючи мембранні структури клітини і органели від ПОЛ більш ефективно, ніж вітаміни Е, С, А, β -каротин. Селен - важливий фактор біологічного захисту ендотелію судин, ліпопротеїнів низької щільності, ДНК, хромосом, виключно важливий спосіб попередження ішемічної хвороби серця і гальмування розвитку атеросклерозу, утворення злоякісних пухлин.

В зв'язку з цим представляє інтерес досліджувати характер взаємодії селенвмісних комплексів з модельними мембранами різного складу.

1 Модельні білок-ліпідні комплекси. Особливості взаємодії

1.1 Структура модельних біологічних мембран

Згідно з рідинно-мозаїчною моделлю структури мембрани, запропонованою Сінгером і Ніколсоном у 1972 році, біологічна мембрана являє собою два паралельні шари ліпідів (ліпідний бішар). Ліпідні молекули утворюють у клітині бімолекулярні шари: гідрофобні частини їх повернуті далі від водного оточення, тобто одна до одної, і утримуються разом сильними гідрофобними взаємодіями та слабкими силами Лондона-Ван-дер-Ваальса (рис. 1.1А). Таким чином, мембрани на обох зовнішніх поверхнях гідрофільні, а всередині – гідрофобні.

При фізіологічних температурах мембрани знаходяться в рідкокристалічному стані: вуглеводневі залишки обертаються вздовж своєї поздовжньої осі та дифундують у площині шару, рідше перескакують з одного шару в інший, не порушуючи міцних гідрофобних зв'язків. У мембрану вкраплені різні мембранні білки. Деякі з них знаходяться на зовнішній або на внутрішній поверхні ліпідної частини мембрани; інші пронизують всю товщу мембрани наскрізь. Мембрани напівпроникні; вони мають найдрібніші пори, через які дифундують вода та інші невеликі гідрофільні молекули. Для цього використовуються внутрішні гідрофільні області інтегральних мембранних білків або отвори між дотичними інтегральними білками (тунельні білки) (рис. 1.1Б)[1,2].

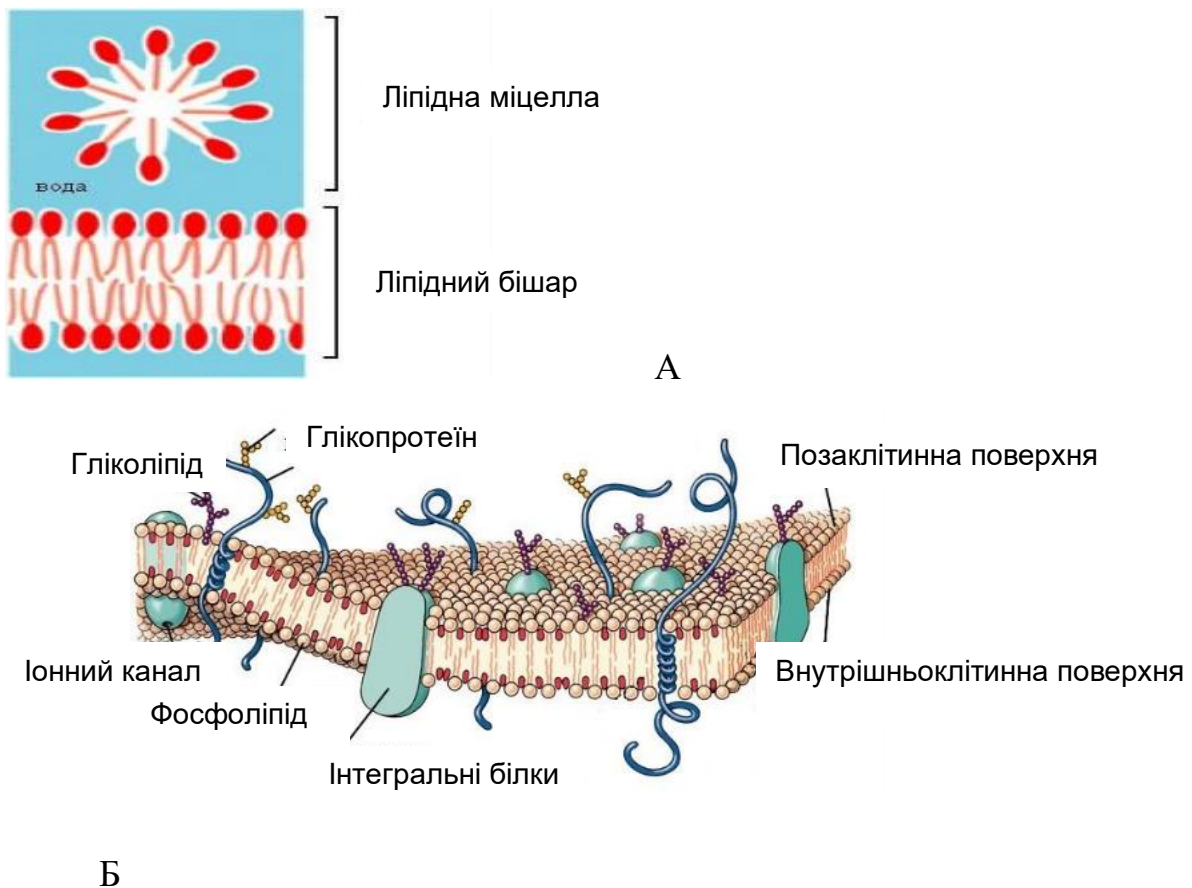


Рисунок 1.1 - (А) У водному середовищі ліпіди формують міцели або бішар
(Б) Сучасна модель структури плазматичної мембрани

Усі біологічні мембрани містять ліпіди, білки та вуглеводи. Основними компонентами мембран є білки та ліпіди, а на частку вуглеводів може припадати близько 10% маси мембран. При цьому вуглеводи завжди входять до складу глікопротеїнів або гліколіпідів.

Крім того, ще одним хімічним компонентом біологічних мембран є вода, молекули якої міцно зв'язуються з поверхнею мембран і утворюють шар так званої мембранозв'язаної води. Ліпосоми (від грец. *lipos* - жир і *soma* - тіло) – штучно одержувані частинки, утворені одним або кількома концентричними замкнутими ліпідними бішарами, аналогічними за будовою з ліпідною компонентою біологічних мембран. У водному розчині ліпідні молекули, при концентрації, більшій за певне значення, здатні самовільно збиратися в агрегати[3].

Загальний принцип побудови всіх ліпідних агрегатів у воді полягає в тому, що полярні головки знаходяться в контакті з водною фазою, тоді як вуглеводневі ланцюги захищені від води екраном, що складається з полярних головок. Якщо при цьому вуглеводневі ланцюги утворюють суцільну гідрофобну серцевину (ядро), то такі структури називають міцелами. Якщо ж всередині ліпідного агрегату є внутрішній водний простір, то говорять про ліпідні везикули або ліпосоми. Така організація дозволяє використовувати ліпосоми для дослідження бар'єрних властивостей ліпідного бішару[4].

Основним будівельним матеріалом для отримання ліпосом є гліцерофосфоліпіди та сфінголіпіди. Стан ліпідних агрегатів у воді залежить як від структури їх полярних головок і вуглеводневих ланцюгів, так і від концентрації ліпиду. При великому надлишку води фосфоліпіди з дуже короткими ланцюгами (менше 4 вуглецевих атомів) існують у вигляді мономерів. При середній довжині ланцюгів (6-8 вуглецевих атомів) ліпіди утворюють переважно міцели, а ліпіди з довгими ланцюгами агрегуються з утворенням макроскопічних, коаксіальних циліндричних структур.

Ці частинки можуть бути багат шаровими, мультиламелярними везикулами (МЛВ), що складаються з декількох десятків, а то й сотень ліпідних бішарів, розділених водним проміжком і мають досить великі розміри (до 50 мкм). Але також існують малі моноламелярні везикули (ММВ), утворені одним ліпідним бішаром.

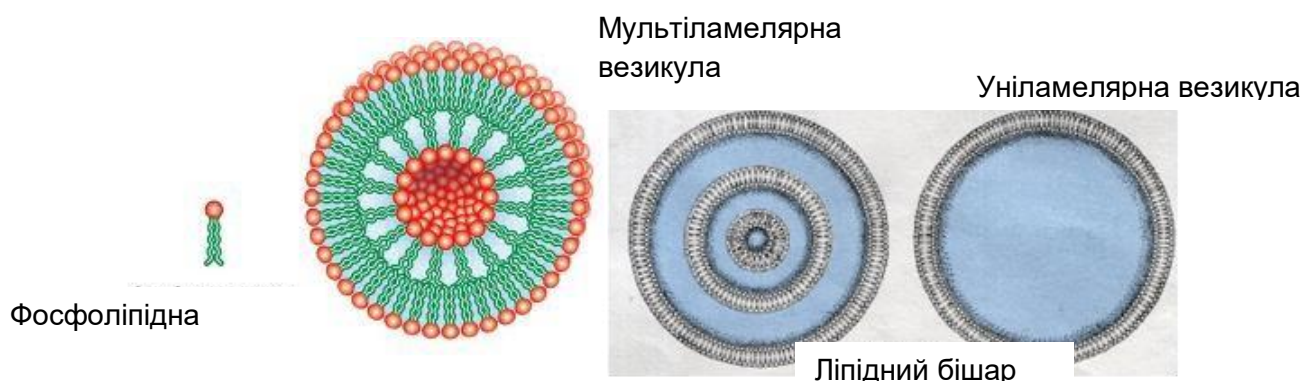


Рисунок 1.2. Будова ліпосом. Мультиламелярні та моноламелярна везикули

Властивості ліпосом та їх поведінка визначаються наявністю у них замкнутої мембранної оболонки. Незважаючи на молекулярну товщину (близько 4 нм), ліпідний бішар відрізняється механічною міцністю та гнучкістю. В рідкокристалічному стані бішару його компоненти мають високу молекулярну рухливість, в цілому мембрана поводить себе як досить рідка, текуча фаза. Завдяки цьому ліпосоми зберігають цілісність при різних пошкоджуючих впливах[5]. Ліпосоми добре проникливі для води і при зміні сольового складу у зовнішньому середовищі можуть набухати або стискатися у відповідь на зміну осмотичного тиску ззовні. Для практичного застосування ліпосом важлива їх здатність включати в себе і утримувати речовини різної природи. Включення в ліпосоми різних функціонально важливих мембранних білків дозволяє отримати так звані протеоліпосоми, в яких частина ліпиду пов'язана з білками в білок-ліпідних комплексах. Завдяки такій реконструкції мембрани з її основних компонентів стало можливим отримання комплексів інтегральних білків, що зберігають свої ферментативні та рецепторні функції[4].

Ліпосоми використовують перш за все як модельні системи, в які можна вбудовувати різні білки з метою утворення білок-ліпідних комплексів. Як відомо, білки, що мають у своєму складі метали змінної валентності, є ефективними каталізаторами окислювально-відновних процесів у ліпідній фазі мембрани. До числа таких білків, зокрема, відноситься і гемоглобін.

1.2 Фізико-хімічні особливості гемоглобіну

Гемоглобін – білок ссавців, що становить близько 30 % маси еритроцитів [6] і виконує функцію переносника кисню від легень до органів і тканин (Рис. 1.3.А). Білок має масу близько 64000 кДа і складається з чотирьох субодиниць – двох α і двох β , об'єднаних в $\alpha\beta$ -димери. α -ланцюг містить 141 амінокислотний залишок, а β -ланцюг – 146. Всі чотири субодиниці мають однакову третинну структуру і компактно упаковані в сферичну глобулу розміром $6,4 \times 5,5 \times 5,0$ нм.

Більшість гідрофобних залишків, які практично повністю складають первинну структуру гемоглобіну, знаходяться на поверхні молекули.

Разом субодиниці утримуються за рахунок гідрофобних і, як показано в модельному дослідженні Фейтельсона [7], іонних зв'язків, причому контакти α - β набагато міцніші за контакти α - α і β - β .

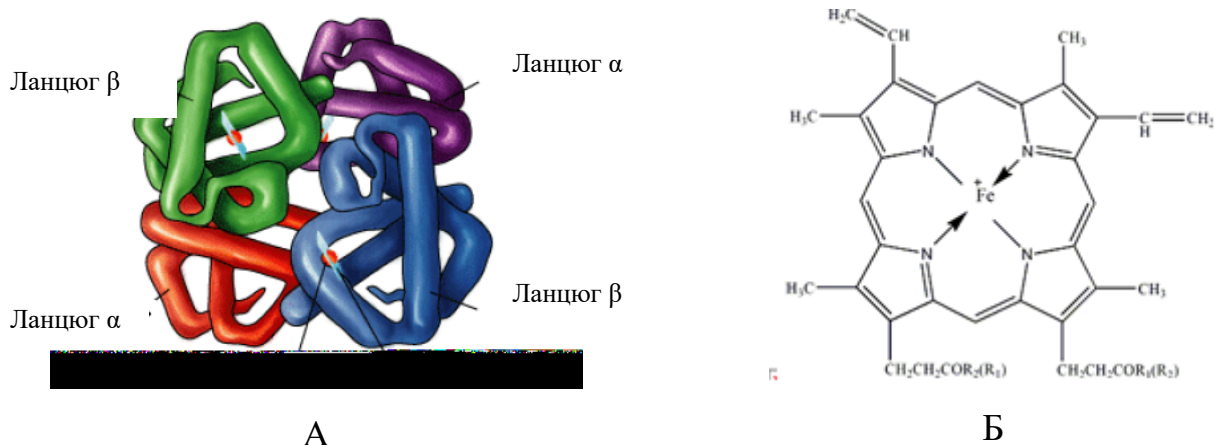


Рисунок 1.3 - (А) Молекула гемоглобіну. (Б) Гем

Кожна частина гемоглобіну містить на поверхні в гідрофобній кишені небілкову компоненту гем – комплекс заліза з протопорфірином (рис. 1.3.Б). Ця простетична група відповідає за функцію перенесення кисню [8].

Атом заліза може утворювати шість координаційних зв'язків. Чотири з них спрямовані до атомів азоту пірольних кілець, а дві – перпендикулярно до площини порфіринового кільця по обидва його боки. Оборотноє приєднання кисню забезпечується можливістю утворювати міцні 5-й і 6-й зв'язки і перенести електрон не від атома заліза (що призводить до втрати здатності гемоглобіну переносити кисень), а від гістидину.

1.3 Взаємодія гемоглобіну з ліпосомальними мембранами

Гемоглобін в організмі ссавців знаходиться всередині еритроцитів. Якщо в ранніх дослідженнях гемоглобіну (Шаклай 1975 рік [9]) йшлося лише про електростатичну природу взаємодії гемоглобіну з мембраною, то в оглядових роботах про білок-ліпідні взаємодії Папаханджопоулса [10] і Кімельберга [11] гемоглобін відносять до водорозчинних білків, які зв'язуються з бішаром за допомогою гідрофобних взаємодій, що сильно залежать від електростатичних початкових зв'язків. Отже, можна сказати, що комплексоутворення гемоглобіну з ліпідним бішаром складний процес, що включає цілий ряд перетворень як білка, так і бішару. Найбільш повно дані взаємодії описані в роботах Сцзебені [12] і Швіро [13].

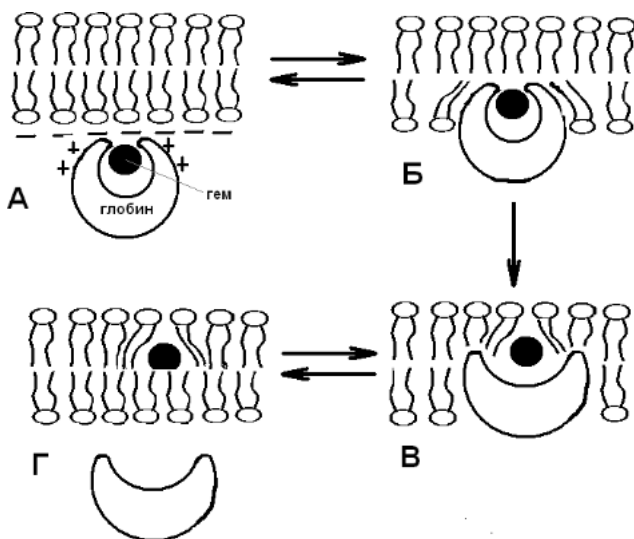


Рисунок 1.4 - Взаємодія гемоглобіну з ліпідним бішаром.

Початкове комплексоутворення білка з мембраною відбувається за рахунок електростатичних взаємодій (рис. 1.4.А). За цим процесом слідує проникнення білка в бішар за рахунок гідрофобних взаємодій (рис. 1.4.Б). Далі слідує конформаційні зміни гемоглобіну, зміщення гема відносно гідрофобної кишені субодиниць (рис. 1.4.В). При зв'язуванні з бішаром на поверхні білка експонується велика кількість гідрофобних ділянок, що сприяє проникненню його

в неполярну область мембрани[14]. На цьому етапі відзначається ініційована гемоглобіном дестабілізація біашру[15].

Відбувається зміна конформації полярних головок – орієнтації карбонільних і холінових диполів, що в свою чергу викликає збільшення поверхневого потенціалу мембрани [16]. Поверхнева активність гемоглобіну проявляється і в розрідженні полярних головок. Це призводить до збільшення вмісту води в області карбонільних груп [17] і до збільшення проникності для мембран.

Наступний процес – відділення гема від гемоглобіну (рис. 1.4.Г), окислення заліза і декон'югація порфіринового кільця. Ці процеси також залежать від стану гемоглобіну – в мутантному проявляються набагато яскравіше [18], і від ліпідного складу мембран. Гем при цьому розташовується в бішарі ближче до полярних головок, а метильні та вінільні залишки – в гідрофобній частині.

1.4 Особливості взаємодії Se-вмісних гетероциклів з модельними мембранами

1.4.1 Біологічна активність Se-вмісних макромолекул

Відомо, що цілий ряд патологічних процесів є наслідком вільно-радикального окислення ліпідів біологічних мембран, індукованого впливом зовнішніх факторів середовища (фармакологічні агенти, отрути, токсини, алергени, іонізуюче та УФ- випромінювання та ін.). Підвищена генерація активних форм кисню викликає пошкодження клітин і може сприяти розвитку атеросклерозу, інфаркту міокарда, інсульту, злоякісних процесів, бронхолегеневих і інших захворювань[19].

Одним з важливих антиоксидантів (АО) організму людини є ультрамікроелемент селен. Він входить до складу активного центру одного з найважливіших ферментів, що підтримують перекисний гомеостаз – глутатіонпероксидази. Селен стимулює перетворення метіоніну в цистеїн і синтез глутатіону, що також сприяє загальному збільшенню антиоксидантного потенціалу організму та детоксикації ліпопероксидів. Саме висока активність

селену як АО надає іонам і сполукам протипроменеві властивості, більш виражені, ніж у тіолових сполук.

Антиоксидантна активність селену лежить в основі його гепато- і кардіозахисної дії [20]. Селен захищає і білки від атаки пероксинітриту, що супроводжується нітруванням тирозину в їх складі. Слід зазначити, що селен подібно цинку на відміну від інших металів з перемінною валентністю поводить себе тільки як антиоксидант і майже ніколи як прооксидант.

Більша частина селену в тканинах тварин присутня у вигляді Se-Met і селеноцистеїну — Sec. Перший включається на місце метіоніну в різні білки, другий бере участь в утворенні активного центру цілого ряду селеновмісних білків (СБ) - глутатіонпероксидаз (GPX), йодтироніндейодиназ (ID) і селенопротеїну P (SeP). Se-Met не синтезується в організмі, не регулюється селеновим статусом тварини і може розглядатися як нерегульований запас селену. Sec — форма селену, відповідальна за біологічну активність мікроелемента, оскільки присутній в активному центрі всіх відомих на даний час СБ.

Група –SeH має більш високу електронно-донорну активність, ніж група –SH, за рахунок більш низького потенціалу іонізації і меншої енергії зв'язку(1). Тому сполуки з групою –SeH ефективніше, ніж тіолові, деактивують вільні радикали, пероксиди і електрофільні сполуки, в тому числі канцерогени, перешкоджаючи їх метаболічній активації. Саме висока активність селену як антиоксиданта надає іонам і сполукам протипроменеві властивості, більш виражені, ніж у тіолових сполук(7), сприяє захисту від токсичної дії кисню під тиском (4), від УФ- і гамма-опромінення.

Дослідження антиоксидантних властивостей селеноорганічних сполук показало зв'язок хімічної структури досліджуваних сполук з їх антиоксидантною активністю. Органічні сполуки селенопіран і селеноциклогексан містять фенільні радикали, здатні гідроксилуватися, з утворенням рухливого H⁺, який може зв'язуватися з вільними радикалами. Дія цих сполук порівнянна з відомими антиоксидантами, такими як вітаміни E і K, убіхінони, флавоноїди і т.д. Крім

цього, наявність протона у четвертого атома вуглецю в гетероциклі селенопірану підсилює його антиоксидантні властивості.

Селенопірилієві сполуки є ефективними протекторами мембран еритроцитів від процесів ПОЛ, індукованих солями важких металів. Сполуки селенопірану і селеноциклогексану викликали суттєві коливання біохімічних показників сироватки крові експериментальних тварин[21]. У всіх групах тварин, які отримували солі важких металів спільно з селеноорганічними сполуками, концентрація МДА, а також активність СОД і каталази еритроцитів не відрізнялися від контролю. У групах тварин, які на тлі отруєння солями важких металів не отримували селенопіролієві сполуки, спостерігалися суттєві зміни біохімічних показників сироватки крові в порівнянні з контролем. На підставі біохімічних досліджень крові експериментальних тварин показано, що найбільш ефективними протекторами серця, печінки, підшлункової залози і нирок при отруєнні солями важких металів є селенопіран і селенациклогексан. Авторами[21] було показано, що посилення захисної активності селеноорганічних сполук від солей важких металів відбувається в міру насичення селеновмісного гетероциклу.

1.4.2 Фізико-хімічні властивості Se-органічних гетероциклів

Селен є важливим мікроелементом для організму людини і ссавців. Незважаючи на високу токсичність багатьох сполук селену на основі його органічних похідних створено протипухлинні, протиракові та інші медичні препарати, а також біологічно активні речовини, що мають антивірусну, антимікробну, антиаритмічну та фунгіцидну активність[22]. Біологічна функція селену визначається його положенням у періодичній системі і тісно пов'язана з хімічними властивостями даного елемента та його сполук.

За будовою атома селен багато в чому подібний до сірки. Обидва елементи знаходяться в 4 групі періодичної системи Менделєєва і мають аналогічну будову зовнішніх електронних оболонок. Для селену та сірки характерна здатність змінювати склад і будову молекули зі зміною зовнішніх умов. Селен реагує з

фтором, хлором і бромом. З багатьма металами, в тому числі й лужними, селен утворює селеніди, з воднем - селеноводень [23]. З киснем селен утворює окисли (SeO_2 і SeO_3) [34,35]. У сполуках селен може бути негативно двовалентним і позитивно чотири- і шестивалентним.

В даний час синтезовано безліч органічних похідних селену але особливе місце серед них займають сполуки, що містять гетероцикли.

Синтезовані селеновмісні гетероцикли, що представляють собою комплекси з перенесенням заряду та іон-радикальні солі, мають властивості органічних металів. Катіонні селеновмісні комплекси на основі пірилію мають підвищену електроакцепторну здатність, що позначається на їх електрохімічних властивостях. Наявність внутрішньомолекулярного перенесення заряду в цих сполуках підтверджує характер електронних спектрів. Особливості розподілу електронної щільності гетероатома по кільцевій системі інших атомів у сполуках цього типу та кристалічної будови стимулюють переміщення не тільки електронів, але й іонів. Активна роль гетероатома в ароматичному кільці обумовлена наявністю у нього неподілених електронних пар.

Солі халькогенопірилію є типовими представниками органічних напівпровідників і можуть відноситися до комплексів з переносом заряду, які можуть відігравати роль як донорів, так і акцепторів електронів. З великої кількості синтезованих селеновмісних гетероциклів найбільшою біологічною активністю володіють п'ятичленні гетероцикли. Серед похідних сполук цього класу відомі сполуки, що володіють протимікробною, протівірусною, протипухлинною, спазмолітичною, протиалергічною активністю [24].

1.4.3 Взаємодія Se-вмісних комплексів з біомембранами

В даний час синтез селенорганічних гетероциклів та їх дослідження здійснюється з метою розробки нових ефективних засобів хіміотерапії раку. У ряді наукових публікацій представлені результати досліджень механізму антиканцерогенної дії селенорганічних комплексів [25]. В умовах індукованого

канцерогенезу хімічні канцерогени активуються ферментом людини P450 (сімейств 1 і 2A). В модельних експериментах розглядається здатність органічних сполук селену взаємодіяти і пригнічувати активність ферменту P450. Досліджувалися антиканцерогенні властивості таких селеноорганічних сполук як: бензил селеноціанат (BSC), 1,3-метилен селеноціанат (m-XSC).

Ефективність взаємодії селеновмісних сполук з гемопротейном оцінювалася за зміною спектра поглинання білка і положення максимуму смуги Соре. Було показано, що всі чотири сполуки з різною ефективністю взаємодіють з ферментом P450. Були представлені і розглянуті спектральні залежності взаємодії бензил селеноціанату (BSC) та 1,3-метилен селеноціанату (m-XSC) з ферментом P450. (Рис.1.5.) На них ми можемо побачити, що різні Se- вмісні комплекси по-різному впливають на гемвмісні білки на прикладі цитохрому P450. В результаті взаємодії BSC з P450 спостерігається максимум на довжині хвилі 418 нм (Рис.1.5. А), а взаємодії m-XSC з P450 – зсув одного і поява другого максимуму (393нм і 414нм) (Рис.1.5. Б).

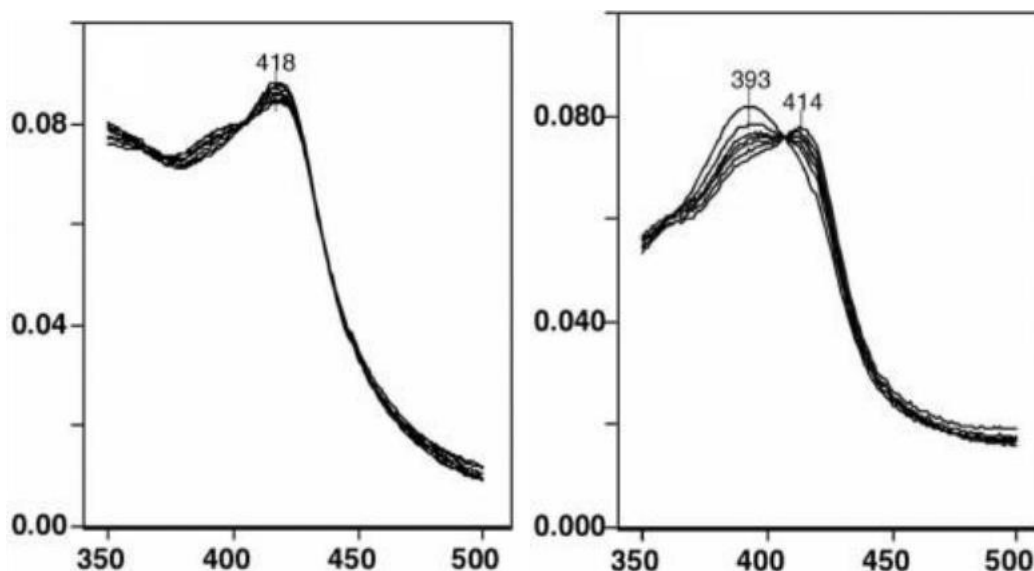
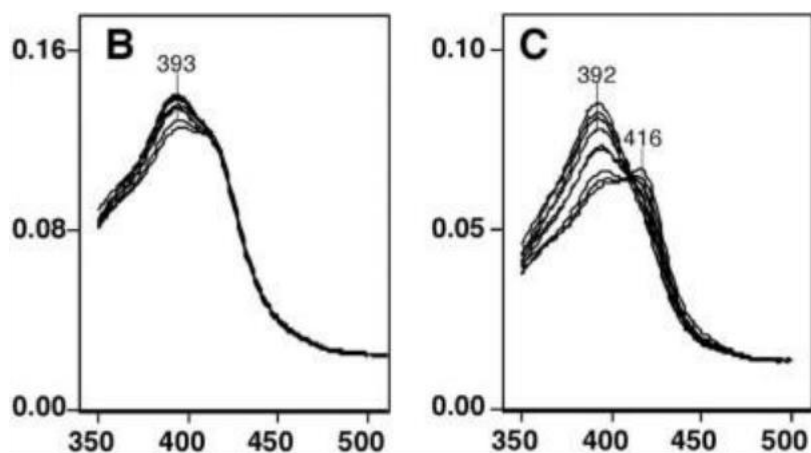


Рисунок 1.5 - Спектральна залежність бензил селеноціанату (BSC) з цитохромом P450 (А) та 1,3-метилен селеноціанату (m-XSC) з цитохромом P450 (Б)[25].

Також представлена залежність впливу бензил селеноціанату (BSC) в різних його концентраціях на цитохром P450, виділений з печінки щура (Рис.1.6. А) та кролика (Рис.1.6.Б).



Рисинук 1.6 - Спектральні залежності взаємодії бензил селеноціанату (BSC) з цитохромом P450, виділеним з печінки щура (А) та кролика (Б)[25].

Методом молекулярного моделювання авторами зроблено спробу оцінити місце локалізації селенвмісних комплексів на ферменті. Автори [25] припускають, що сайти зв'язування функціональних груп цих речовин на ферменті відрізнятимуться між ферментами P450 1 групи. На прикладі селенового комплексу *m*-XSC достовірно встановлено його локалізація в безпосередній близькості до гему цитохрому P450. Ступінь віддаленості *m*-XSC оцінювалося за відстанню між атомом гемового заліза досліджуваного білка та атомом азоту у функціональній групі - CH₂ SeCN. Показано, що для білка 1B1 селеноорганічний комплекс розташовується на відстані 2,49 Å відносно його гема, для цитохромів 1A1 і 1A2 – 6,42 Å та 5,53 Å, відповідно.

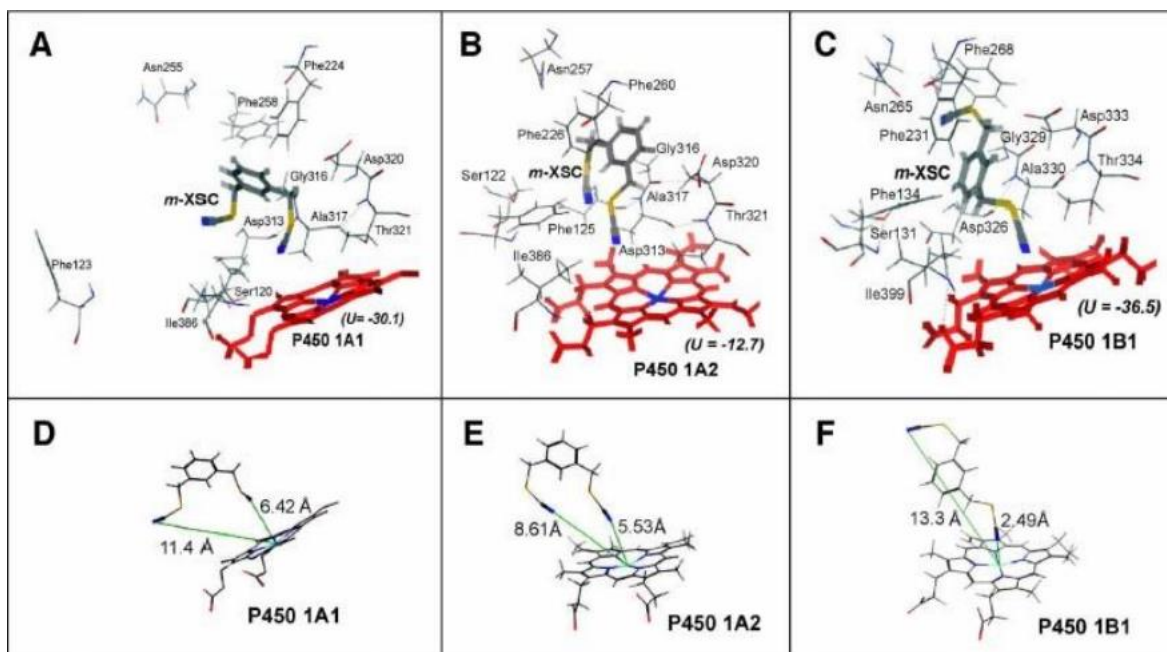


Рисунок 1.7 - Моделювання взаємодії *m*-XSC з P450 1A1 (A), 1A2 (B), і 1B1 (C) гема групи P450 та амінокислотних залишків, кисень, азот, сірка, селен, залізо пофарбовані червоним, синім, жовтим, темно- жовтим та блакитним відповідно[25].

Відстань (показано зеленими лініями) між N-атомом в-CH₂SeCN фрагментом *m*-XSC та Fe-атомом в P450 1A1, 1A2, 1B1.

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Отримання ліпосом методом етанольної інжекції

Методом етанольної інжекції отримували ліпосоми з фосфатидилхоліну (ФХ) і його сумішей з кардіоліпіном (КЛ) з різним вмістом компонент, діаметром 100 нм. Потім суспензію, що вийшла, переливали в діалізний мішечок і діалізували при перемішуванні проти 500 мл 10mM трис-НСl буферарН 7,4 при +50С протягом 24 годин.

Таблиця 2.1 - Розрахунок кількості ліпідів для приготування ліпосом з фосфатидилхоліну та його сумішей з кардіоліпіном

Состав ліпосом	Позначення проби	Об'єм розчинів ліпідів етанолі, μM	
		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

Розрахунок кількості ліпідів для приготування ліпосом із загальною концентрацією ліпиду 10 мМ проводився за таблицею 2.1. Як вихідні препарати використовували 10% етанольний розчин лецитину (100 мг/мл), 0,5% етанольний розчин кардіоліпіну (5 мг/мл).

Індекс окисненості ліпідів визначали за співвідношенням оптичних щільностей при довжинах хвиль $\lambda=233\text{nm}$, $\lambda=215\text{nm}$.

2.2 Гетероциклічні сполуки

У цих дослідженнях було вивчено дію гетероциклічної сполуки 5-cyano-2-methyl-6-(methylselanyl)-4-(thiophen 2 yl)-1,4-dihydropyridine-3-carboxamide (S5) (Рис.2.1.), синтезованого в лабораторії органічного синтезу Луганського національного. Розчинником для цього препарату, що містить селен, був обраний диметилформамід (ДМФА). В роботі використано інтервали концентрацій селенорганічної сполуки від 5 до 200 мкМ. Спектральні характеристики комплексу досліджувалися в діапазоні довжин хвиль 230-500нм.

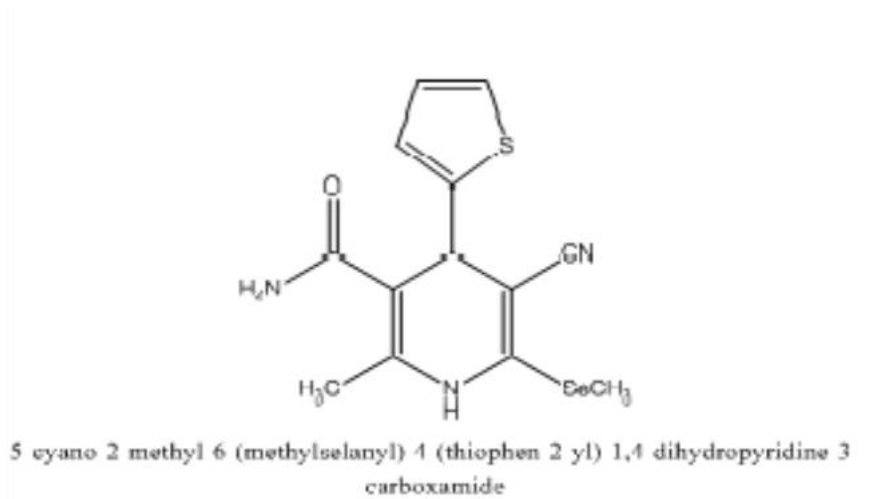


Рисунок 2.1 - Структурна формула S5

2.3 Фізичні основи методу абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії

Оптичне поглинання – це фізичний процес, пов'язаний із переходом електронів атомів чи молекул у стани з більшою енергією. Флуоресценція – випромінювання світла, що відбувається при поверненні спарених електронів на нижчі орбіталі. Фотопроекти у біологічних системах супроводжуються виникненням електронно-збуджених станів, що характеризуються певною енергією, часом життя, структурними властивостями. При поглинанні енергії молекула, що спочатку перебуває на одному з нижчих рівнів, переходить в один із збуджених станів. Сам акт переходу пов'язаний з поглинанням кванта електромагнітної енергії відповідної частоти.

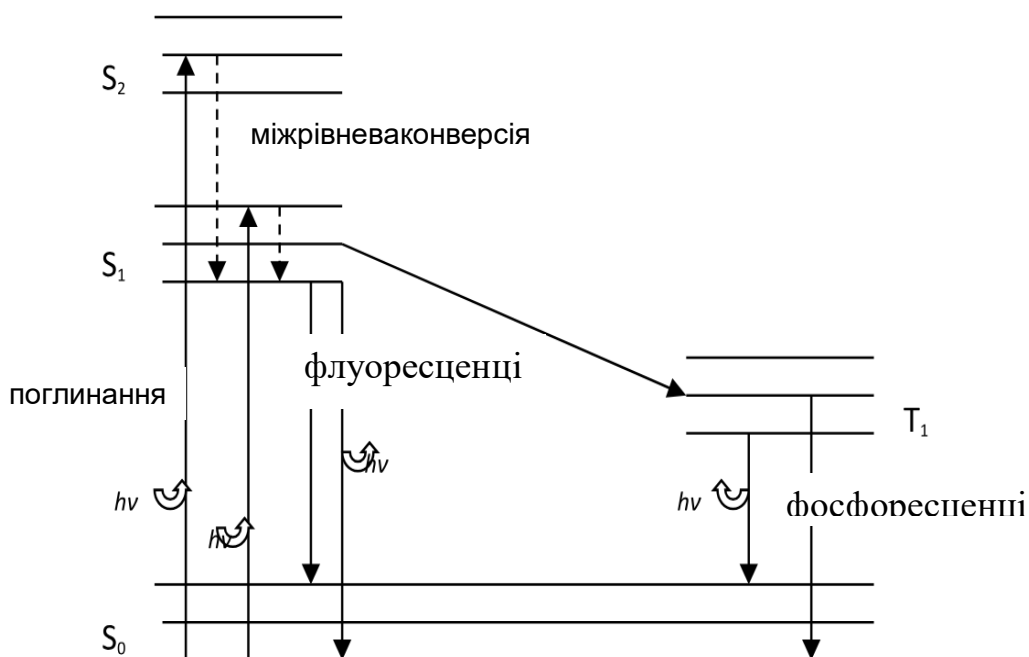


Рисунок 2.2 - Діаграма Яблонського

Можливі електронні переходи та енергетичні стани молекули зазвичай видаються у вигляді схеми рівнів енергії, де кожен електронний рівень розщеплюється на ряд коливальних підрівнів, а кожен коливальний – на ряд обертальних підрівнів. Поглинання та випромінювання світла добре ілюструє діаграма рівнів енергії, запропонована Яблонським (рис. 2.2). Основний, перший і другий електронні стани позначають S_0 , S_1 і S_2 відповідно. При поглинанні кванта світла молекулою здійснюється перехід з нижнього коливального підрівня основного стану на збуджені рівні S_1 і S_2 , при поверненні з яких відбувається випромінювання квантів світла - флуоресценція. Переходи між різними електронними рівнями позначені вертикальними лініями [26].

Коли в вуглецевому ланцюжку подвійні зв'язки чергуються з одиначними, має місце ефект сполучення зв'язків, що полягає в тому, що хмари π -електронів всіх атомів, що утворюють молекули подвійні зв'язки, взаємно перекриваються. При цьому π -електрони вже не локалізовані на подвійних зв'язках, а належать до всієї сполученої системи в цілому. Така система має здатність до флуоресценції. І саме до цього класу речовин із сполученими зв'язками (π -електронами) належить більшість сполук, що відіграють основну роль у біохімічних процесах і входять до

складу основних структур, відповідальних за найважливіші явища життєдіяльності [27].

2.4 Дослідження структури модельних ліпідних мембран методом флуоресцентних зондів

Флуоресцентні дослідження здійснювали з використанням зондів 1-анілінонафталін-8-сульфоната (АНС) та 3-метоксібензантрон (МБА).

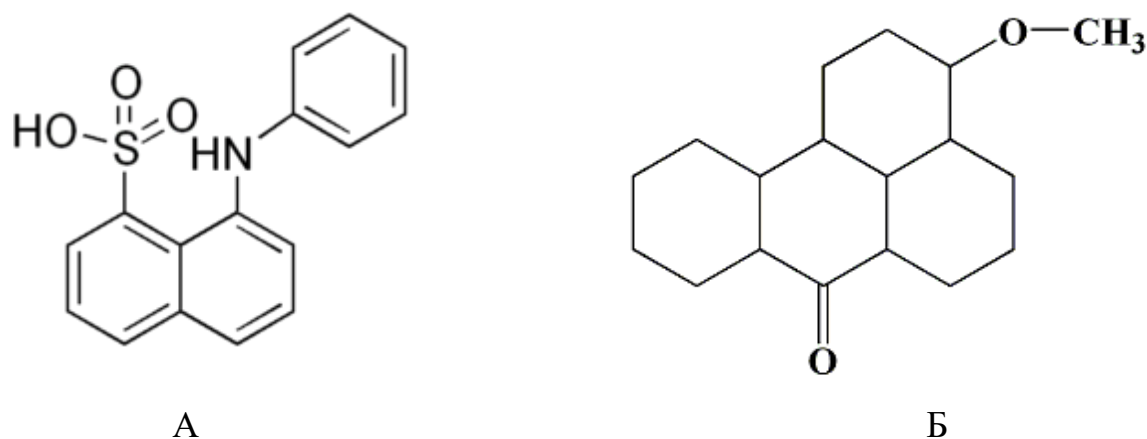


Рисунок 2.3 – Структурна формула флуоресцентного зонду АНС (А) та флуоресцентного зонду (Б)

Флуоресцентний зонд АНС горизонтально орієнтований на поверхні мембран. Зануритися в бішар йому не дозволяє фенольне кільце і заряджена сульфогрупа, яка повинна залишатися на поверхні. Молекула АНС розташована так, що одна поверхня фенольного кільця примикає до ділянки гліцерину фосфоліпиду, а інша контактує з водою. Інтенсивність флуоресценції зонду реєстрували при $\lambda_{\text{зб}}=365$ нм, $\lambda_{\text{фл}}=480$ нм [28]. Кінцева концентрація зонду в пробі 30 мкМ.

МБА - флуоресцентний незаряджений зонд, що локалізується в мембранах між областю голівок та гідрофобних хвостів ліпідних молекул. Гасіння флуоресценції зонду відбувається на поверхні мембрани в результаті перенесення електрона з карбонілу збудженої молекули МБА на водні кластери або

перенесення протона на МБА. При переході з водної у ліпідну фазу спостерігається зростання флуоресценції та короткохвильовий зсув максимуму флуоресценції [28]. Інтенсивність флуоресценції зонду реєстрували при $\lambda_{\text{зб}}=420$ нм, $\lambda_{\text{фл}}=540$ нм. Кінцева концентрація зонду в пробі 25 мкМ.

Комплексоутворення селеновмісних сполук з модельними біомембранами досліджували на спектрофлуориметрі HitachiU-850 /Японія/, в термостатованих кварцових кюветах 10x10 мм. Кінцева концентрація ліпідів у пробі 0,5 мМ.

2.5 Кінетика конформаційних змін гемоглобіну в комплексі з ліпосомальними мембранами різного складу в присутності селеновмісних комплексів

Вимірювали кінетичні залежності зміни оптичної щільності гемоглобіну в присутності фосфотидилхолінових ліпосом різного складу при взаємодії з комплексами, що містять селен. Кінцева концентрація гемоглобіну в пробі 2,4 мкМ, комплексів селеносодержащих 17 мкМ. Базова концентрація ліпосом 0,7 мМ.

Вимірювання проводили на спектрофотометрі СФ-46, в кварцових кюветах 10, при довжині хвилі $\lambda=404$ нм. Кінетичні залежності зміни оптичної густини гемоглобіну при довжині хвилі 404 нм описували співвідношенням [28]:
$$D/D_0 = A_1 \exp(-k_1 t) + y_0$$

Де D , D_0 - поглинання світла гемоглобіном у буфері та в суспензії ліпосом відповідно, A_1 , A_2 - амплітуди кінетичних фаз, k_1 , k_2 - кінетичні константи. Кінетичні параметри визначали методом найменших квадратів.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджуваний органічний комплекс S5 містить атом селену, не включений до гетероциклу і з'єднаний з метильною групою. Така хімічна структура визначатиме хімічні властивості досліджуваної сполуки та її особливості взаємодії з модельними біомембранами. Спектральні властивості селенового комплексу S5, розчиненого в ДМФА, характеризуються наявністю максимуму поглинання в ближній ультрафіолетовій ділянці (300 нм) (Рис.3.1)

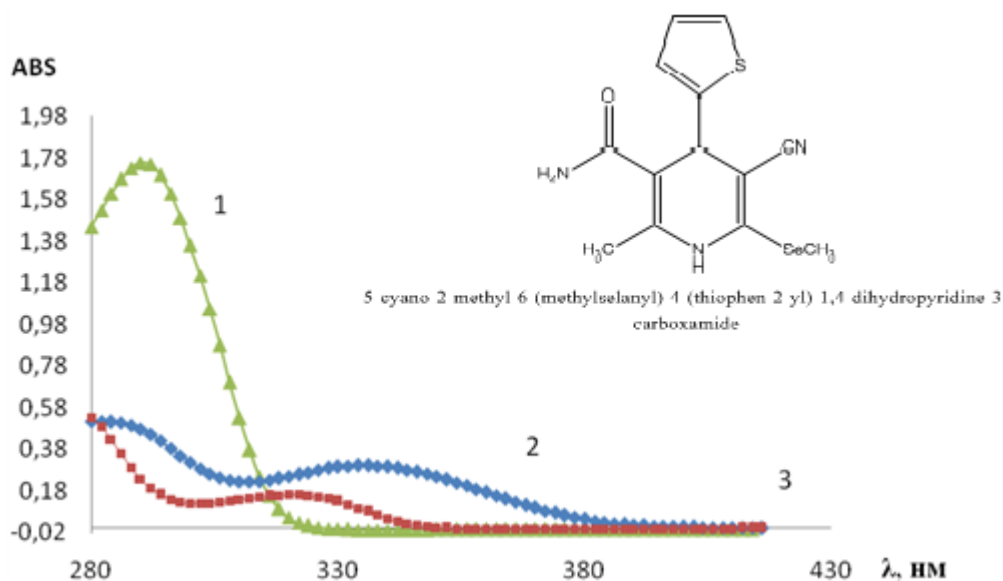


Рисунок 3.1 - Спектри поглинання комплексів селеновмісних в розчиннику ДМФА. 1- S5, 2-S6, 3-S8

При дослідженні спектральних характеристик комплексу S5 при його взаємодії з модельними мембранами (Рис. 3.2) встановлено зсув максимуму поглинання в довгохвильову область спектру ($\lambda=315$ нм) як у фосфатидилхолінових ліпосомах так і в ліпосомах з різним відсотковим вмістом кардіоліпіну.

У фосфатидилхолінових ліпосомах інтенсивність поглинання досліджуваного комплексу менша, ніж у кардіоліпінових ліпосомах і поглинання зростає зі збільшенням відсоткового вмісту кардіоліпіну. Ймовірно, в кардіоліпінових ліпосомах через присутність поверхневих однойменних зарядів утворюється нещільний гідрофільний шар, який долається молекулами, що

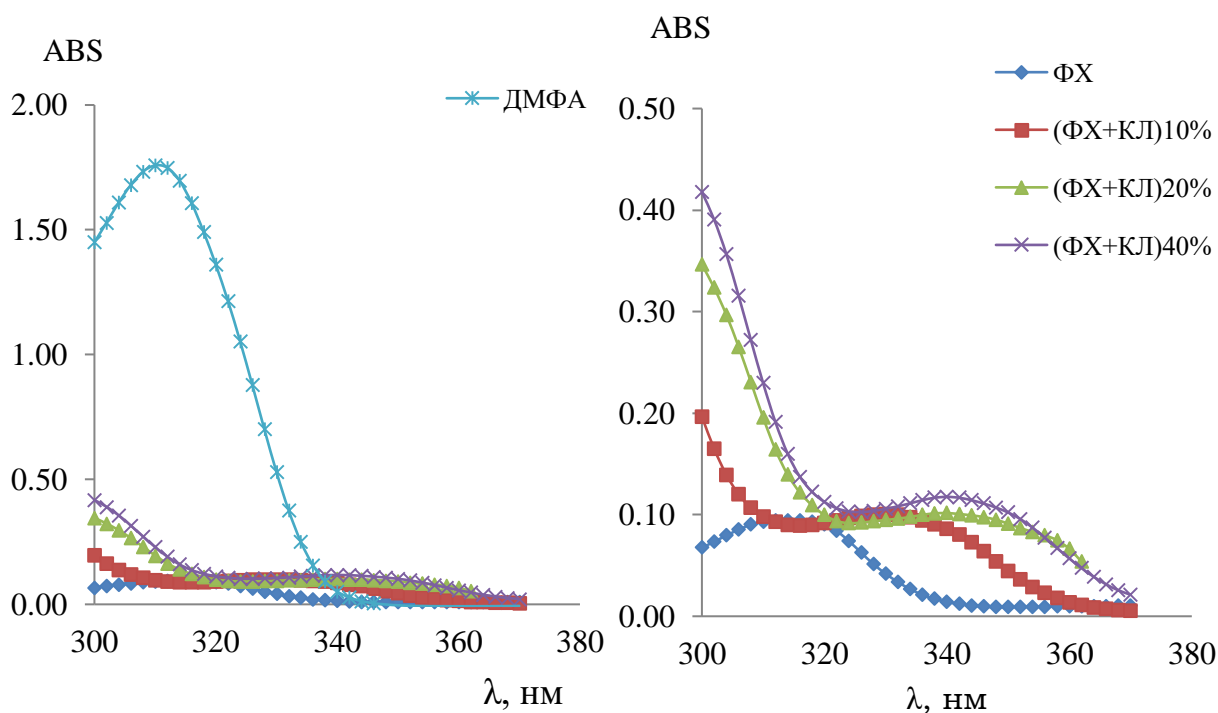


Рисунок 3.2 – Спектр поглинання селеновмісного комплексу S5 в липосомах різноманітного складу. 1-ФХ, 2-(ФХ+КЛ)10%, 3-(ФХ+КЛ)20%, 4-(ФХ+КЛ)40%, 5- ДМФА

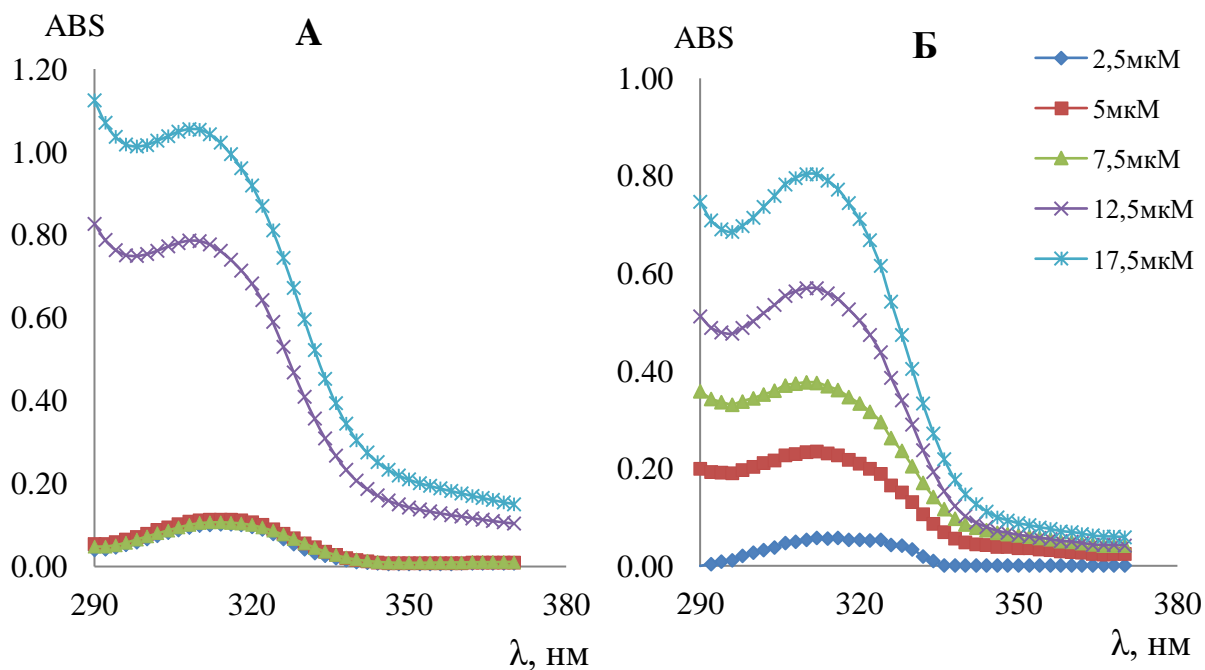


Рисунок 3.3 – Спектри поглинання комплексу S5 в ФХ липосомах (А) та в липосомах із вмістом КЛ_{20%} (Б) в інтервалі концентрацій 2,2 мкМ - 17,5 мкМ

містять селен, і в результаті комплекси ефективніше перерозподіляються в кардіоліпінових ліпосомах.

Концентраційні спектри поглинання комплексу S5 (Рис. 3.3) у модельних мембранах свідчать про збільшення поглинання в максимумі 315 нм незалежно від фосfolіпідного складу біомембран. Однак встановлено, що у фосфатидилхолінових ліпосомах при максимальній концентрації (17,5 мкМ) S5 в середовищі величина максимуму досягає значення 1,2, тоді як у ліпосомах з вмістом КЛ20% - 0,8. В області малих концентрацій (до 7,5 мкМ) селенового комплексу у фосфатидилхолінових ліпосомах спектральні характеристики S5 не змінюються.

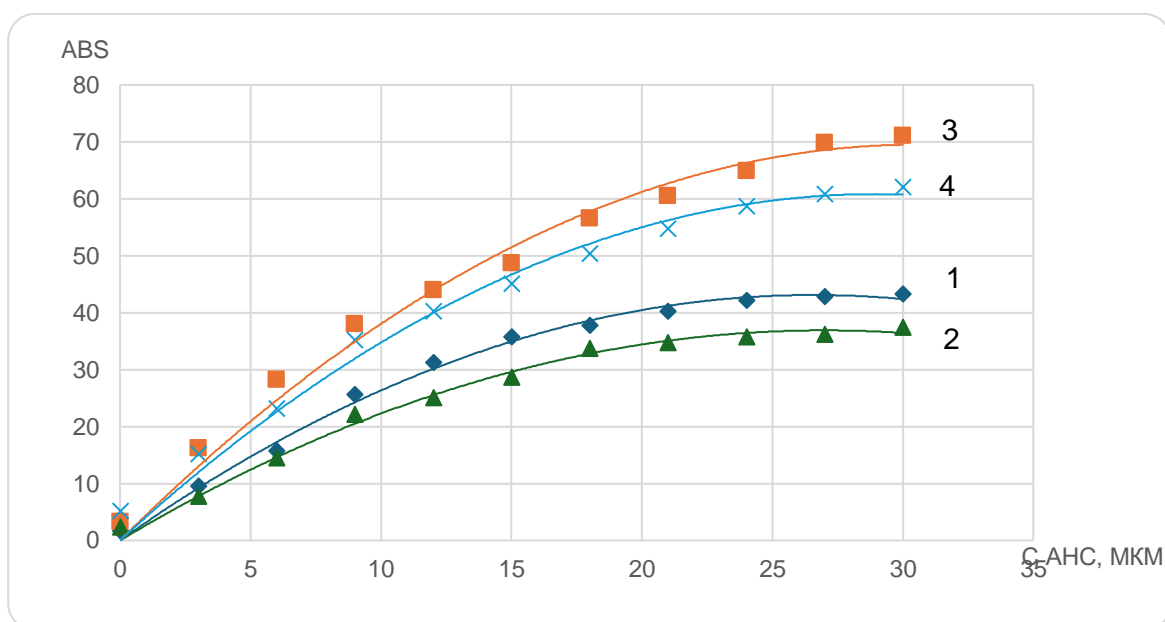


Рисунок 3.4 – Зміни інтенсивності флуоресценції АНС в ліпосомальних мембранах різного ліпідного складу в вільному стані та в присутності комплексу S5: 1- ФХ, 2- ФХ+ комплекси селену, 3- ФХ+КЛ10%, 4-ФХ+КЛ10%+комплекси селену.

Для оцінки ступеня структурних змін модельних біологічних мембран у присутності селенових комплексів були використані флуоресцентні зонди АНС, МБА, які локалізуються у різних галузях ліпідного бішару [28]. З рисунку 3.4

видно, що присутність селенових комплексів (S5) у суспензії ліпосом призводить до незначного зменшення інтенсивності флуоресценції поверхнево локалізованого зарядженого АНС як у ФХ ліпосомах так і в ліпосомах із вмістом КЛ10%. Розраховані значення константи зв'язування та числа місць зв'язування вказують на відсутність достовірних змін параметрів флуоресценції АНС у присутності селенових комплексів.

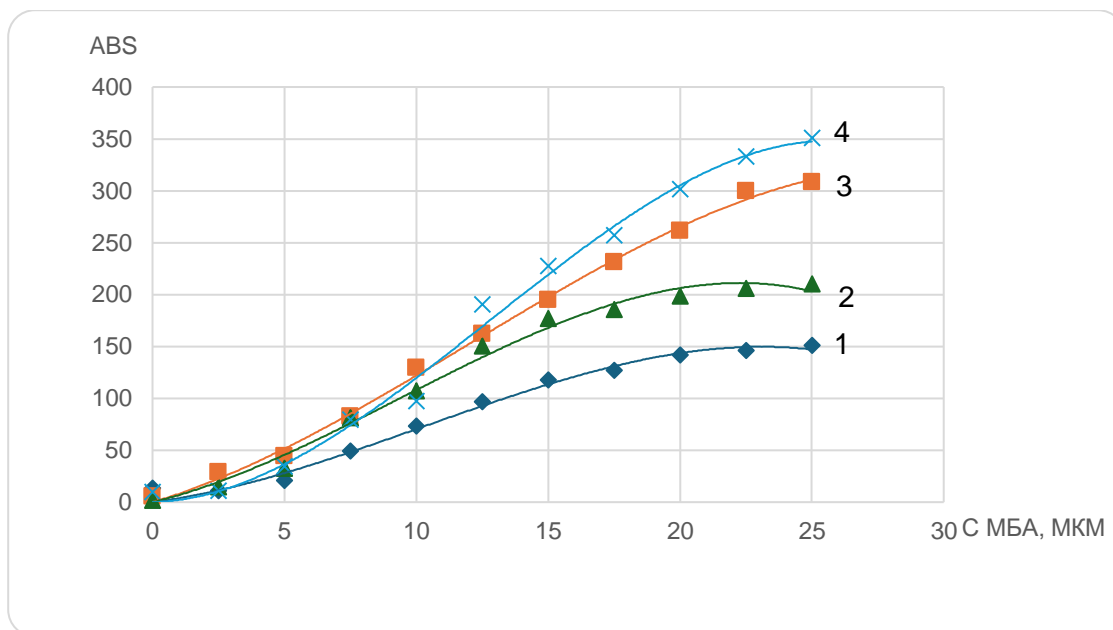


Рисунок 3.5 – Зміни інтенсивності флуоресценції МБА в ліпосомальних мембранах різного ліпідного складу в вільному стані та в присутності комплексу S5: 1- ФХ, 2- ФХ+ комплекси селену, 3- ФХ+КЛ10%, 4-ФХ+КЛ10%+комплекси селену.

Гідрофобна незаряджена молекула МБА занурена в полярну область бішару глибше, ніж АНС [28]. На рисунку 3.5 представлені криві титрування модельних мембран флуоресцентним зондом МБА. Встановлено, що збільшення інтенсивності флуоресценції даного зонда при його наростаючій концентрації більшою мірою властиве для контрольних зразків модельних мембран із вмістом КЛ10%. Присутність селенових комплексів у ліпосомах змінює параметри флуоресценції МБА. Показано, що інтенсивність флуоресценції МБА зростає як у

фосфатидилхолінових ліпосомах, так і в ліпосомах із вмістом кардіоліпіну. Розрахунок параметрів зв'язування зонду з модельними мембранами свідчить про зменшення центрів зв'язування МБА в ліпосомах, викликане присутністю селенових комплексів.

Таблиця 3.1 - Значення константи зв'язування та числа місць зв'язування флуоресцентного зонда МБА з нейтральними та зарядженими ліпосомами у присутності комплексу селену S5.

Склад ліпосом	N	K _c
ФХ	90,9±4,5	0,038±0,002
ФХ+S4	83,3±4,2	0,035±0,002
(ФХ+КЛ)10%	111,1±5,5	0,057±0,003
(ФХ+КЛ)10%+S4	100±5	0,059±0,003

Наявність селенових комплексів у структурі модельних мембран, їхнє перерозподілення в гідрофобній області бішару можуть впливати на взаємодії між білками й ліпідами в модельній системі ліпосома-гемоглобін. На рис. 3.6, 3.8, 3.10 представлені кінетичні залежності зменшення оптичної густини гемоглобіну при додаванні його у фосфатидилхолінові ліпосоми за наявності селеновмісних комплексів. Апроксимацію кінетичних залежностей зменшення поглинання молекул гемоглобіну було виконано експоненціальною функцією $D/D_0 = A_1 \exp(-k_1 t) + y_0$ [29], і були визначені кінетичні параметри процесу: амплітуда і характерний час зниження оптичної густини. На підставі літературних даних можна припустити, що модифікація структури гемоглобіну під час його взаємодії з модельними мембранами включає кілька етапів: утворення нестійкої проміжної форми білка, руйнування контактів між гемом і глобіном, відщеплення іонів заліза від порфіринового кільця. Лімітуючою стадією в ланцюзі цих реакцій є дисоціація комплексу гем – глобін.

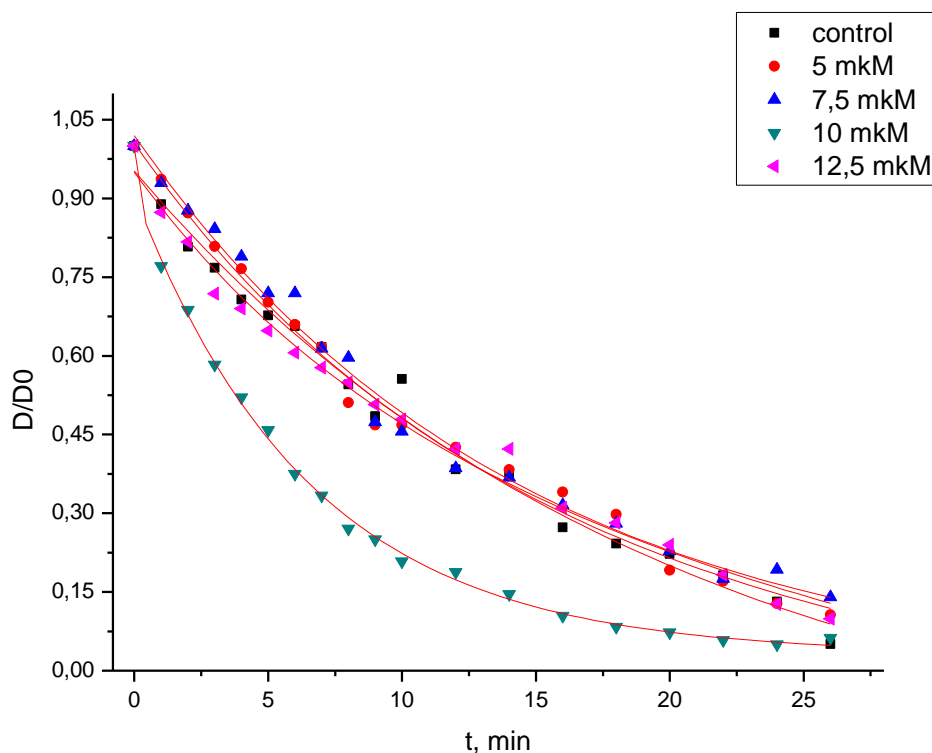


Рисунок 3.6 - Кінетичні залежності зменшення оптичної щільності гемоглобіну в ліпосомальних мембранах з різною концентрацією комплексу S5. (Сліпід=0,7 мМ, СНб=2,9 мМ)

Зв'язування Нб з ФХ мембранами у присутності S5 у різних концентраціях (5-12,5 мкМ) супроводжувалося зменшенням поглинання білка у смузі Core при концентрації селену 10мкМ. Тоді як у сфері малих концентрацій достовірні зміни відсутні (Рис. 3.6).

Значення кінетичних параметрів комплексоутворення представлені у таблиці.

Спостерігається зниження поглинання гемоглобіну в смузі Core в присутності 10мкМ селену є наслідком конформаційних змін білкової молекули, що зачіпають область гемової групи. Такі зміни конформації гемоглобіну

пов'язані з посиленням окисних процесів у гідрофобній області бішар і зануренням гемової групи в бішар[29].

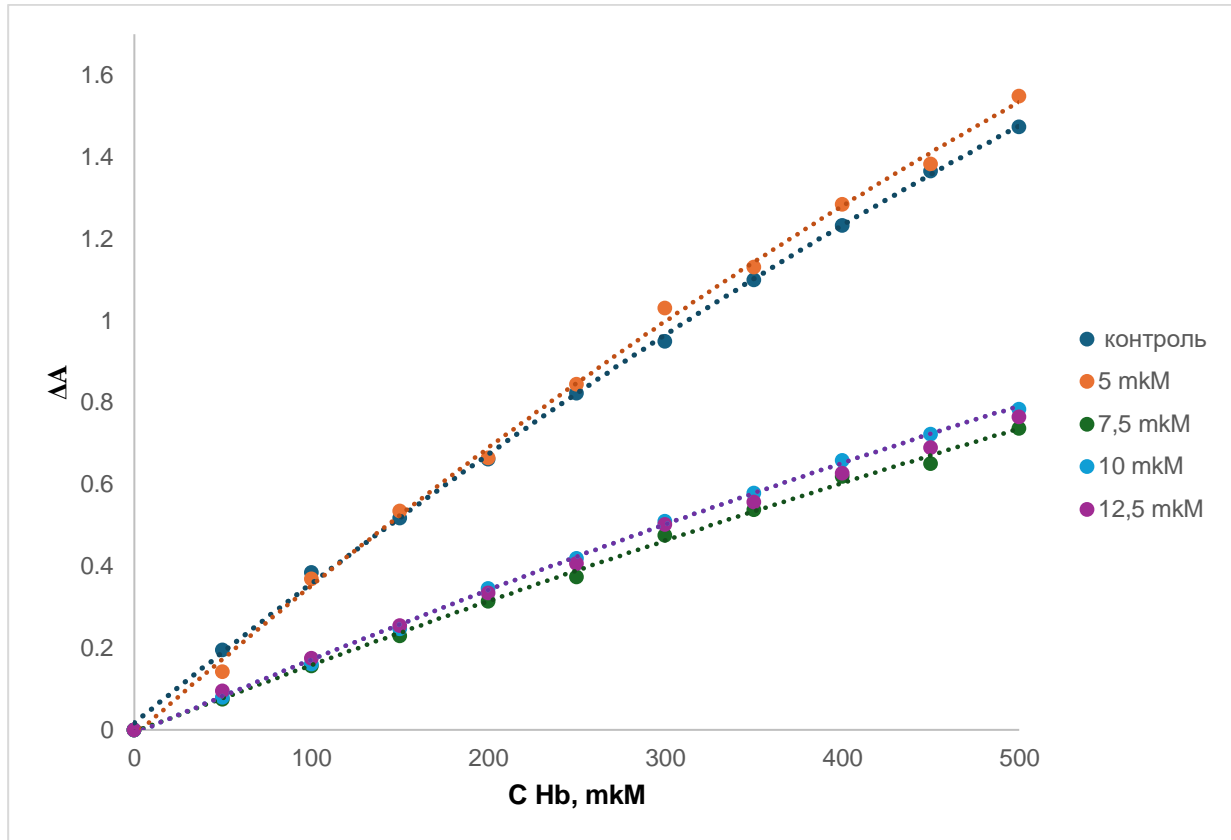


Рисунок 3.7 - Ізотерми адсорбції молекул гемоглобіну на модельних мембранах у присутності різних концентрацій комплексу S5

У процесах адсорбції гемоглобіну на поверхні ліпосом переважають гідрофобні сили взаємодії. При зануренні в ліпідний бішар змінюються спектральні характеристики молекули білка в смузі Soret, зменшується здатність гемової групи до поглинання світла. Присутність Se комплексу в різних концентраціях посилює білок-ліпідну гідрофобну взаємодію. Зростання концентрації селену зменшує поглинання в смузі Soret, що показано на ізотермах абсорбції (Рис. 3.7.)

Таблиця 3.2 – Залежність кінетичних параметрів від концентрації Se комплексу в ліпосомальних мембранах

	A	k, мин ⁻¹
контроль	1,17±0,02	0,05±0,03
5 мкМ	1,08±0,05	0,07±0,04
7,5 мкМ	1,05±0,03	0,07±0,02
10 мкМ	1,35±0,02	0,17±0,03
12,5 мкМ	1,03±0,06	0,06±0,05

Кінетичні залежності зменшення оптичної щільності гемоглобіну в смузі Сорє були отримані при зміні умов інкубування сполук селену (концентрація 145мкМ) у суспензії ліпосомальних мембран (Рис. 3.8): інкубація відсутня (0 хв) (тобто вимірювання здійснюються відразу після добавки селена); 10 хв; 20 хв.

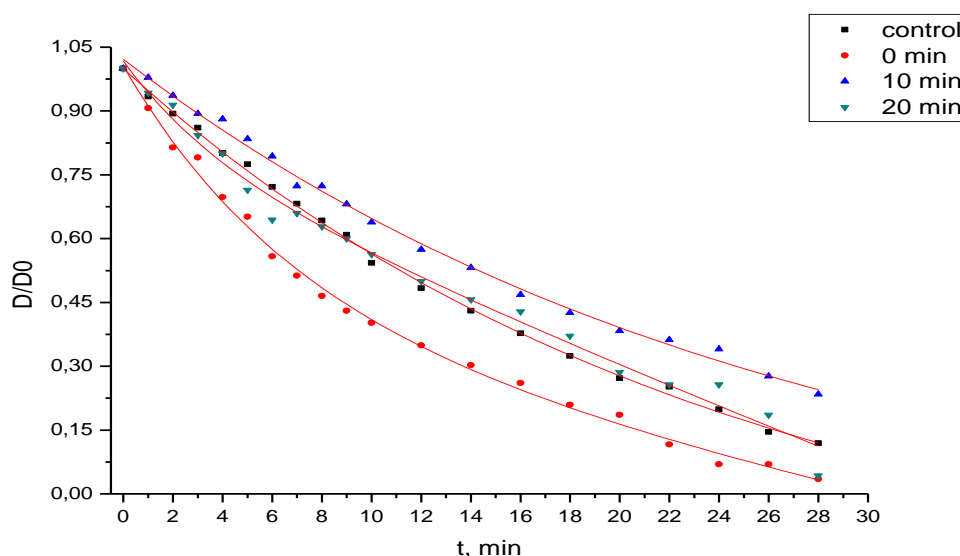


Рисунок 3.8 - Кінетичні залежності зменшення оптичної щільності гемоглобіну в ліпосомальних мембранах з різним часом інкубації комплексу S5 в концентрації 145 мкМ

Збільшення поглинання гемоглобіну в смузі Сорє встановлено при інкубації S5 в суспензії ліпосом протягом 10 хв концентрації (145 мкМ). Тоді як зв'язування Нв з ФХ мембранами відсутність інкубації в тій же концентрації селену

відбувається зі зменшенням величини поглинання в смузі Core. Аналіз експериментальних даних дозволяє припустити, що присутність комплексу S5 має різноспрямований вплив на взаємодію гемоглобіну з модельними лецитиновими мембранами, не виявляючи при цьому стійкої антиоксидантної дії (Рис. 3.9).

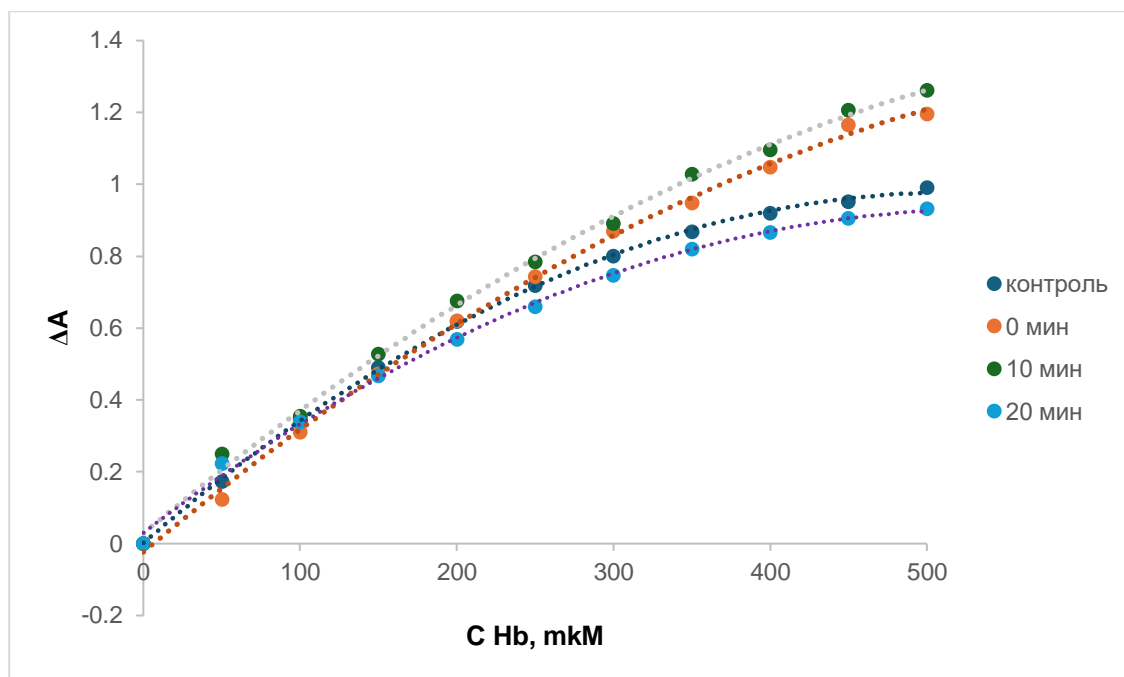


Рисунок 3.9 - Ізотерми адсорбції молекул гемоглобіну на модельних мембранах з різним часом інкубації комплексу S5 концентрації 145 мкМ

Таблиця 3.3 - Вплив часу інкубації Se комплексу у ліпосомальних мембранах на зміну кінетичних параметрів спектральних характеристик гемоглобіну

	A	k, мин ⁻¹
контроль	1,28±0,02	0,04±0,03
0 хвилин	1,35±0,06	0,08±0,02
10 хвилин	1,04±0,02	0,03±0,02
20 хвилин	1,28±0,03	0,04±0,04

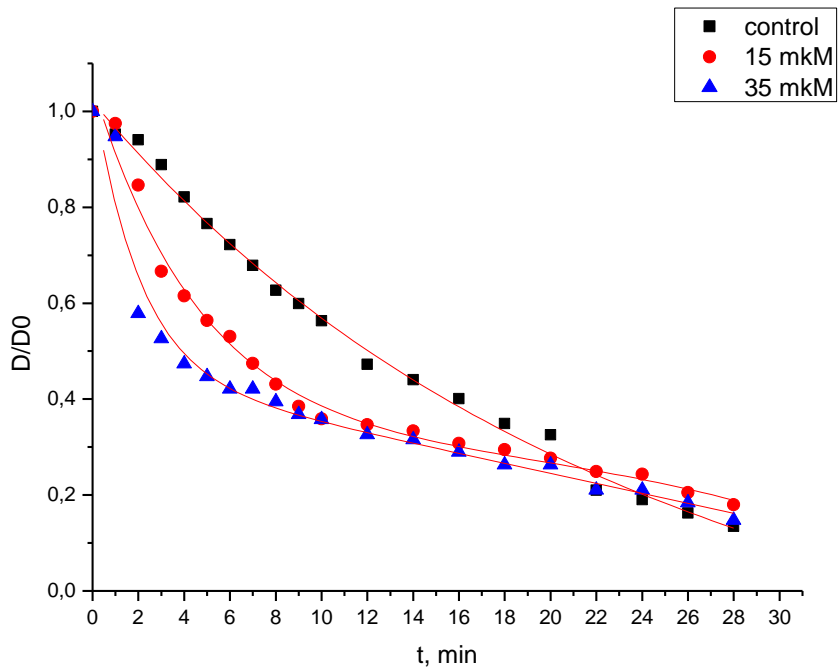


Рисунок 3.10 - Кінетичні залежності зменшення оптичної щільності гемоглобіну в ліпосомальних мембранах із вбудованим комплексом S5 в концентрації 15 та 35 μM

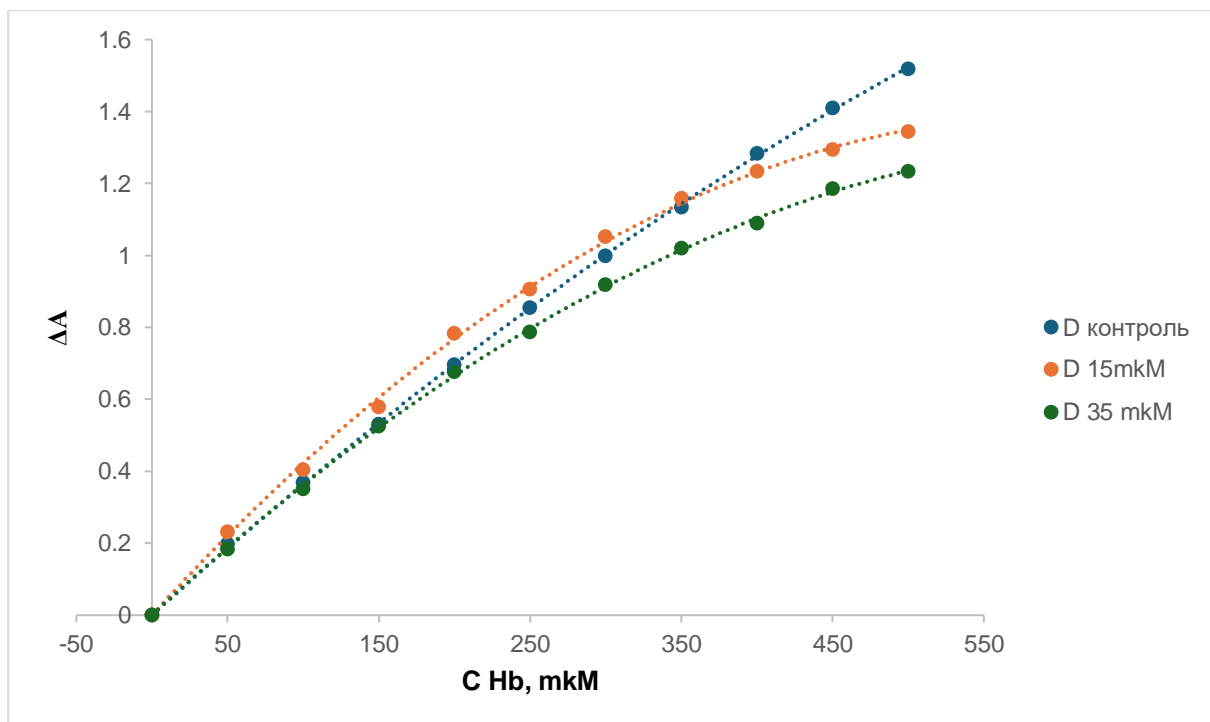


Рисунок 3.11 - Ізотерми адсорбції молекул гемоглобіну на модельних мембранах із вбудованим комплексом S5 в концентрації 15 та 35 μM

Таблиця 3.4 - Залежність кінетичних параметрів комплексоутворення мембрана-гемоглобін з попереднім введенням комплексу Se в ліпосомальну мембрану

	A	k, мин ⁻¹
контроль	1,22±0,02	0,05±0,03
15 мкМ	0,81±0,04	0,17±0,05
35 мкМ	0,75±0,03	0,24±0,04

Попереднє введення сполуки S5 у концентраціях 15 та 35 мкМ у розчин лецитину до приготування ліпосом сприяє зменшенню поглинання у смузі Core щодо контрольного зразка (Рис. 3.10). Кінетичні параметри зв'язування гемоглобіну визначали, використовуючи ізотерми адсорбції макромолекул на модельних мембранах із вбудованим комплексом S5 (Рис. 3.11). Достовірні зміни кінетичних параметрів процесу комплексоутворення представлені у таблиці. Попереднє введення сполуки S5 у концентраціях 15 та 35 мкМ у розчин лецитину до приготування ліпосом зменшує амплітуду в 1,5 рази, а значення константи швидкості збільшується у 3 та 4 рази відповідно щодо контрольного зразка.

Отримані кінетичні криві зв'язування гемоглобіну з модельним бішаром і розраховані кінетичні параметри процесу білок-ліпідної взаємодії мають достовірні відмінності в досліджуваних зразках концентрації селенового комплексу 10 мкМ, а також при інкубації селенового комплексу протягом 10 хвилин. Аналіз експериментальних даних дозволяє припустити, що присутність селенових комплексів має неоднозначний вплив на взаємодію гемоглобіну з модельними мембранами різного ліпідного складу та потребує подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Досліджуваний гетероциклічний селеновмісний комплекс ефективно взаємодіє з модельними біомембранами різного фосфоліпідного складу.
2. Показано зміну спектральних характеристик досліджуваного комплексу селену при взаємодії з ліпосомами. Здатність до поглинання S5 зменшується при його перерозподілі з розчину в неполярну область ліпідного бішару, виявляючи цим чутливість досліджуваних гетероциклів до полярності оточення.
3. В присутності селенових комплексів виявлено структурні перебудови неполярної області ліпідного бішару як у фосфатидилхолінових ліпосомах, так і в ліпосомах з додаванням кардіоліпіну дослідженням флуоресценції зонду МБА.
4. Встановлено зміни кінетичних параметрів взаємодії гемоглобіну з модельними ФХ мембранами в присутності комплексу селену. Концентрація селену 10мкМ в середовищі спричинює збільшення величини амплітуди на 20% і зростання константи швидкості в 5 разів відносно контрольного зразка.
5. Попереднє введення сполуки S5 у концентраціях 15 та 35 мкМ у розчин фосфатидилхолину до приготування ліпосом зменшує амплітуду в 1,5 рази, а значення константи швидкості збільшується у 3 та 4 рази відповідно щодо контрольного зразка.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Marsh D., Horvath L.I. Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin-labelling // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998. 1376. P. 267-296.
2. Heyse S., Stora T., Schmid E., Lakey J.H. Emerging techniques for investigating molecular interactions at lipid membranes // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998. 85507. P. 319-338.
3. Composition design and medical application of liposomes/ H. Voge et al // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. 164. P. 640-653.
4. Fana Y., Mariolib M., Zhanga K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020. 192. 113642.
5. Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids / White. GF et al // *Biochim Biophys Acta*. 2000. 1468. P. 86-175.
6. T. Yonetani* and M. Laberge. Protein Dynamics Explain the Allosteric Behaviors of Hemoglobin // *Biochim Biophys Acta*. 2008. 1784. P. 1146–1158.
7. New effectors of human hemoglobin. Structure and function / Lalezari. I. et al // *Biochemistry* 1990. 29. P. 1515–1523.
8. Y. Zhu¹, G. Cheng, S. Dong. Structural electrochemical study of hemoglobin by in situ circular dichroism thin layer spectroelectrochemistry // *Biophysical Chemistry* 97 2002. P. 129–138.
9. T. Yonetani and M. Laberge. Protein Dynamics Explain the Allosteric Behaviors of Hemoglobin // *Biochim Biophys Acta*. 2008. 1784. P. 1146–1158.
10. Time-resolved fluorescence of hemoglobin species / Z. Gryczynski et al // *Biophys. J.* 64 1997. P. 81–91
11. Cullis PR, Chonn A, Semple SC. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo // *Adv Drug* 1998.

12. Flow Alignment of Extracellular Vesicles: Structure and Orientation of Membrane-Associated Bio-macromolecules Studied with Polarized Light / Deák R et al // *Chembiochem*. 2018. 19. P. 545-551
13. Datta P, Chakrabarty S, Chakrabarty A, Chakrabarti A. Membrane interactions of hemoglobin variants, HbA, HbE, HbF and globin subunits of HbA: effects of aminophospholipids and cholesterol // *Biochim Biophys Acta*. 2008. 1778. P. 1-9.
14. Горбенко Г.П. Вплив фосфоліпідів на зв'язування бромтимолового синього метгемоглобіном // *Біополімери і клітина*. 1990. 6. С.103-105.
15. Marva E., Hebbel R.P. Denaturing interaction between sickle hemoglobin and phosphatidylserine liposomes // *Blood*. 1994. 83. P. 242-249.
16. Горбенко Г.П. Застосування бромтимолового синього для вивчення комплексу метгемоглобіна з ліпосомами // *Укр. Біохім. Журн*. 1991. 63. P. 94-98.
17. Древаль В.И., Горбенко Г.П.. Вплив метгемоглобіну і феррицитохрому с на структуру ліпідного шару // *Укр. Біохім. Журн*. 1990. 62. С. 111-114.
18. Marva E., Hebbel R.P. Denaturing interaction between sickle hemoglobin and phosphatidylserine liposomes // *Blood*. 1994. 83. P. 242 - 249.
19. Yamamoto Y., Niki E., Eguchi J., Kamiya Y. Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen // *Biochim Biophys Acta*. 1985. 819. P. 29-36.
20. Kunwar A, Nayak M. Role of Selenium-Dependent Glutathione Peroxidases (Seleno-GPx) in Radio-Modulation: Lessons for Radiation Oncology. // *Biol Trace Elem Res*. 2025.
21. Short S.P., Pilat J.M., Williams C.S. Roles for selenium and selenoprotein P in the development, progression, and prevention of intestinal disease. // *Free Radic Biol Med*. 2018. 127. P. 26-35.
22. Гусейнов Т. М., Ях'яєва Ф.Р., Гулієва Р.Т. Вплив селену на стійкість гемоглобіну до процесів фотоокислення // *Укр. Біохім. Журн*. 2012.84. С. 53-60.

23. Барабой В. А., Шестакова Е. Н. Селен: біологічна роль та антиоксидантна активність // Укр. Біохім. Журн. 2004. 76. С. 23 - 32.
24. Comparative toxicosis of sodium selenite and selenomethionine in lambs / AK Tiwary et al // J Vet Diagn Invest 2006. 18. P. 61-70.
25. H. Liu, Q. Lu, and K. Huang. Selenium Suppressed Hydrogen Peroxide-Induced Vascular Smooth Muscle Cells Calcification Through Inhibiting Oxidative Stress and ERK Activation // Journal of Cellular Biochemistry 2010. 111. P. 1556 – 1564 .
26. T. Shimada, N. Murayama, K. Tanaka, S. Takenaka. Spectral modification and catalytic inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2A6 and 2A13 by four chemopreventive organoselenium compounds // Chem.Res.Toxicol. 2012 .
27. Демченко О.П. Люмінесценція і динаміка структури білків.- К.: Наук.Думка, 1988.- 280с.
28. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy // Springer-Verlag. New York Inc. 2006. 535.
29. Горбенко ГП. Кінетика конформаційних змін метгемоглобіну в комплексі з ліпосомами Укр.біохім.журнал, 1998. 70. С. 68-72.