

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

Доктор фізико-математичних наук,
доцент кафедри молекулярної і
медичної біофізики

Берест В.П.

ДИПЛОМНА РОБОТА МАГІСТРА

ВПЛИВ ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ШИРОКОГО ЧАСТОТНОГО
ДІАПАЗОНУ НА КЛІТИННІ І МОДЕЛЬНІ МЕМБРАНИ

Науковий керівник

Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри
молекулярної і медичної біофізики

_____ Січевська Л.В.

(підпис)

Виконала студентка групи РБ-61,
спеціальність: 105 Прикладна
фізика та нанометеріали

_____ Карабут А.Д.

(підпис)

Харків 2024

КЛЮЧОВІ СЛОВА: БЛОК-ЛІПІДНА ВЗАЄМОДІЯ, БРОМТИМОЛОВИЙ СИНІЙ, КАРДІОЛІПІН, КЛІТИНА *S.CEREVISIAE*, ЛПОСОМА, НИЗЬКОІНТЕНСИВНЕ ЛАЗЕРНЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ, ПОВЕРХНЕВИЙ ЗАРЯД МЕМБРАНИ, ФОСФАТИДИЛХОЛІН, ЦИТОХРОМ С.

АНОТАЦІЯ

Карабут А.Д. Вплив лазерного випромінювання широкого частотного діапазону на клітинні і модельні мембрани. Дипломна робота. Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, 2024. 53 с., 19 рис., 5 таб., 30 джерел.

ВПЛИВ ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ШИРОКОГО ЧАСТОТНОГО ДІАПАЗОНУ НА КЛІТИННІ І МОДЕЛЬНІ МЕМБРАНИ.

Об'єкт дослідження: клітинні і модельні мембрани.

Предмет дослідження: механізму взаємодії лазерного випромінювання з довжиною хвилі 532 нм, 337 нм, 70,5 мкм, 632,8 нм з природніми та модельними мембранами.

Мета роботи: вивчення механізму впливу лазерного випромінювання широкого частотного діапазону на природні та модельні мембрани.

Методи дослідження: лазерне випромінювання в ультрафіолетовому, зеленому, субміліметровому діапазонах і He-Ne лазер, спектрофотометрія, розрахунок кінетичних параметрів комплексотворення та констант сорбції і кількість центрів сорбції.

Результати дослідження: на основі змін електричних властивостей мембрани було встановлено, що мембрана клітин реагує на лазерне випромінювання з довжиною хвилі 532 нм, 337 нм, 70,5 мкм, 632,8 нм, максимальний ефект змін електричних властивостей мембрани спостерігається

під впливом лазера з довжиною хвилі 532 нм. На основі зміни кінетичних параметрів комплексоутворення цитохрому С з опроміненими модельними мембранами і комплексоутворення опроміненого цитохрому с з ліпідними мембранами, встановлено, що лазерна модифікація електричних властивостей ліпідних молекул і молекули білка спричинює зміни комплексоутворення. Більш чутливими до дії лазерного випромінювання виявилися модельні ліпідні мембрани.

Отриманні результати можуть використовуватися для розуміння проблеми лазерної фотомодуляції на рівні природніх мембран та їх модельних аналогів.

KEYWORDS: BROMOTHYMOL BLUE, CARDIOLIPIN, CYTOCHROME C, LIPOSOME, LOW-INTENSITY LASER RADIATION, MEMBRANE SURFACE CHARGE, PHOSPHATIDYLCHOLINE, PROTEIN-LIPID INTERACTION, S. CEREVISIAE CELL.

ABSTRACT

Karabut A.D. Effect of laser radiation of wide frequency range on cellular and model membranes. Diploma thesis. V. N. Karazin Kharkiv National University, 2024. 53 p., 19 figures, 5 tables, 30 sources.

EFFECT OF LASER RADIATION OF WIDE FREQUENCY RANGE ON CELLULAR AND MODEL MEMBRANES.

Object of research: cell and model membranes.

Subject of the research: laser radiation with wavelengths of 532 nm, 337 nm, 70.5 microns, 632, 8 nm.

The aim: Identification of the mechanisms of influence of laser radiation of a wide frequency range on natural and model membranes.

Methods of research: laser radiation in the ultraviolet, green, submillimeter range and He-Ne laser, spectrophotometer, calculation of kinetic parameters of complexation and calculation of the sorption constant and the number of sorption centers.

Results of the research: based on changes in the electrical properties of the membrane, it was found that the cell membrane reacts to laser radiation with a wavelength of 532 nm, 337 nm, 70.5 μm , 632, 8 nm, the maximum effect of changes in the electrical properties of the membrane is observed from the influence of a laser with a wavelength of 532 nm. Based on the changes in the kinetic parameters of cytochrome c complexation with irradiated model membranes and complexation of irradiated cytochrome c with lipid membranes, it was found that laser modification of

the electrical properties of lipid molecules and protein molecules causes changes in complexation. The model lipid membranes turned out to be more sensitive to laser radiation.

The results obtained can be used to understand the problem of laser photomodulation at the level of natural membranes and their model analogues.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	7
ВСТУП.....	8
1 ОСОБЛИВОСТІ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БУДОВИ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН ...	9
1.1 Фізико-хімічні особливості модельних ліпідних мембран.....	9
1.2 Клітинна мембрана дріжджів, особливості будови клітинної поверхні	17
2 СТРУКТУРНІ ЗМІНИ БІОМЕМБРАН ПІД ВПЛИВОМ ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ	24
2.1 Зміни мембранної проникності за умов впливу лазерного випромінювання ультрафіолетового діапазону (337 нм).....	24
2.2 Вплив лазерного випромінювання зеленого діапазону (532 нм) на мембрани пухлинних клітин	28
2.3 Пошкодження цілісності клітинних мембрани лазерним випромінюванням терагерцового діапазону (70,5 мкм)	30
2.4 Вплив гелій неонових лазера на біологічні мембрани.....	33
3 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	38
3.1 Клітинні об'єкти дослідження.....	38
3.2 Дослідження електричних властивостей клітинної поверхні.....	38
3.3 Модельні ліпідні мембрани як об'єкти дослідження	40
3.4 Параметри взаємодії цитохрому С з модельними ліпідними мембранами... 40	
3.5 Опромінення лазером зразків клітинних мембран та модельних ліпідних мембран	41
РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ	42
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРАСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	51

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Lc - ламелярний кристалічний субгель або тверда речовина

Lo або L β ' - рідко-впорядкований або нахилений гель

Ld або P β ' - рідинно-невпорядкований або хвилястий гель

L α - рідкокристалічний або рідинний гель

DPPC – дипальмітоїллецитин

LPC- лізофосфатидилхолін

GPI- глікозилфосфатидилінозитол

PEG – поліетиленгліколь

БТС – бромтимоловий синій

ФХ – фосфатидилхолін

КЛ – кардіоліпін

Цит С – цитохром С

He-Ne лазер – гелій-неоновий лазер

НІЛЗ- низько-інтенсивне лазерне випромінювання

ВСТУП

Фотобіомодуюча ефективність низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НЛВ) в широкому діапазоні довжин хвиль на сьогодні досліджується на різних рівнях організації живого: на прикладі одноклітинних організмів, культур клітин, клітин крові та на клітинних органелах. Лазерне випромінювання низької потужності має великі потенційні можливості в якості регулятора фізіологічних та метаболічних процесів в біологічних об'єктах і на даний час широко застосовується в галузях біології та медицини. Дослідження молекулярних механізмів впливу лазерного випромінювання дозволяє отримати перспективне рішення проблем сьогодення. З огляду на результати наукових досліджень біологічна ефективність НЛВ ґрунтується на фототермічній дії випромінювання за рахунок перетворення енергії фотонів в тепло та прояву фотохімічного ефекту лазерного випромінювання. Сучасні наукові гіпотези біологічної ефективності НЛВ пов'язані із запуском в клітинах фотосенсибілізованих молекулярних реакцій. Реакція біологічних об'єктів на дію НЛВ різних частотних діапазонів забезпечується наявністю в структурі клітинних мембран специфічних фотоакцепторів таких як порфірини, опсини, флавіни і флавопротеїни. Однак, молекулярні механізми лазерного ефекту на рівні біологічних мембран на сьогоднішній день не мають вичерпного пояснення. Дослідивши вплив лазерного випромінювання на клітинні мембрани та їх ліпідні модельні, можна з'ясувати механізм лазерної фотомодуляції на мембранному рівні.

1 ОСОБЛИВОСТІ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БУДОВИ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН

1.1 Фізико-хімічні особливості модельних ліпідних мембран

Модельні ліпідні мембрани представляють собою спрощену модель біологічних мембран. В яких імітується розташування ліпідів в природних мембранах. До модельних мембран не включають мембранні білки, так як дуже складно повторити взаємодію між білками і ліпідами, яка наявна у природніх клітинних мембранах [1]. Модельні мембрани, зазвичай, складаються з обмеженої кількості ліпідів певних властивостей, тому що досить складно охопити повне розмаїття ліпідів, яке наявне у природних мембранах [2].

Однією з моделей ліпідних мембран є ліпосоми. Ліпосоми представляють собою сферичні ліпідні везикули, які мають діаметр , який приблизно дорівнює 50-500 нм. Вони складаються з одного або кількох ліпідних бішарів, у результаті емульгування ліпідів у водному середовищі. Механізм утворення ліпідних бішарів полягає у наступному, так як фосфоліпіди є амфифільними молекулами, тобто мають гідрофільну та гідрофобну частину. Між гідрофобним хвостом і водним середовищем відбувається відштовхування і тим, самим гідрофобні хвости прагнуть «сховатися» від водної фази, а гідрофільні головки навпаки взаємодіють з водною фазою, тим самим утворюють везикули сферичної форми. У такі ліпосоми можна інкапсулювати різні малі молекули і біомолекули [3].

Ліпосоми можна виготовити з наступних ліпідів, а саме природного ненасиченого фосфатидилхоліну (ячний або соєвий фосфатидилхолін), який забезпечує низьку стабільність і високу проникність. Ліпосоми з насичених фосфоліпідів, таких як, дипальмітоїлфосфатидилхолін, є жорсткими, непроникними двошаровими структурами. Природні фосфоліпіди такі як фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, фосфатидилінозит, фосфатидилгліцерин і фосфатидна кислота, можна добути з

соевих бобів, яєчного жовтка. Ці фосфоліпіди, можна об'єднати у групу, за наступною властивістю, такою як, полярність головної групи [2].

Природні фосфоліпіди є не такі стабільні, як штучні фосфоліпіди у ліпосомах, причиною цієї не стабільності є ненасиченість вуглеводного ланцюга рис 1.1. Природні фосфоліпіди, можуть складатися з насичених і ненасичених жирних кислот. До насичених кислот відносять маргарову кислоту, пальмітинову кислоту, а до ненасичених жирних кислот можна віднести олеїнову кислоту, яка міститься у лецитині яєчного жовтка, а також 9Z-октадеценову кислоту, яка також міститься у лецитині яєчного жовтка. Фосфоліпіди, які отримані з яєць, складаються з наступних жирних кислот: стеаринової кислоти, пальмітинової кислоти, арахідонової кислоти, лінолевої кислоти та олеїнової кислоти [4].

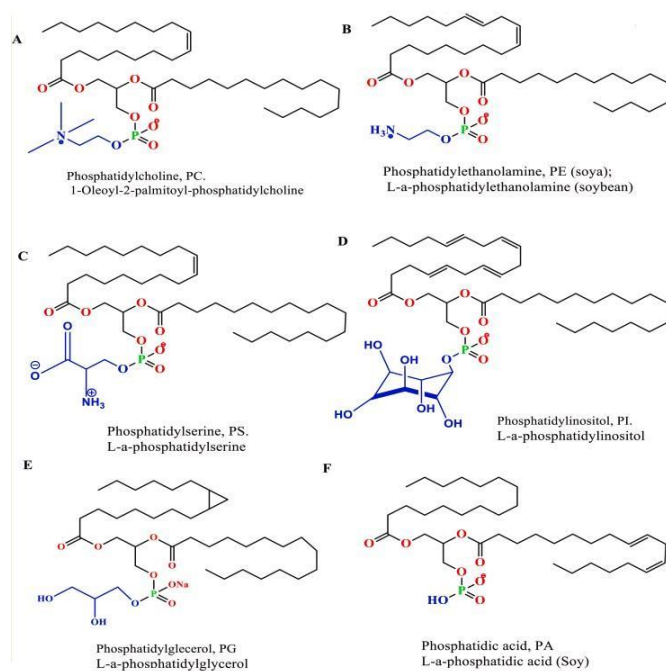


Рисунок 1.1 - Природні фосфатиди, які найчастіше використовуються для виробництва ліпосом; А) Фосфатидилхолін Б) Фосфатидилетаноламін В) Фосфатидилсерин, D) Фосфатидилінозит, Е) Фосфатидилглицерин, F) Фосфатидна кислота [4].

Також у склад ліпосом можуть включати наступні фосфоліпіди: гліцеролфосфоліпід, холестерин, сфінгомієлін. Саме гідрофільні полярні головні групи цих фосфоліпідів забезпечують загальний заряд ліпосом за фізіологічного рН розчину [5].

Перші ліпосоми були відкриті у 1960-х роках дослідником Бенгамом. Ліпосоми зазвичай складаються з фосфоліпідів, а саме з фосфатидилхолін сої або з синтетичних ліпідів, таких як діалкінліпідів або триалкінліпідів. Також важливим компонентом ліпосом є холестерин, саме він забезпечує стабільність двошарової мембрани та змінює плинність мембрани [4]. Висока концентрація холестерину збільшує середній розмір ліпосоми, що призводить до переходу від неправильної форми наночастинки до правильної сферичної форми. Також холестерин викликає зниження плинності бішару. Підвищена концентрація холестерину підвищує жорсткість ліпосомальних мембран. Отже, для стабільності мембрани потрібно, щоб концентрація становила приблизно 50 мол% холестерину [4]. Ліпосоми, що складаються з фосфоліпідів і холестерину, мають водне ядро, яке оточено ліпідним бішаром. Такі ліпосоми мають діаметр 50 – 500 нм.

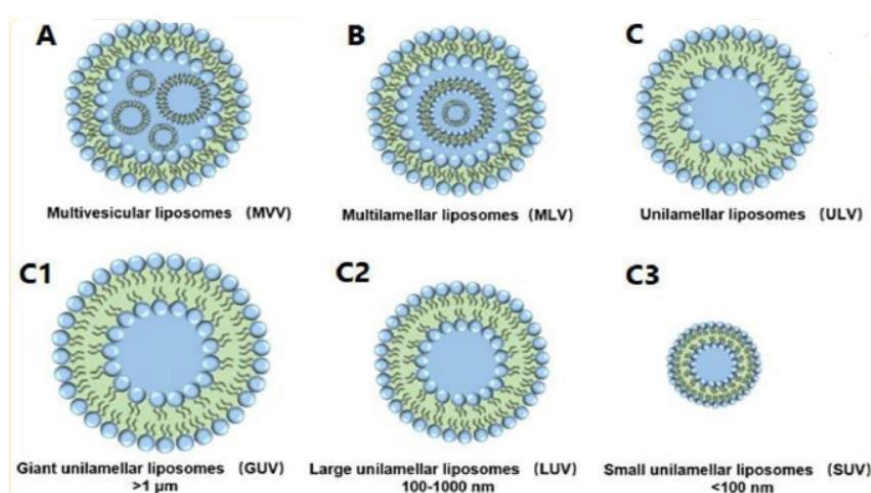


Рисунок 1.2- Класифікація ліпосом, (a) MVV, (b) MLV, (c) ULV, (c1) GUV, (c2) LUV, (c3) SUV [3].

Ліпосоми можна класифікувати на 4 основних різновиди, на основі розміру ліпосом і кількості подвійних шарів: 1. малі одношарові везикули, 2. великі одношарові везикули, 3. багатшарові везикули, 4. мультивезикулярні везикули рис. 1.2 [4].

Існує декілька методів утворення ліпосом. Для всіх цих методів наявно декілька загальних етапів:

1. Висушування ліпідів із органічного розчинника;
2. Диспергування ліпиду у водному середовищі;
3. Очищення ліпосоми;
4. Аналіз кінцевого продукту.

Механізм утворення малих одношарових везикул. Одним з найпоширенішим механізмом утворення малих одношарових везикул є методологія твердої дисперсії. Цю методологію можна розбити на декілька етапів: перший етап: солюбілізація ліпідів в органічному розчиннику, другий етап: випаровування під низьким тиском з подальшим утворенням тонкої гідратованої плівки. Сам процес гідrataції призводить до утворення колоїдного, каламутного, неоднорідного розчину. Він утворений багатшаровими великими везикулами, діаметр, яких складає від 400 нм до 0,1 мм. Третій етап полягає у тому, що нам потрібно з багатшарових великих молекул отримати одношарові малі везикули. Для отримання одношарових малих везикул найчастіше використовують метод екструзії, або ж використовують інший метод, який вимагає застосування вихрового апарату, та обробку багатшарових великих везикул ультразвуком. [6].

Метод утворення багатшарових везикул. Для створення багатшарових ліпосом використовують як мінімум два типи ліпідів: нейтральний ліпід, наприклад, дигліцерид, тригліцерид рослинну олію, і амфіпатичний ліпід. Для створення багатшарових ліпосом не використовують негативно заряджений ліпід, так як він перешкоджає агрегації ліпосом [7]. Приклад утворення багатшарових везикул: суміш ліпідів лецитину, холестерину, діцетилфосфат, які були розчинені у хлороформі, випаровували при низькому тиску і

температурі 37⁰С. Утворену тонку плівку диспергували і витримували при температурі гідратації протягом 12 годин, і фільтрували через мембрану 64 мікрони [7].

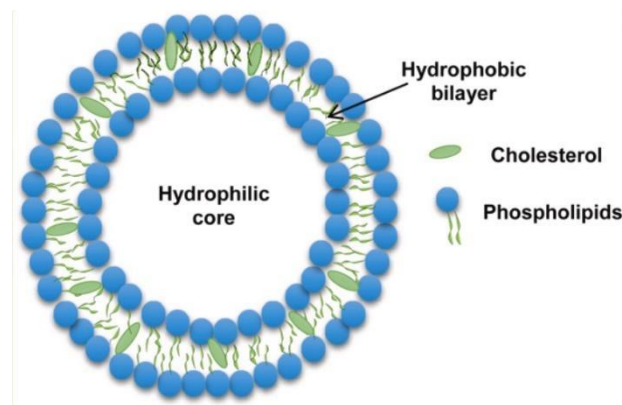


Рисунок 1.3 -Схематичне зображення ліпосом [4].

За зарядом ліпосоми можна поділити на 3 групи: 1. Аніонні ліпосоми (негативно заряджені ліпосоми), 2. катіонні ліпосоми (позитивно заряджені ліпосоми), 3. Нейтральні ліпосоми. Заряд ліпосоми залежить від заряду ліпідів, які входять у ліпосому. Заряджені ліпосоми мають високу ліпосомальну стабільність при зберіганні, через те, що заряджені частинки відштовхуються один від одного, тим самим знижують агрегаційну здатність. Зазвичай катіонні ліпосоми застосовують у генній терапії, оскільки ліпосоми здатні інкапсулювати нуклеїнові кислоти завдяки тому, що відбувається електростатичне притягання нуклеїнових кислот і ліпосом, бо катіонні ліпосоми мають позитивний заряд, а нуклеїнові кислоти, навпаки, мають негативний заряд [3].

Механічні властивості модельних ліпідних бішарів. Подвійні шари можуть проявляти властивості матеріалу, які на пряму залежить від їх хімічного складу, можливості адаптації до фізичних змін, а саме до температури, рН, тиску. При нагріванні ліпіди можуть енергетично реорганізуватися, це можливо завдяки енергетичній реорганізації основного ланцюга плавлення, що призводить до фазового переходу з гелю в рідкий кристал, який супроводжується великою ентропійною зміною. Також у водному середовищі модельні ліпіди

можуть самоорганізуватися і утворювати кілька типів ліпідних подвійних шарів [8].

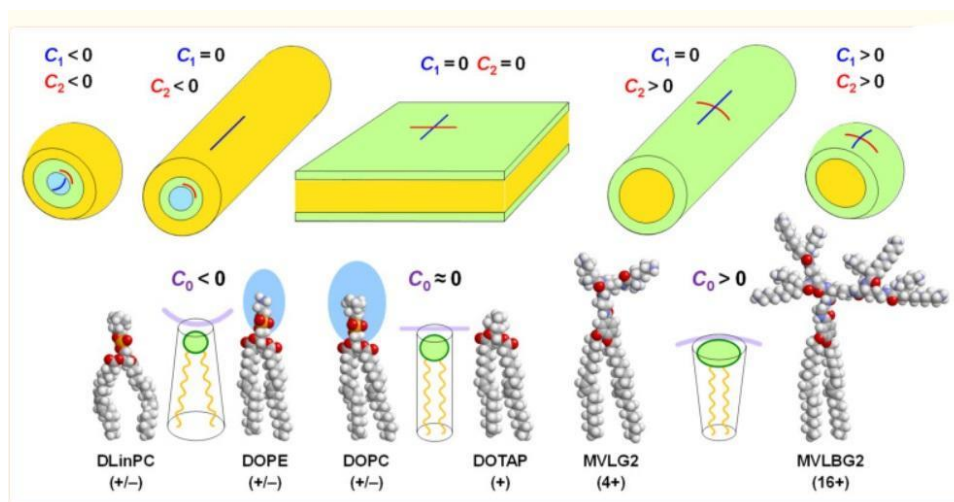


Рисунок 1.4 - Зв'язок між формою ліпідів та їх самозбіркою. Ліпіди обернено-конусоподібної розташовані ліворуч на рисунку; циліндричні ліпіди розташовані у центрі рисунку; конусоподібні ліпіди розташовані праворуч на рисунку. [8]

Самоорганізація ліпідних шарів залежить від форми фосfolіпідів. Можна виокремити декілька форм фосfolіпідів: циліндричну, зворотнього конусу, конусу рис.1.5. Форма фосfolіпиду визначається відношенням площі головної групи до площі хвоста, якщо площа головної групи приблизно дорівнює площі хвоста, то тоді маємо циліндричний фосfolіпід. Ліпіди циліндричної форми збираються у пластинчасті двошарові структури, такі як пластинчасті ліотропні фази (при низькому вмісті води) або великі одно- та багатошарові везикули (при надлишку води). Якщо площа головної групи менша за площу хвоста, тоді будемо мати фосfolіпід, який має форму зворотнього конусу. Такі ліпіди можуть утворювати циліндричні міцели або сферичні міцели [8].

При зміні температури відбувається фазовий перехід ліпідів, а також ліпідних бішарів. Розглянути фазовий перехід можна на прикладі дипальмітоїл-фосфатидилхоліну. Для даного ліпиду характерні чотири фазові переходи: L_s , L_o або $L\beta'$, L_d або $P\beta'$ і L_α . Температурою переходу для дипальмітоїл-

фосфатидилхоліну складає близько $41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\sim 315\text{ K}$). Якщо спостерігається температура нижче за температуру переходу тоді головні групи є динамічно неупорядкованими, а ацильні ланцюги є щільно упакованими і нахиленими. Збільшуючи температуру до температури переходу відбувається перехід від фосфоліпідного гелю в рідину, це відбувається завдяки тому, що нахилені ацильні ланцюги втрачають свою щільну упаковку, тобто відбувається конформаційна зміна, яка зумовлена обертальною транс-гош-ізомеризацією метильних груп. При низьких температурах дипальмітоїл-фосфатидилхолінові бішари є жорсткими та компактними ($L\beta'$ -фаза), ліпіди розміщуються у нахиленій решітці в площині бішару. У цій конфігурації вуглеводні ланцюги знаходяться у транс-конфігурації. Змінюючи температуру до $34\text{--}36\text{ }^{\circ}\text{C}$, відбувається попередній перехід, від фази $L\beta'$ -фаза до пульсуючої фази, в якій головні групи скупчені, розташовані в періодичному хвилястому бішарі, і, ймовірно, деякі ліпіди нахилені, тоді як інші розплавлені, неупорядковані. Далі пульсуюча фаза переходить у $L\alpha$ -фазу. Під дією напруги можна спостерігати, що ліпідні бішари можуть піддаватися додатковому переходу, якщо шари знаходяться у рідкій та пульсуючій фазах, що призводить до потоншення бішару та міжляменарної інтердигітації, а ось у гелевій фазі дві ламері залишаються добре розділеними і при цьому не відбувається зменшення товщини бішару [9].

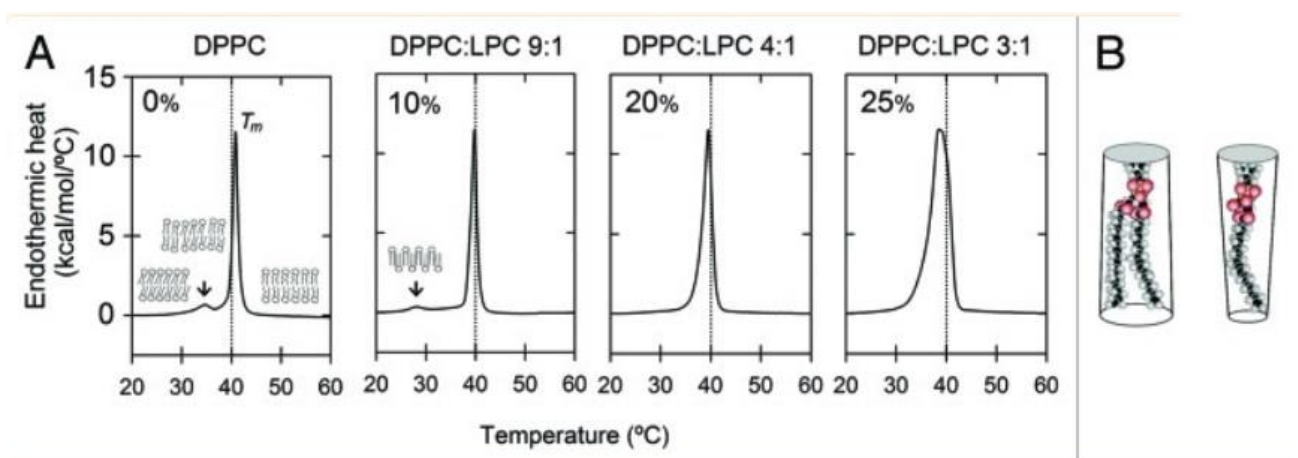


Рисунок 1.5 - Вплив LPC на фазовий перехід (зміна теплоємності) DPPC MLVs, виміряний диференціальною скануючою калориметрією. (А) Термограми DPPC

за відсутності (0%) або присутності 10, 20 або 25 мол.% LPC при вказаних температурах. Стрілки показують зміщення передперехідної температури (T_p), яка визначає фазу пульсацій ($P\beta'$) у чистому DPPC. Новий попередній перехід з'являється при більш низьких температурах (ймовірно, вказує на міжпальцеву фазу гелю, $L\beta I$), потім він зникає при високих дозах LPC. У (B) структурний фактор для циліндричного DPPC ($S_i = 1,11$) і LPC у формі перевернутого конуса ($S_i = 0,78$) [9].

На рис.1.6 представлено термотропну поведінку багатошарових везикул, які утворені з дипальмітоїл-фосфатидилхоліну, який змішений з різними концентраціями лізофосфатидилхоліну. При мікромольних дозах лізофосфатидилхоліну термограми майже не відрізняються від контролю. Якщо концентрація лізофосфатидилхоліну більше 10 мол.% наявне розширення передперехідного піку і незначне зміщення основного переходу. При концентраціях лізофосфатидилхоліну 25 мол.% знижується температура переходу. Передперехідний пік зміщується до нижчих температур і потім повністю зникає при концентрації лізофосфатидилхоліну 20 мол.%, що свідчить про появу нової інтердигіталізованої фази. При концентрації 50 мол.% відбувається руйнація бішару і утворення дрібних агрегатів. Звідси можна зробити висновок, що висока концентрація лізофосфатидилхоліну запобігає обертанню полярних головних груп, завдяки цьому відбувається передперехід у бішарах. При високих концентраціях лізоліпідні мають високий ступінь зміщуваності, змінюють термотропний профіль дипальмітоїл-фосфатидилхоліну і створюють міцеляризацію ліпідних бішарів [9].

1.2 Клітинна мембрана дріжджів, особливості будови клітинної поверхні

Кожна клітинна має мембрану, яка є основним бар'єром, який розділяє внутрішньо клітинне середовище від зовнішнього середовища [10].

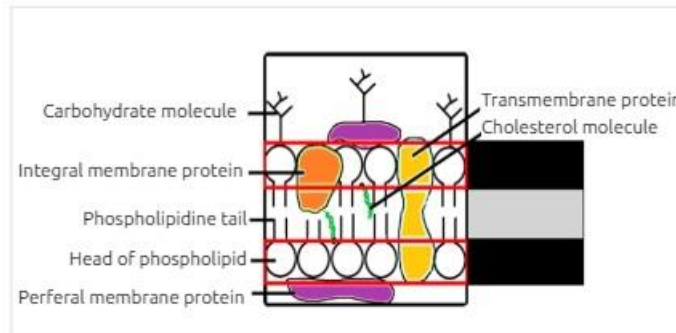


Рисунок 1.6 - Структура бішарової мембрани. Зовнішні темні області відповідають гідрофільним головкам молекул фосфоліпідів, тоді як світліша область у середині відповідає гідрофобним хвостовим цих молекули. Білки знаходяться в мембрані або на периферія мембрани; вуглеводи є зв'язаними з білками або ліпідами [11]

На сьогодні найкращою моделлю, яка описує структуру клітинної мембрани є модель рідкої мозаїки рис. 1.6, яка показує, що у біологічній мембрані присутні ліпіди, білки, вуглеводи. Скелет мембрани утворений ліпідами, а саме фосфоліпідами, які у своїй структурі мають гідрофільну головку і гідрофобний хвіст [11].

У клітинах дріжджів мембрана оточена клітинною стінкою. Клітинна стінка має розмір приблизно 120 нм . Клітинна стінка має два шари: 1. Зовнішній шар, 2. Внутрішній шар. Зовнішній шар складається з високоглікозильованих білків, а внутрішній шар є мікрофібрилярним і “-глюканазним”. Також до складу клітинної стінки також входять 3 різні полісахариди, а саме манан, глюкан, хітин [12]. Усі 3 полісахариди пов'язанні між собою і утворюють певну мережу. У клітинні стінці близько 40 – 50% ланцюгів хітину утворюють зв'язок з глюканом. Якщо порівнювати співвідношення хітин- $\beta(1\rightarrow3)$ -глюкан до загальної кількості зв'язків у клітинній стінці, то результат становить один хітин-глюкановий

зв'язок на 8 000 гексозних одиниць [13]. Співвідношення у хітину до глюкану становить 1:10. Основним компонентом, який присутній у клітинній стінці є β 1,3 глюкан має спіралеподібну конформацію і утворює фіброзну мережу, внутрішнього шару стінки, і аморфні компоненти. Також у клітинній стінці дріжджів присутній α хітин. Структура α хітину подібна до структури α целюлози, чим саме забезпечує неможливість проникнення води у клітину. Маннопротеїни представляють собою N-гліканові ланцюги, які з'єднанні з ядром і які мають високий вміст манози. [14].

Клітинна стінка тісно пов'язана з мембраною дріжджів. Коли відбувається порушення клітинної стінки через зовнішні чинники, такі як високий вміст солі, гліцину у зовнішньому середовищі, призводять до зневоднення клітини, це призводить до розтягування плазматичної мембрани, що у свою чергу призводить до порушення транспортних процесів. Клітинна стінка пов'язана з плазматичною мембраною через інтегральні, швидше за все, GPI-закріплені глікопротеїни, при набуханні мембрани або скороченні мембрани, клітинна стінка змінює свою еластичність. Також існує певний зв'язок між пористістю клітинної стінки та текучістю мембрани [15].

Цитоплазматична мембрана дріжджів є бішаровою структурою, яка складається з ліпопротеїдів, а також білків. Товща мембрани дріжджів зазвичай складає приблизно 8 нм. Мембрана містить від 5,4 до 6,4 % фосфоліпідів і 26% ергостеролу від загальної кількості ліпідів. Цитоплазматична мембрана дріжджів може бути гладкою і складчастою в залежності від віку і фізіологічного стану дріжджів. Складчаста форма мембрани створює інвагінації, які звернені всередину цитоплазми. Завдяки цитоплазматичній мембрані дріжджі можуть здійснювати піноцитоз, екзоцитоз, фагоцитоз. Процес піноцитозу полягає у тому, що клітина дріжджів може захоплювати із зовнішнього середовища краплини білкових розчинів, розчинів ліпідів і вуглеводів. Фагоцитоз – це процес захоплення твердих частинок з зовнішнього середовища, а екзоцитоз – це процес видалення з клітини шлаків у периплазматичний простір [15].

Плазматична мембрана містить різні за розміром і складом ліпіди. Основні класи, які містять мембрани, це гліцерофосфоліпіди, сфінголіпіди та стероли. Всі гліцерофосфоліпіди мають загальну будову, а саме полярну головку, яка представлена фосфатною групою і гліцерином, а гідрофобний хвіст представлений двома жирними кислотами. Полярна головка приєднана до першого і другого атому карбону жирних кислот складноєфірними зв'язками. Гідрофобні хвости орієнтовані всередину, тим самим залишаючи гідрофільні головки назовні, які контактують з водою. Таке розташування ліпідів дозволяє розмежовувати клітинні органели і закріплювати на поверхні мембрани багато важливих молекул [16].

Ліпіди плазматичної мембрани дріжджів розташовані асиметрично і поперек ліпідного бішару. Внутрішня складка дріжджів збагачена фосфатидилетаноламіном, фосфатидилінозит і фосфатидилсерин [15]. Фосфатидилсерин є аніонним фосфоліпідом, також він зв'язується з різними білками, бере участь у активації ферментів, процесі апоптозу [17]. Фосфатидилінозитол, складається з двох жирних кислот, які приєднанні до гліцерину, який зв'язаний з групою інозиту. [16]

Сфінголіпіди складають 30% від загального вмісту фосфоліпідів. Основними жирними ацильними ланцюгами є пальмітинова кислота і стеаринова кислота. Упакування жирних ацильних ланцюгів визначає текучість мембрани. Упакування ланцюгів збільшується зі збільшенням довжини ацильних ланцюгів і зменшенням ступені ненасиченості, що призводить до більш упорядкованої структури та зниження текучості [15]. Збурення бішару, яке може відбуватися завдяки зниженню температури, підвищенню гідростатичного тиску або додавання стеринів, призводить до зменшення текучості мембрани. Фізіологічна значущість текучості, полягає у можливості адаптації дріжджів до змін навколишнього середовища.[15] Також мембрана має динамічність. Ця динамічність пов'язана з тим, що ліпіди і білки можуть дифундувати через мембрану. Фосфоліпіди можуть швидко просочуватись у подвійному шарі, а

також вони можуть обертатися навколо своєї осі голова-хвіст, завдяки тому, що гідрофобні хвости є дуже гнучкими [18]

Мембранні білки також можуть рухатися у подвійному шарі, цей рух є латеральним, швидкість їх руху може змінюватися і вона є повільнішою за швидкість ліпідів [18]. У подвійному ліпідному шарі, також присутній і вертикальний рух ліпідів і білків, так званий “переворот”, цей рух також є повільним. Це пов’язано з тим, що існує певний енергетичний бар’єр, який виникає при просуванні гідрофільної головки у ліпідів або гідрофільної області у білку, через гідрофобне середовище внутрішньої сторони мембрани. Ця неможливість вертикального руху дозволяє подвійному бішару підтримувати різні композиції білків та дозволяє мембранним білкам перебувати у правильній орієнтації для функціонування. [18]

Мембранні ліпіди є незмінно поліморфними, іншими словами вони можуть існувати у різних поліморфних формах. Ця поліморфна форма залежить від структури самої молекули, ступеню її гідратації, рН середовища, температури, тиску, іонної сили [19]. Розмір головної групи визначає фазовий стан мембрани, за фізіологічних умов мембрана дріжджів має фазовий стан рідкого кристала. Як зазначалося у попередньому розділі, фазовий стан мембрани визначається формою ліпідів. Міоїнозитол, холін, серин, сфінголіпіди мають циліндричну форму і гарно організовані у ліпідних шарах. Стерин, фосфатидилетаноламін, мають форму конусу і можуть утворювати у розчині інвертовані міцели. Якщо мембрана містить високі концентрації даних ліпідів, то спостерігається дефект ущільнення упаковки і високий коефіцієнт викривлення мембрани, що призводить до того, що мембрана не зможе виконувати якісно бар’єрні функції, тоді у мембрану зможуть легко вбудовуватися білки. Стерини у плазматичній мембрані визначають її жорсткість, яка впливає на бічний рух і активність мембранних білків. Стерини також створюють умови, при яких у плазматичну мембрану можуть вбудовуватися поліпептиди [15]. Фазові переходи можуть бути тим інструментом для живих систем, завдяки якому вони можуть контролювати свої функції [20]. Завдяки фазовим переходам ліпідний шар стає

більш м'яким, провідним і краще накопичує тепло і ефективніше підтримує хімічні реакції [20].

Ліпіди взаємодіють з білками і можуть впливати на структуру, функцію, асоціацію та конформаційну гнучкість білків. Наприклад, кільцеподібний ліпід, який взаємодіє з білками для підтримання функціональної конформації білків, ця взаємодія відбувається електростатично між гідрофобними полярними частинами фосфоліпідів і білками [15].

Взаємодія може демонструватися через неоднорідність біологічної мембрани, ця неоднорідність зумовлена тим, що в мембрані наявні холестерини і глікосфінголіпіди, які утворюють мікродомени, саме з цими мікродоменами взаємодію мембранні білки. Ця компартментизація ліпідних мікродоменів і мембранних білків є центрами для передачі сигналів на мембрані [21].

Білки у мембрані розташовуються асиметрично. Одні білки пронизують мембрану повністю, а інші частково вбудовуються у мембрану і виступають назовні. У плазматичній мембрані знаходяться білки, що беруть участь у транспорті поживних речовин, передачі сигналів, закріплення цитоскелету, синтезу компонентів зовнішньої мембрани. Ренк і Робертсон завдяки використанню ізольованих і очищених фракції плазматичної мембрани змогли оцінили в цілому близько 150 унікальних поліпептидів. [15]

Але існують певні ферменти, які полегшують процес переміщення ліпідів з однієї сторони мембрани на іншу сторону. Ці ферменти, називають фліппази або транслокатоли фосфоліпідів, вони використовують енергію АТФ для переміщення ліпідів через подвійний шар з однієї сторони на іншу сторону [18].

Сили міжмолекулярної взаємодії в біологічній мембрані. 1. Сили Ван-дер-ваальса. Сили Ван-дер-ваальса діють між вуглеводними хвостами ліпідів і ці сили походять від кореляції руху електронів, які знаходяться на зовнішніх оболонках різних атомів. Сила Ван-дер-ваальса є слабкою силою, зі збільшенням ланцюга ван-дер-ваальсівські сили стають сильнішими. Фосфоліпіди мембран містять від 14 до 16 атомів вуглецю. Такої довжини фосфоліпідів достатньо для забезпечення стабільності молекули і високої проникності, але насичені

вуглеводні хвости при фізіологічних умовах є твердими. Саме з цієї причини у еукаріотичних клітинах цис-подвійні зв'язки розташовуються у центрі вуглеводних ланцюгів. Це створює перегини у ланцюгах, завдяки цьому підвищується температура плавлення мембрани, перериваючи сили Ван-дер-Ваальса [22].

2. Гідрофобні ефекти. Мембрани стабілізуються взаємодіями між вуглеводневими ланцюгами амфіфілів та водою, які називаються гідрофобними ефектами. Гідрофобний ефект полягає у тому, що введені у воду вуглеводні ланцюги порушують структуру води і це в свою чергу, пов'язано з витратами вільної енергії. Щоб звести до мінімуму витрати вільної енергії вуглеводні ланцюги агрегують, зменшуючи свою поверхню, яка взаємодіє з водою до мінімуму. Це призводить до того, що відбувається утворення структурованих агрегатів у яких гідрофобні ланцюги орієнтовані всередину, а гідрофільні групи взаємодіють з водою. Амфіфіли з короткими ланцюгами мають здатність до утворення міцел, а якщо довжина ланцюга збільшується, то ліпідні подвійні шари стають більш стабільними [22].

3. Електростатичне поле. Електричне поле у мембранах утворюється завдяки різниці концентрації іонів всередині та зовні клітини, зазвичай у клітинах дріжджів це іони Na^+ і K^+ , завдяки цьому утворюється градієнт дифузного потенціалу, який перпендикулярний до мембрани [23]. Коли заряджена молекула розміщується у ліпідному бішарі, то ця молекула утворює навколо себе подвійне електричний шар, цей шар може бути еквівалентним електричному шару диполя у певних випадках. Можна регулювати інтенсивність еквівалентних диполей, а саме змінювати довжину екранування Дебая- Хюккеля, цю зміну довжини можна здійснити шляхом регулювання іонної сили розчину. Утримання зарядженої молекули у ліпідному бішарі генерує локальні неоднорідні електростатичні поля величиною $10^7 - 10^7 \text{ В} \times \text{м}^{-1}$ [23].

Мембрана має заряд, основний вклад в заряд мембрани вносять фосфоліпіди. Як вже говорилося раніше ліпіди у мембрані розташовуються асиметрично. Негативно заряджені фосфоліпіди, а саме фосфатидилсерин і

фосфатидилінозитол, фосфатидилетаноламін в основному зосереджені на внутрішній поверхні мембрани і створюють статичний негативний поверхневий потенціал -25 мВ, тобто внутрішня поверхня мембрани заряджена негативно. Завдяки цьому потенціалу до мембрани притягуються позитивно заряджені молекули з цитоплазми, а молекули з негативним зарядом, навпаки, відштовхуються від біологічної мембрани. [10].

Заряд ліпідів впливає на властивості мембран, а саме впливає на порядок і еластичність мембрани. Аніонні ліпіди збільшують впорядкованість ланцюгів фосфатидилсерину, а також збільшують жорсткість подвійного шару [24].

2 СТРУКТУРНІ ЗМІНИ БІОМЕМБРАН ПІД ВПЛИВОМ ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ

2.1 Зміни мембранної проникності за умов впливу лазерного випромінювання ультрафіолетового діапазону (337 нм)

Лазерне випромінювання ультрафіолетового діапазону впливає на мембрану, а саме руйнує цілісність мембрани [25], що призводить до загибелі клітин. Опромінення лазером 337 нм спричиняє руйнацію мембрани, що в свою чергу приводить до апоптичної загибелі клітини.

На прикладі клітин NG108 досліджували вплив лазерного ультрафіолетового випромінювання $\lambda=337$ нм з тривалістю імпульсу 3 нс на виживаність клітин [26]. Порівнювали життєздатність двох груп клітин: контрольної і опроміненої протягом 12 годин. У кожній групі налічувалося по 50 клітин.

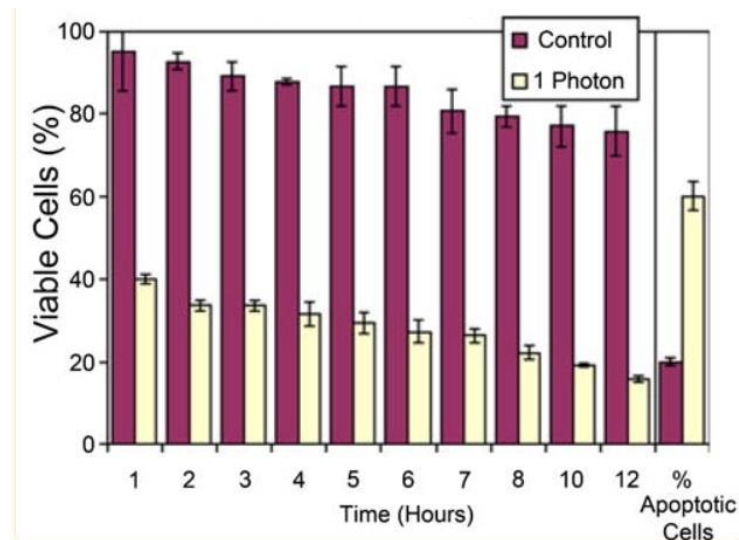


Рисунок 2.1 - Гістограма, що показує життєздатність контрольних клітин NG108 і клітин, які зазнали опромінення. Кожний стовпець показує кількість живих клітинок у заданий час [26].

На рис.2.1 представлені показники виживаності клітин в проміжку між 1 і 12 годинами після опромінення. Через 1 годину після опромінення в досліджуваній групі спостерігалось 39% клітин, які вижили, а у контрольній групі - 95% виживаних клітин. Після 12 годин спостереження в опроміненій групі виявлено 16% клітин, які були життєздатними, порівняно з 76% у контрольній групі клітин. Співвідношення кількості клітин, які загинули між 1 і 12 годинами, в групі опромінених клітин та клітин контрольної групи становить ~3:1. Цей результат свідчить про те, що лазерне опромінення клітинної мембрани впливає не лише на короточасну життєздатність клітин, але й може призвести до апоптичної загибелі клітин через деякий час після опромінення [26].

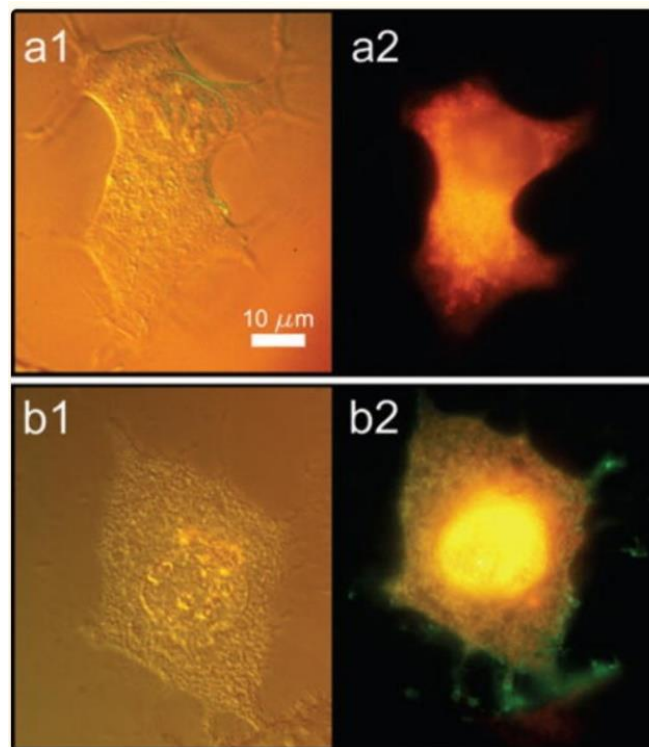


Рисунок 2.2 - Аналіз апоптозу. Панелі a1 і a2 являють собою зображення життєздатної клітини. Панелі b1 і b2 являють собою зображення іншої клітини, яка зазнає апоптозу, [26].

З метою виявлення життєздатних клітин були застосовані барвники. При пошкодженні мембрани вона стає проникною для великих молекул, наприклад, для етидію. Етидій та кальцеїн використовували для виявлення мертвих та

життєздатних клітин. Етидій проникаючи крізь мембрану взаємодіє з ДНК і фарбує клітину у помаранчевий колір рис. 2.2. Кальцеїн проникаючи крізь мембрану піддається розщепленню клітинними естеразами, у результаті чого цитоплазма клітини забарвлюється у зелений колір рис. 2.2. Тобто якщо клітинна є життєздатною, то її цитоплазма має зелений колір, а якщо клітинна є мертвою, то її ядро має помаранчевий колір [26].

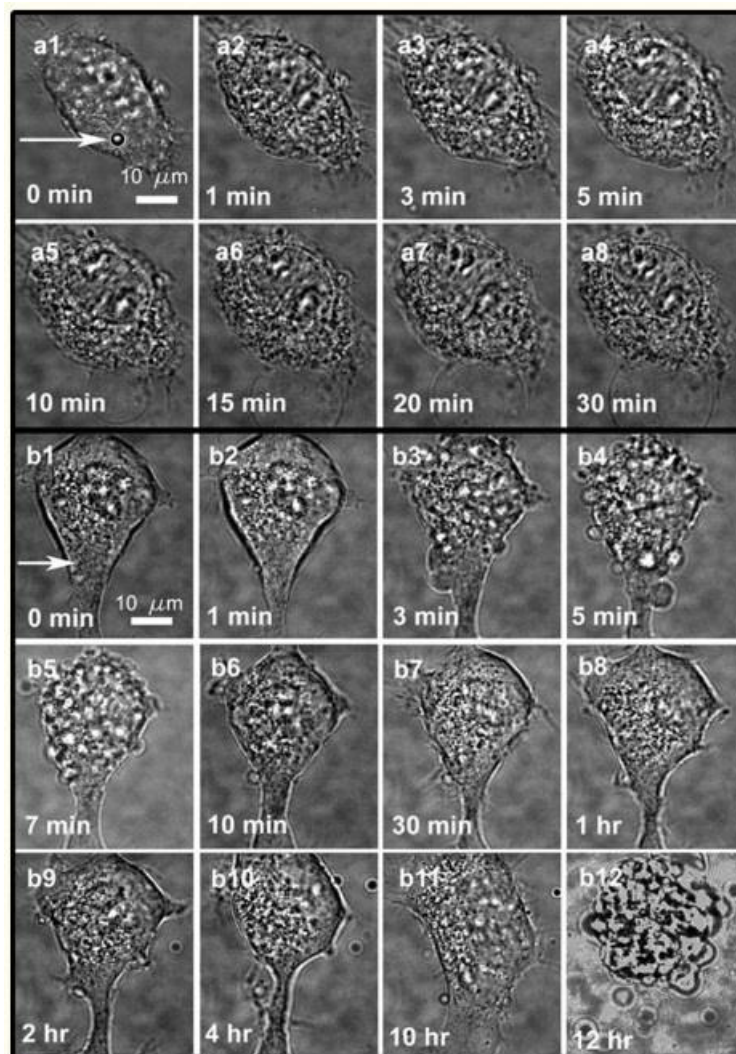


Рисунок 2.3 - Моніторинг морфологічних змін після руйнування мембрани одним наносекундним імпульсом УФ-лазера. [26].

Також у цьому дослідженні було представлено морфологію клітин, так як вона дає інформацію для визначення апоптичних клітин. Загиблі клітини часто утворюють великі мембранні бульбашки, які втрачають здатність прилипати до поверхні, розвивають зернисту цитоплазму, мають конденсацію ядра, і також мають більш сферичну форму. На рис.2.3 показані спостереження за однією клітиною протягом 30 хвилин (a1–a8) після опромінення (a1), спочатку клітина збільшила зернистість цитоплазми (a2–a8), далі утворила велику мембрану бульбашку та загинула (a5–a8). Іншу клітину спостерігали 12 годин після опромінення (b1–b12), спочатку ця клітинна утворила бульбашку (b3–b5), далі відновилася (b6–b11), але в кінці зазнала апоптозу (b12) [26].

Можна зробити висновок, що ультрафіолетове випромінювання довжиною хвилі 337 нм викликає пошкодження мембрани клітин NG108. Ці пошкодження приводять до того, що одні клітини гинуть майже одразу, за рахунок апоптозу, інші клітини зазнають апоптозу через деякий час після опромінення.

2.2 Вплив лазерного випромінювання зеленого діапазону (532 нм) на мембрани пухлинних клітин

Авторами [27] проведено дослідження впливу лазерного випромінювання з довжиною хвилі 532 нм на біомембрани пухлинних клітин. Це дослідження [27] присвячено вивченню циркулюючих пухлинних клітин у крові та лімфатичній системі людини. Надмірне поглинання лазерного опромінення викликає локалізоване лазерне тепло у клітині, що у свою чергу приводить до утворення бульбашок у клітині і це спричиняє пошкодження плазматичної мембрани, таким чином дозволяє меланіну витікати з клітини. Непошкоджені клітини визначали за допомогою трипанового синього. Трипановий синій є негативно зарядженим і не взаємодіє з клітиною, якщо мембрана не пошкоджена. [27].

Механізмом лазерного пошкодження клітинної мембрани є розширення бульбашок навколо меланосом усередині пухлинної клітини, яке спричинене випромінюванням. Індуковані лазером бульбашки мають два можливі механізми утворення: кипіння або кавітація. Механізм утворення бульбашок полягає у тому, що клітини меланоми мають високу кількість меланосом, які містять меланін. Ці меланосоми є центрами зародження утворення бульбашок. Коли бульбашки навколо окремих меланосом розширюються, то вони зливаються, утворюючи більші за розміром бульбашки, які пошкоджують клітину мембрану. Для киплячої нуклеації пороговий флюенс для утворення бульбашок зменшується лінійно зі збільшення температури навколишнього середовища для різної тривалості лазерного імпульсу. Утворення бульбашки навколо меланосоми під час імпульсу тривалістю 12 нс на довжині хвилі 532 нм, відбувається, коли температура досягає значення 136 ± 23 °C [27].

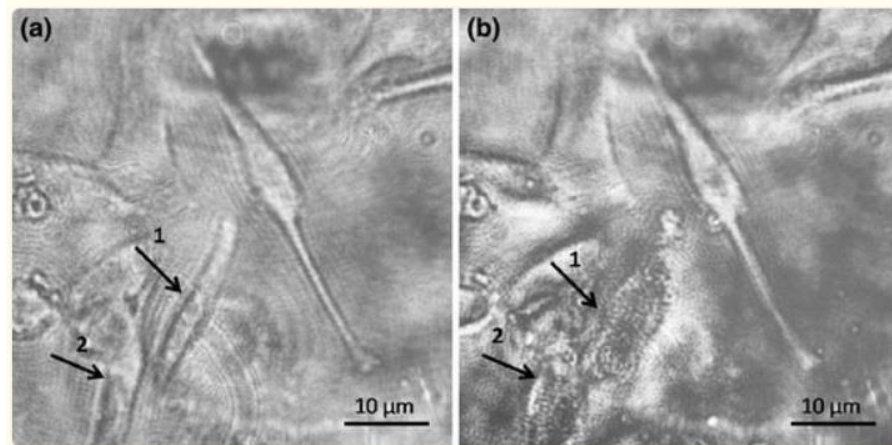


Рисунок 2.4 – Клітини меланому (а) до і (b) через 50 нс після одного лазерного імпульсу тривалістю 6 нс, $\lambda = 532$ нм, $0,65$ Дж/см². Стрілки в (а) показують непошкоджені клітини лазерним впливом, тоді як стрілки в (b) чітко показують клітини, де плазматична мембрана була повністю зруйнована мікробульбашками, викликаними лазерним імпульсом [27]

На рис. 2.4 наведено зображення до та через 50 нс після опромінення за допомогою лазерного імпульсу тривалістю 6 нс з флюенсом $0,65$ Дж/см² при $\lambda = 532$ нм. Стрілки на рис.2.4а показують клітини меланому до лазерного впливу, які не мають пошкоджень. Стрілки на рис.2.4b показують ті, самі клітини після лазерного опромінення, коли плазматична мембрана була пошкоджена [27].

При опроміненні лазером з довжиною хвилі 532 нм кількість непошкоджених клітин зменшилася на 40% порівняно з контрольними клітинами. Вживаність клітин зменшувалась пропорційно зі збільшенням потоку енергії лазера з довжиною хвилі 532 нм [27].

Отже, можна зробити висновок, лазерне опромінення з довжиною хвилі 532 нм викликає пошкодження плазматичної мембрани пухлинних клітин. Ці пошкодження, викликані лазерним опроміненням, спричиняє витік меланіну з клітини у позаклітинне середовище.

2.3 Пошкодження цілісності клітинних мембрани лазерним випромінюванням терагерцового діапазону (70,5 мкм)

Терагерцове випромінювання спричиняє пошкодження цілісності мембрани. Пошкодження мембрани нейронів визначали за допомогою трипанового синього. До клітинної суспензії, яку не опромінювали додавали трипановий синій, за допомогою трипанового синього, визначили, що кількість клітин з порушенням морфології становила 2% від загального числа нейронів в камері. Потім цю ж саму камеру опромінювали лазером терагерцового діапазону (130 мкм) середньою потужністю 10 мВт/см^2 . Далі було визначено, що відсоток зафарбованих клітин синього кольору не збільшився порівняно з відсотком зафарбованих клітин до опромінення, але $28 \pm 3\%$ рис.2.5 клітин мали ділянки помірного блакитного кольору. Таким чином опромінення клітин не призвели до загибелі клітин, але спричинило пошкодження цілісності мембрани, що були достатніми для проникнення трипанового синього у клітину [28].

Другу серію досліджень проводили з допомогою барвника Lucifer Yellow, який має більший квантовий вихід. Готували три камери: 1. Культура нейронів з додаванням барвника Lucifer Yellow, яка не піддавалася опроміненню, 2. Культура клітин з барвником Lucifer Yellow, яка піддавалася опроміненню, 3. Культура клітин з барвником Lucifer Yellow і гістохромом, яка також піддавалася опроміненню. Після опромінення 2 камери виявилось, що $87 \pm 4\%$ рис.2.5 нейронів були однорідно забарвлені жовтим кольором. Цей барвник може потрапити усередину клітини, через пошкоджену мембрану. Забарвленість мембрани свідчить про те, що опромінення лазером викликає пошкодження цілісності мембрани. Ці пошкодження викликані окисненням ліпідів.. У 3 камері не було виявлено однорідно забарвлених клітин. У деяких клітинах ($6 \pm 2\%$) спостерігалися поодинокі зони флуоресценції рис. 2.5. Тобто можна зробити висновок, що дія гістохрому блокує утворення і розвиток гідрофільних пор у мембрані, викликаних лазерним опроміненням. У контрольній камері з барвником Lucifer Yellow, яка не піддавалася лазерному опроміненню,

флуоресцентних клітин не виявлено. Для того, щоб перевірити характер пошкодження клітин, використовували барвник трипановий синій, його додавали до камери в якій знаходилися клітини оброблені Lucifer Yellow і гістохромом, які були опроміненні. Основна маса клітин у камері не продемонстрували флуоресценцію. Ці дані вказують на те, що шкідливий вплив випромінювання на довжині хвилі 130 мкм є оборотним і дане випромінювання не є смертельним для нейронів. [28].

Непошкоджені клітини перевіряли за допомогою барвника BCECF-AM. Барвник BCECF-AM може проникати крізь непошкоджену мембрану і перетворюється усередині клітини на флуоресцентну форму BCECF. Була виявлена флуоресценція барвника BCECF-AM від клітин, які були оброблені Lucifer Yellow і опроміненні лазером, це свідчить про те, що цілісність мембрани нейронів відновлюється після пошкодження, спричиненого впливом випромінювання з довжиною хвилі 130 мкм [28].

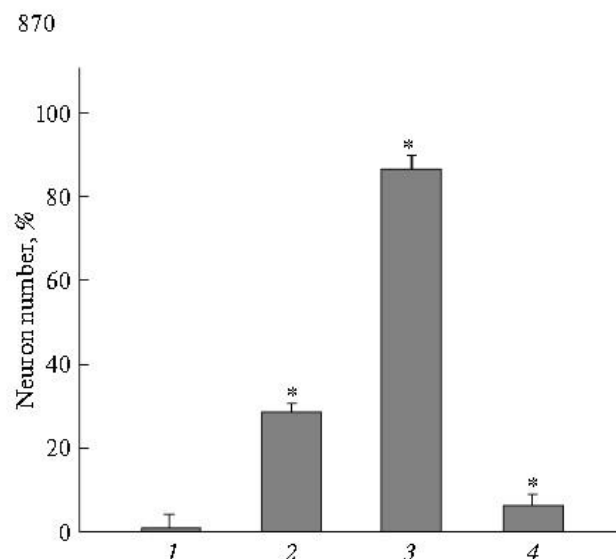


Рисунок 2.5 - Відсоток нейронів *Lumnaea stagnalis* з гідрофільними порами, утвореними в поверхневій мембрані під дією терагерцового (субміліметрового) лазерного випромінювання, визначають за допомогою вітальних барвників. По

осі ординат відображають відсоток клітин з інгресованим барвником від загальної кількості досліджених клітин. По осі абсцис показано (1) клітини з LuciferYellow у середовищі, які не піддавалися лазерному випромінюванню. (2) Trypan Blue, (3) Lucifer Yellow і (4) Lucifer Yellow і Гістохром [28].

Отже, терагерцове випромінювання пошкоджує цілісність мембрани нейронів. Ці пошкодження не призводять до загибелі нейронів і через певний проміжок часу цілісність мембрани відновлюється.

2.4 Вплив гелій-неонового лазера на біологічні мембрани

Авторами [29] було досліджено репаративну дію гелій-неонового лазера на мембрану еритроцитів. Використовували гелій-неоновий лазер, який має наступні характеристики: довжина хвилі 632,8 нм, потужність лазера 9 мВт і 18 мВт. Пошкодження мембрани еритроцитів відбувалося завдяки попередньому обробленню клітин вільними радикалами. Вільні радикали призводять до зміни хімічної структури і конформації, завдяки пошкодженню водневих зв'язків мембранних білкових молекул, зменшуванню вмісту гідросульфурильних основ мембрани, які окислюються S-S, пероксидуючи гідрофільні і гідрофобні ділянки молекули фосфатидної мембрани. Вплив на мембрану вільних радикалів визначали за допомогою атомної силової мікроскопії. На рис. 2.6 можна побачити, що не має відмінностей форми між контролем і еритроцитів пошкодженими вільними радикалами. Але є значні відмінності у поверхні клітин контролю і еритроцитів, які були пошкоджені вільними радикалами. Поверхня непошкодженого еритроцита була гладенька, а поверхня пошкодженого еритроцита вільними радикалами була шорсткою [29].

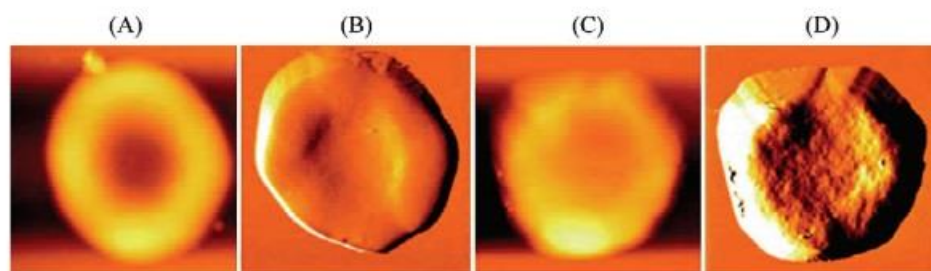


Рисунок 2.6. Зображення атомно-силової мікроскопії цілих еритроцитів (розмір сканування 10 мкм×10 мкм) (A) Топографічне зображення нормального еритроцита. (B) Зображення нормального еритроцита в режимі «сигнал-помилка». (C) Топографічне зображення еритроцита, обробленого вільними радикалами системи Фентона. (D) Зображення пошкодженого еритроцита в режимі «сигнал-помилка» [29].

На рис. 2.7 зображено 2D і 3D зображення опромінених і неопромінених еритроцитів, які попередньо були оброблені вільними радикалами. На зображеннях видно, що на поверхні еритроцитів утворюються кластери мембранних білків, які виступають з поверхні мембрани [29].

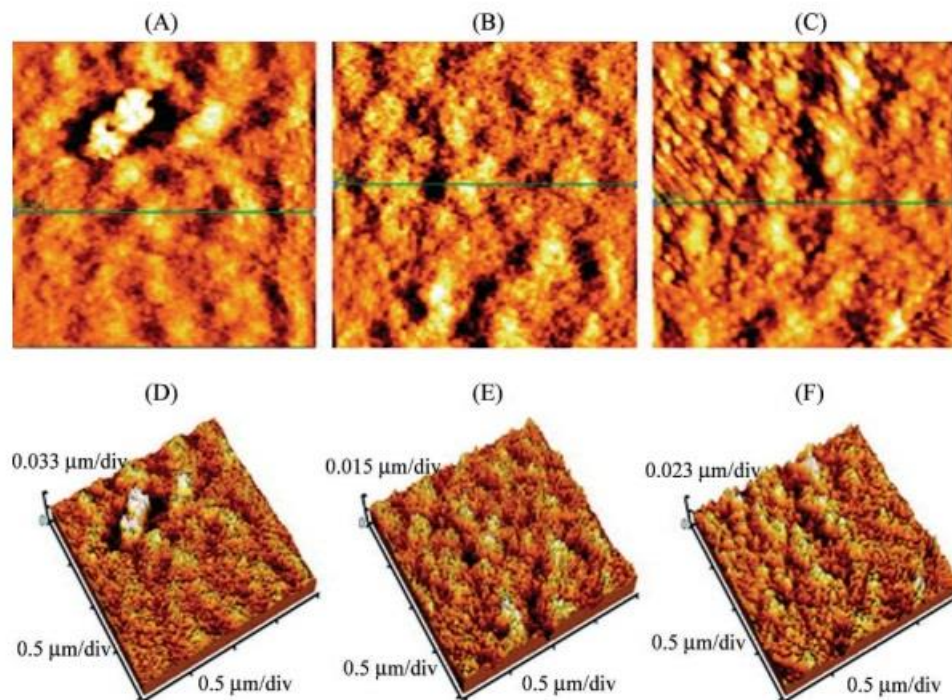


Рисунок 2.7 Зображення атомно-силової мікроскопії ультраструктури мембрани пошкоджених еритроцитів, оброблених вільними радикалами системи Фентона (розмір сканування 2 мкм×2 мкм) (А) Топографічне зображення пошкоджених еритроцитів, оброблених вільними радикалами і не опромінених. (В, С) Топографічні зображення пошкоджених еритроцитів з малим розміром сканування, опромінених гелій-неоновим лазером потужністю 9 мВт і 18 мВт, відповідно, після обробки вільними радикалами. (D-F) Тривимірні зображення, що відповідають панелям А-С. div, дрібні позначки осей [29].

Порівняно з контролем ступінь агрегації білків зменшився у еритроцитів, які були опромінені гелій-неоновим лазером з потужністю 9 мВт і 18 мВт. На рис. 2.7 В, С можна побачити, що невеликі поодинокі частинки, які можуть бути зшитими білковими полімерами, розщеплені на мономери. Розміри частинок

мембрани опромінених еритроцитів є меншими ніж розміри частинок мембрани контрольної групи. Це свідчить про те, що існує репаративна функція гелій-неонового випромінювання, яка полягає у тому що реактивний ефект лазерного випромінювання змушує пошкоджені еритроцити відновлюватися до нормальних. А саме дія гелій-неонового випромінювання збільшує плинність мембрани, покращує деформаційну здатність еритроцитів. Кращі репаративні функції показав лазер, який мав потужність 18 мВт, ніж лазер з потужність 9 мВт [29].

Отже, лазерне гелій-неонове випромінювання потужність 18 мВт може відновлювати еритроцити, які попередньо були пошкодженні вільними радикалами.

Інше дослідження [30] було націлено на те щоб з'ясувати зміну проникності мембрани еритроцитів, а також мембрану текучість і осматичну крихкість мембрани. Проникність мембрани визначали за допомогою втрати гемоглобіну клітинами. Кров людини була опромінена гелій-неоновим лазером з довжиною хвилі 633 нм, при температурі 4°C і температурі 23°C . Було показано, що статистично значущої проникності мембрани еритроцитів для гемоглобіну не виявлено як для опромінення при температурі 4°C так і для опромінення при температурі 23°C (рис 2.8 і таб. 2.1) Не спостерігається значної втрати гемоглобіну у опромінених еритроцитах [30].

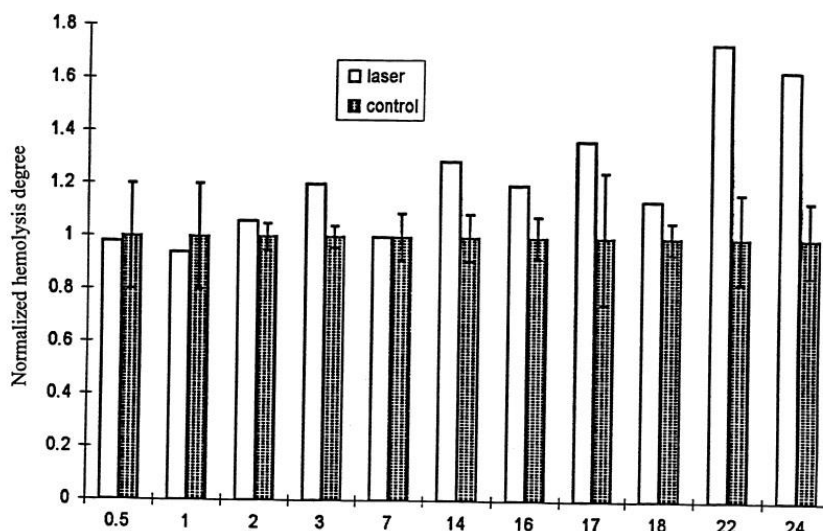


Рисунок 2.8 Втрата гемоглобіну (ступінь гемолізу α) опромінених і контрольних еритроцитів при різному часі експозиції (4°C). Значення α були нормалізовані в кожному експерименті з урахуванням а контролю одиниці [30].

Таблиця 2.1. Ступінь гемолізу α для 10 опромінених і 20 контрольних зразків одного донора (23°C) [30]

Blood	$(\alpha \pm \text{S.D}) \times 10^3$ (%)
Irradiated	13.8 ± 3.2
Control	10.6 ± 1.8

Мембранну текучість визначали методом флуоресценції. А саме вимірювали анізотропію до і під час опромінення He-Ne лазером. Потім проводили альтернативний експеримент у якому еритроцити інкубували з сублітичними концентраціями PEG 1000, щоб надати деяку додаткову інформацію щодо механізму лазерного випромінювання, яке викликає псевдозрідження ядра мембрани. Анізотропія флуоресценції опромінених і контрольних еритроцитів, а також вплив PEG показано в таблиці 2.2. Мікров'язкість опромінених мембран знижується до половини значення контролю, в той час як PEG 1000, здається, захищає еритроцити від дезорганізації їх внутрішньої мембрани опромінення [30].

Таблиця 2.2 Анізотропія флуоресценції (r) контрольних та опромінених еритроцитів у присутності та без PEG [30]

Sample	control	irradiated	Control + PEG	Irradiated + PEG
r	0.0783 ± 0.0181	0.0360 ± 0.0067	0.0723 ± 0.0198	0.0798 ± 0.0091

Осмотичну крихкість визначали на цільній крові, а також на суспензіях старих і молодих еритроцитів, які були доведені до однакового гематокриту (40%). Було з'ясовано, що цільова кров має більшу чутливість до гемалітичного шоку ніж контроль. У випадку зі старими еритроцитами не спостерігалось суттєвих змін у статистичному розподілі між старими опроміненими еритроцитами та контролем, а ось молоді опроміненні еритроцити також виявилися більш чутливими до гемалітичного шоку ніж контроль. Осмотична крихкість є більшою у опромінених еритроцитів, причому молоді клітини більш чутливі до опромінення, ніж старі. Зміна мембранної плинності під впливом опромінення є оборотними процесом, оскільки r миттєво повертається до початкового значення, коли опромінення припиняється [30].

Можна зробити висновок, що жодних важливих незворотніх змін мембрани еритроцитів під впливом гелій-неонового лазера з довжиною хвилі 633 і потужністю 3 мВт нм не відбувається.

3 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

3.1 Клітинні об'єкти дослідження

Для дослідження впливу лазерного випромінювання на клітини використовували культуру одноклітинних організмів *S.cerevisiae*. Щоб отримати робочий розчин суспензії клітин *S.cerevisiae*, 1% суспензії клітин тричі промивали у фізіологічному розчині, далі центрифугували при 1500 об/хв протягом 10 хв. суспендували у 8 мл розчину 5мМ трис-НСІ буфера (рН=7,4). В кінцевому результаті концентрація клітин у розчинні становила 18×10^6 .

3.2 Дослідження електричних властивостей клітинної поверхні

Щоб з'ясувати зміни поверхні дріжджів, що піддалися опроміненню, використовували барвник - бромтимоловий синій (БТС).

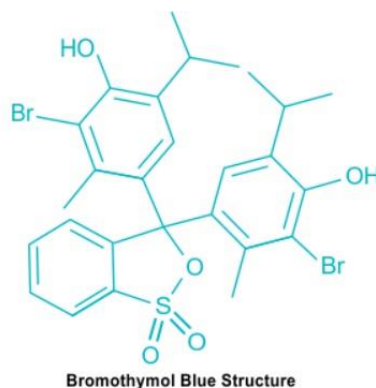


Рисунок 3.1 – Структура бромтимолового синього.

Молекула барвника має певний заряд, завдяки цьому вона може встановлювати електростатичні взаємодії з поверхнею біомембрани. А гідрофобна частина барвника взаємодіє з неполярною частиною мембрани. Завдяки такій структурі барвник не здатний проникати глибоко в ліпідний бішар і його аніона група залишається на поверхні мембрани.

Концентрацію БТС для дослідження становила 0,1 мМ в 5 мМ трис-НСІ буфері. Інкубація клітин з аліквотою барвника здійснювали в інтервалі 1,6-16 мкМ при температурі 25⁰С протягом 15 хвилин. Вміст барвника, який не утворював взаємодії з клітинною поверхнею визначали у надосаді, який утворився після центрифугування при 1500 об/хв протягом 10 хв. Надосад досліджували за допомогою спектрофотометричного методу на довжині хвилі 615 нм. Щоб розрахувати концентрацію вільного барвника використовували формулу (1.1) та дані кривої калібрування БТС рис 3.2:

$$C_f = \frac{C_0 \times D_f}{D_0} \quad (1.1)$$

де D_0 – оптична щільність; D_f – оптична щільність надосаду досліджуваного зразку; C_0 – початкова концентрація барвника в зразку; C_f – концентрація вільного барвника в зразку.

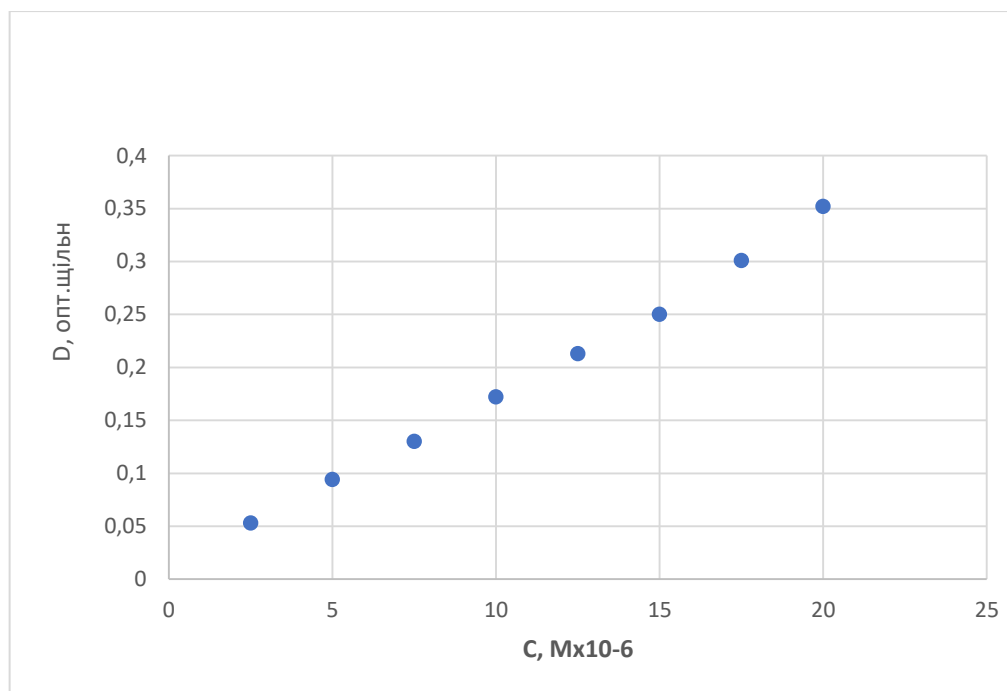


Рисунок 3.2. Крива калібрування барвника БТС

Для визначення концентрації зв'язаного барвника використовували розрахункову формулу $r = C_0 - C_f$. Рівноважне зв'язування барвника БТС з центрами взаємодії на поверхні клітини аналізували за допомогою теорії

Ленгмюра. Константу зв'язування K_{ass} та кількість місць зв'язування N визначали за методом Клотца.

3.3 Модельні ліпідні мембрани як об'єкти дослідження

Моделювання поверхневих властивостей мембран здійснювали завдяки додаванню в суміш кардіоліпіну. Модельні мембрани були сформовані завдяки суміші ліпідів, яка складалася з фосфатидилхоліну та кардіоліпіну у різних пропорціях, а саме 10% етанольний розчин фосфатидилхоліну (Sigma) з концентрацією 100 мг/мл і 0,5% етанольний розчин кардіоліпіну (Sigma) з концентрацією 5 мг/мл. Суміші ліпідів, які формували ліпосоми, склалися з розчину фосфатидилхоліну (ФХ), розчину фосфатидилхоліну з вмістом кардіоліпіну 10%, 20% та 40% (ФХ+КЛ10%, ФХ+КЛ20%, ФХ+КЛ40%). Методом інжекції за постійної температури $T = 25^{\circ}C$ отримували модельні ліпідні мембрани. Контроль діаметру ліпідних везикул відбувався завдяки методу світлорозсіювання. Середній діаметр ліпосом складав 100 нм. В досліджувальних ліпосомах кінцева концентрація ліпідів була 0,5 мМ.

3.4 Параметри взаємодії цитохрому *c* з модельними ліпідними мембранами

Контроль комплексоутворення цитохрому *c* з модельними ліпідними мембранами відбувався спектрофотометрично на спектрофотометрі HitachiU-3210, в термостатованих кюветах 10 x 10 мм на довжині хвилі смуги Core 405-410 нм. Концентрація розчину білка становила 1 мкМ. Кінетичні залежності зміни оптичної щільності цитохрому *c* в розчині та при його взаємодії з модельними ліпідними мембранами описували рівнянням (1.2):

$$\frac{D}{D_0} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad (1.3)$$

де D_0 , D - поглинання світла цитохромом *c* в буферному розчині та в суспензії ліпосом, відповідно; A_1 , A_2 – амплітуди кінетичних 1 та 2 фаз, відповідно; k_1 , k_2

– кінетичні константи. Методом найменших квадратів були визначенні кінетичні параметри.

3.5 Опромінення лазером зразків клітинних мембран та модельних ліпідних мембран

Лазерне опромінення клітин дріжджів в ультрафіолетовому діапазоні, відбувалося імпульсним азотним лазером ($\lambda=337$ нм), середня потужність випромінювання 5 мВт, густина потужності випромінювання $2,8$ мВт/см² . Опромінення у зеленій області спектру (довжина хвилі $\lambda =532$ нм) відбувалося твердотільним лазером типу DPSS (виробник Китай), середня потужність випромінювання 20 мВт, густина потужності випромінювання $9,5$ мВт/см² .

В субміліметрованому діапазоні (довжина хвилі 70,5 мкм) опромінення клітин здійснювали за допомогою безперервного CO₂ -лазера, середня потужність випромінювання 20 мВт. Суспензії клітин, які опромінювалися, мали товщину шару 1 мм.

Опромінення модельних мембран з цитохромом С здійснювали гелій-неоновим лазером з довжиною хвилі $\lambda = 632,8$, середньою потужністю 1 мВт, щільністю потужності $5,1$ мВт/см² . Суспензії клітин, які опромінювалися мали товщину шару 1 мм.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

З метою виявлення механізмів впливу лазерного випромінювання на поверхню клітинної мембрани експериментально досліджували особливості взаємодії аніонного барвника бромтимолового синього (БТС) з клітинами дріжджів, опроміненими в досліджуваному діапазоні довжин хвиль. Перерозподіл аніонного барвника на біологічній мембрані є чутливим показником структурних перебудов поверхні клітини за умов дії фізичних чинників і лазерного випромінювання, зокрема. Особливості хімічної будови молекули БТС пов'язані з наявністю від'ємного заряду та великої гідрофобної поверхні. Ефективність взаємодії барвника з біомембраною визначається розподілом полярних груп на її поверхні, та встановлення первинних електростатичних контактів. Наявність гідрофобної частини молекули БТС забезпечує його здатність до взаємодії з неполярною поверхнею мембрани. Завдяки своїм структурним особливостям барвник не здатний проникати глибоко в бішар, а його аніонна група залишається на поверхні.

Опромінення клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* відбувалося протягом 10 і 20 хвилин. За допомогою метода Клотца були розраховані константи зв'язування і кількість місць зв'язування барвника БТС з клітинною поверхнею таб.1. Було виявлено зміну параметрів комплексотворення БТС з опроміненими клітинами в досліджуваному діапазоні досліджуваних довжин хвиль рис.1 .

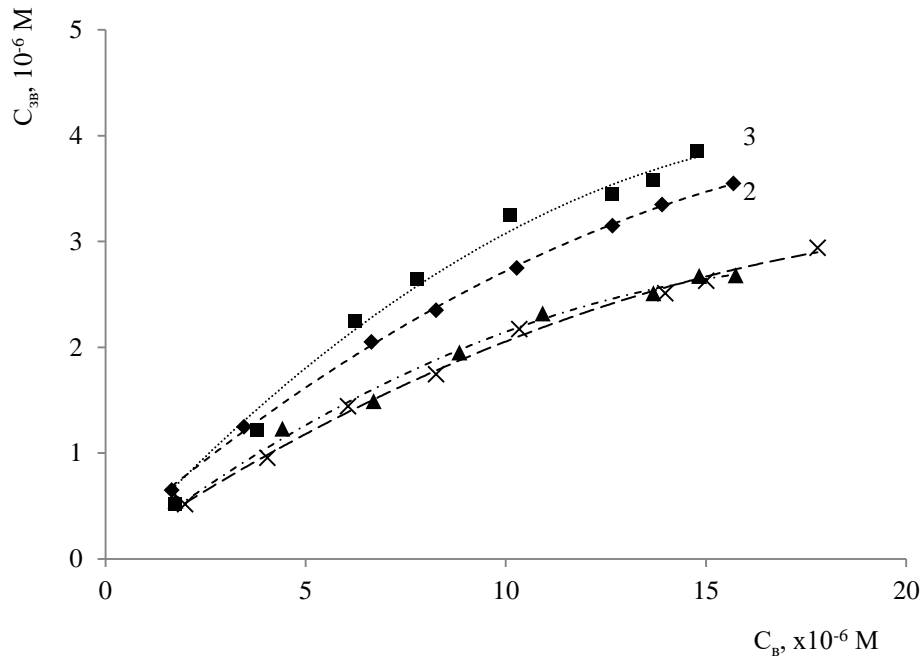


Рисунок 1 – Зв'язування бромтимолового синього плазматичними мембранами дріжджів за умов дії лазерного випромінювання: 1- неопромінений контроль; 2- 337 нм; 3- 532 нм; 4- 70,5 мкм.

Таблиця 1 – Константи зв'язування і кількість місць зв'язування опромінених клітин.

	$K_{ass} \times 10^{-4}, [\text{мкМ}^{-1}]$	$N, [\text{мкМ}]$
Контрольні клітини	$1,12 \pm 0,02$	$5,21 \pm 0,34$
Опромінені клітини, 10 хв		
$\lambda=337 \text{ нм}$	$6,2 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,23$
$\lambda=532 \text{ нм}$	$0,31 \pm 0,01$	100 ± 15
$\lambda=70,5$	$4,5 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,18$
Опромінені клітини, 20 хв		
$\lambda=337 \text{ нм}$	$1,43 \pm 0,04$	$14,3 \pm 0,2$
$\lambda=532 \text{ нм}$	$0,75 \pm 0,06$	250 ± 18

З таблиці 1 видно, що при опроміненні протягом 10 хвилин $K_{ass} = 6,2 \times 10^{-4}$ найбільша для клітин, які були опроміненні лазером з довжиною хвилі 337 нм, а найменше значення $K_{ass} = 0,31 \times 10^{-4}$ для клітин, які були опроміненні лазером з довжиною хвилі 532 нм. А ось значення $N = 100$ більше для клітин, які були опроміненні лазером з довжиною хвилі 532 нм, а найменше значення $N = 7,1$ для

клітин, які були опроміненні лазером 337 нм і 70,5 мкм. При опроміненні клітин протягом 20 хвилин найменша $K_{ass} = 0,75 \times 10^{-4}$ є для клітин, які були опроміненні лазером $\lambda = 532$ нм, а найбільше значення $K_{ass} = 1,43 \times 10^{-4}$ для клітин, які були опроміненні лазером $\lambda = 337$ нм. Найменше значення $N = 14,3$ для клітин, які були опроміненні лазером $\lambda = 337$ нм, а найбільше значення $N = 250$ для клітин, які були опроміненні $\lambda = 337$ нм. При опроміненні клітин кількість місць зв'язування зростає, порівняно з контрольними клітинами, в незалежності, яким лазером було опромінено клітину ультрафіолетовим, зеленим або терагерцовими, і протягом скількох хвилин було опромінено клітину при 10 чи 20 хвилинах. При опроміненні клітин лазером з довжиною хвилі 337 нм константа зв'язування є меншою порівняно з контрольними клітинами, як при опроміненні клітин протягом 10 хвилин, так і при опроміненні клітин протягом 20 хвилин. При опроміненні клітин лазером з довжиною хвилі 532 нм, тобто константа зв'язування є меншою порівняно з константою зв'язування неопромінених клітин, як при опроміненні протягом 20 хвилин, так і при опроміненні протягом 10 хвилин. При опроміненні клітини протягом 10 хвилин лазером з довжиною хвилі 70.5 мкм константа зв'язування є меншою ніж константа зв'язування контрольних клітин. Кількість місць зв'язування опромінених клітин лазером довжиною хвилі 337 нм, 532 нм, 70.5 мкм є більшими порівняно з контрольними клітинами.

Виявлені зміни поверхневих електричних властивостей клітинних мембран пов'язані зі зменшенням ефективності взаємодії барвника з клітинною поверхнею і разом з тим цей стан супроводжується зростанням центрів сорбції БТС на мембранах.

Використання ліпосомальних мембран, які складаються з фосфатидилхоліну (100%), а також фосфатидилхоліну у поєднанні з кардіоліпіном (10%, 20%, 40%), дозволяє дослідити і проаналізувати біологічну ефективність НЛПВ на систему з заданими молекулярними компонентами та визначити важливість ліпосомальних мембран у процесах лазерної фотомодуляції. Модельні мембрани з фосфатадилхоліну за своїми хімічними

властивостями є наближенням до еритроцитарних мембран, а ліпосомальні мембрани з вмістом фосфотидилхоліну і кардіоліпіном у різних співвідношеннях є наближенням до внутрішніх мембран мітохондрій. В якості білку був обраний цитохром *C* – це білок бере участь у електрон транспортному ланцюзі, у процесах апоптозу під дією чинників різної природи, а саме екзо- і ендогенних чинників. Важливим фактором є те, що у природніх умовах активність взаємодії цитохрому *C* з внутрішньою мембраною мітохондрій визначається концентрацією кардіоліпіну у мембрані. Взаємодія цитохрому *C* з ліпідними мембранами є багатостадійним процесом. На першому етапі відбувається електростатичне взаємодія, так як білок має сумарний позитивний заряд, а ліпіди у мембрані мають негативний заряд. Потім кількість електростатичних взаємодій збільшується у результаті зміни конформації білка, а також латеральної дифузії фосфоліпідів. Далі відбувається занурення білка у ліпідний бішар, завдяки збільшенню гідрофобних взаємодій. Було досліджено білок-ліпідні системи, а саме взаємодію білку цитохрому *C* з ліпосомами з різним ліпідним складом за умови впливу He-Ne лазеру, проаналізовані кінетичні параметри утворення білок-ліпідних комплексів.

При взаємодії ліпосом з цитохромом *C* відбувається зменшення поглинання гемовою групою цитохрома *C* у смузі S_{ore} ($\lambda=407$ нм) це відбувається завдяки зміні конфігурації гемової групи. Експериментальні кінетичні залежності взаємодії цитохрому *C* з ліпосомами різного фосфоліпідного складу показують те, що існує дві фази у перебудові білку: перша – це швидка кінетична фаза, яка характеризує взаємодію Цит *C* з фосфоліпідами ліпосомами, друга- це повільна фаза, яка характеризується порушенням зв'язку між гемовою групою і глобіном.

Опромінення ліпідних мембран He-Ne лазером впливає на комплексотворення Цит *C* з ліпідними мембранами (рис. 2). Зменшення поглинання Цит *C* у максимумі смуги S_{ore} відбувається при комплексотворенні Цит *C* з ФХ мембрани, та ФХ+КЛ мембрани, після опромінення лазером.

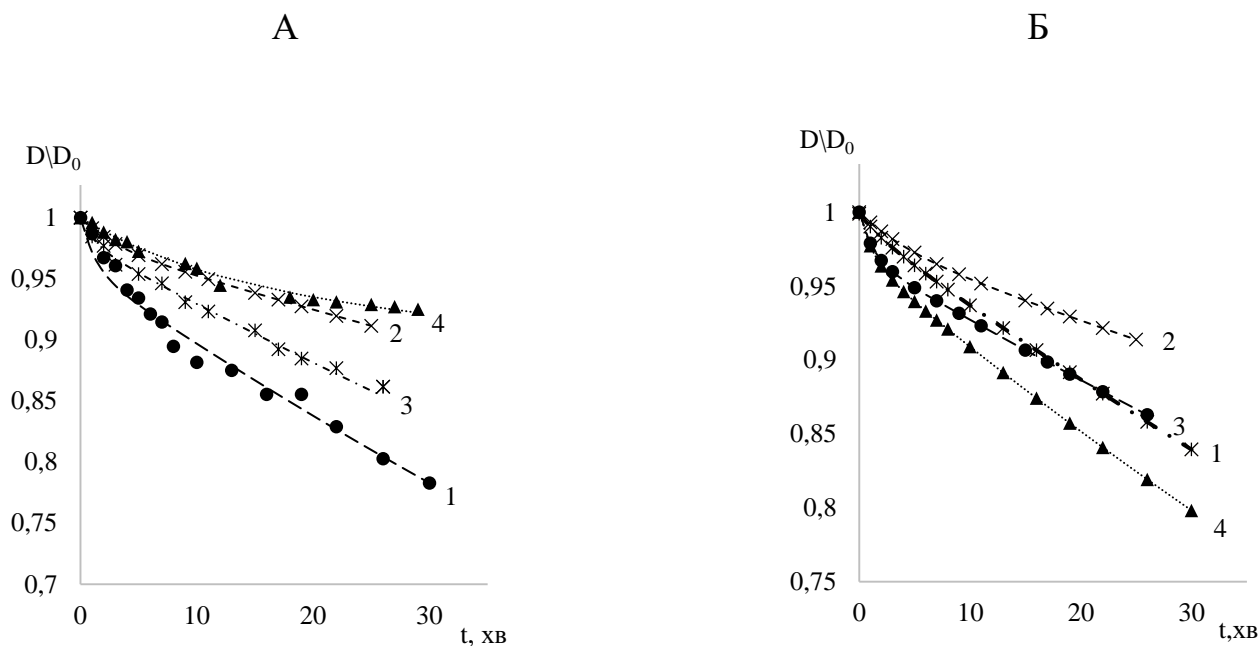


Рис. 2. Кінетичні залежності зменшення оптичної щільності Цит С в присутності модельних ліпідних мембран різного складу в контролі (А) та опромінених He-Ne лазером (Б): 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%; 4 – ФХ+КЛ40%. Концентрація білка – 1 мкМ, концентрація ліпіда – 0,5 мМ.

Формування білок-ліпідних комплексів відбувається з змінною кінетичних параметрів. А саме значення амплітуди A_2 зменшилося у 4 рази порівнянно з контролем, а значення константи швидкості k_2 зменшилося у 1.5 рази порівнянно з контролем. Більш чутливими до дії лазерного випромінювання виявилися ліпосоми, які містять 40% кардіоліпіну. Це видно з таблиці 2, так як зміни k_1 і k_2 зазнають більш суттєвих змін, а саме k_1 в 8 разів, k_2 в 9 разів порівнянно з контролем. Досліджувані білок-ліпідні взаємодії відбуваються, завдяки конформаційним змінам гем-вмісного білка. При взаємодії Цит С з ФХ мембрани, відбувається конформаційна зміна білкової частини цитохрому С, а при взаємодії Цит С з ФХ+КЛ40% мембранами відбувається зміна як білкової частини, так і зв'язку гем-глобін.

Формування Цит С з ліпосомами з ФХ +КЛ10%, ФХ+КЛ20%, КЛ+40% і формування Цит С з ліпосами ФХ відрізняються кінетичними параметрами. А саме не було виявлено достовірних змін між k_1 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ+КЛ10% і k_1 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ. Більш значущі зміни

виявлено між k_1 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ+КЛ40% і k_1 взаємодії Цис С з ліпосомами ФХ, а саме k_1 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ+КЛ40% менше у 8 разів ніж k_1 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ (таб.2). Не виявлено достовірних змін між значенням амплітуд повільної фази ліпосом з вмістом КЛ10%, КЛ20%, КЛ40% і A_2 ФХ ліпосом (таб.2). Достовірні зміни виявлено між k_2 взаємодії Цис С з ліпосомами ФХ+КЛ10% і k_2 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ (таб.2). Більш значущі зміни виявлено між k_2 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ+КЛ40% і k_2 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ, а саме приблизно у 8 разів ніж k_2 взаємодії Цит С з ліпосомами ФХ (таб. 2). Можна зробити висновки, що взаємодія Цит С з ліпосомами ФХ+КЛ40% у швидкій фазі відбувається швидше ніж взаємодія Цит С з ФХ ліпосомами, це пояснюється тим, що при додаванні кардіоліпіну поверхневий негативний заряд ліпосоми збільшується, завдяки тому що кардіоліпін має 2 негативні заряди. Тому електростатична взаємодія Цит С з ліпосомами відбувається швидше. Також можна зробити висновок, що при додаванні кардіоліпіну швидше відбувається занурення білка у ліпідний бішар.

Таблиця 2. Кінетичні параметри комплексоутворення Цит С з модельними ліпідними мембранами в контрольних зразках та після опромінення ліпосом He-Ne лазером.

	A_1	$k_1 \times 10^{-3}, \text{хв}^{-1}$	A_2	$k_2, \text{хв}^{-1}$
Контрольні ліпосоми				
ФХ	0,961±0,009	6,81±0,15	0,041±0,012	0,783±0,025
ФХ+КЛ10%	0,98±0,01	2,94±0,15	0,022±0,004	0,35±0,05
ФХ+КЛ20%	0,983±0,014	5,3±0,3	0,021±0,005	0,751±0,025
ФХ+КЛ40%	0,942±0,006	0,85±0,05*	0,064±0,003	0,09±0,005*
Опромінені ліпосоми				

ФХ	0,992±0,021	5,5±0,3	0,012±0,005	0,45±0,07
ФХ+КЛ10%	0,983±0,015	2,82±0,15	0,023±0,003	0,23±0,05
ФХ+КЛ20%	0,971±0,011	4,5±0,4	0,033±0,005	0,812±0,021
ФХ+КЛ40%	0,971±0,007	6,5±0,4*	0,031±0,005	0,79±0,05*

* - $p < 0,01$ відносно неопроміненого контролю

Опромінення He-Ne лазера Цит С впливає на ефективність комплексотворення Цит С з ліпідними мембранами (рис.3). А саме відбувається зменшення поглинання цитохрому С у максимумі смуги Soret. При утворенні комплексу Цит С і ФХ, і комплексу Цит С і ФХ+КЛ після опромінення.

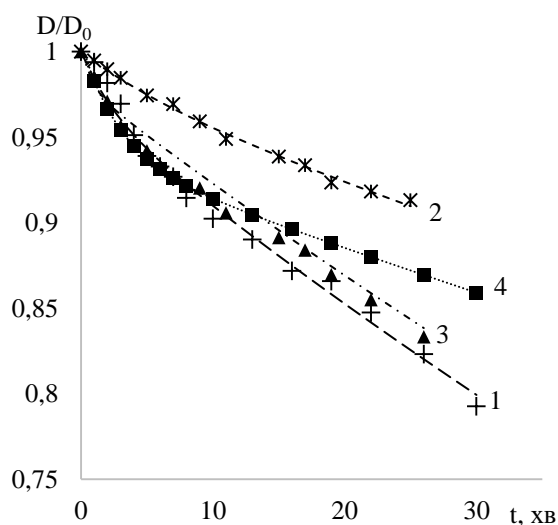


Рисунок 3. Кінетичні залежності зменшення оптичної щільності опроміненого He-Ne лазером Цит С в присутності модельних ліпідних мембран різного складу: 1 – ФХ; 2 – ФХ+КЛ10%; 3 – ФХ+КЛ20%; 4 – ФХ+КЛ40%.

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

Ефективність взаємодії гем-вмісного білка і ліпідної мембрани залежить від фізичного стані бішару і від структури білка. Тому були дослідженні кінетичні параметри комплексотворення ліпосом з Цит С, який був опромінений He-Ne

лазером за тих самих умов, що і для попередньої серії дослідів (таб. 3). Не виявлено значущих змін кінетичних параметрів швидкої фази (A_1 , k_1) при взаємодії опроміненого Цит С з ФХ ліпосомами і при взаємодії Цит С з ФХ+КЛ10% і ФХ+КЛ20% у порівнянні з контролем. Для повільної фази були встановлені зміни константи швидкості при взаємодії цитохрому С з ФХ ліпосомами і ФХ+КЛ10% ліпосомами у порівнянні з константами швидкості неопромінених ліпідних мембран. Більш значущі зміни у константах швидкості k_1 і k_2 , а саме перевищення констант у 4 і 3 рази відповідно при взаємодії опроміненого Цит С з ліпосомами ФХ+КЛ40%. Для інших досліджуваних зразків значущих змін кінетичних параметрів не виявлено.

Таблиця 3. Кінетичні параметри комплексотворення опроміненого He-Ne лазером Цит С з ліпосомами.

	A_1	$k_1 \times 10^{-3}, \text{хв}^{-1}$	A_2	$k_2, \text{хв}^{-1}$
ФХ	0,971±0,008	6,45±0,21	0,0312±0,0021	0,42±0,04
ФХ+КЛ10%	0,982±0,014	3,0±0,3	0,021±0,003	0,154±0,015
ФХ+КЛ20%	0,982±0,015	6,0±0,7	0,021±0,005	1,14±0,06
ФХ+КЛ40%	0,941±0,015	3,44±0,27*	0,063±0,003	0,31±0,03*

* - $p < 0,01$ відносно неопроміненого контролю

За допомогою модельних мембран, які за своїм складом є наближеними до природніх клітинних та субклітинних мембран, можна дослідити реакцію мембран на дію НІЛВ та зрозуміти механізми процесу лазерної фотомодуляції. Модельні мембрани з ФХ+КЛ40% і їх взаємодія з Цит С, робить їх більш наближеними до мітохондріальних мембран. З огляду на отриманні експериментальні данні можна зробити висновок, що НІЛВ впливає на функції мітохондрій, а саме через зміну взаємодії Цит С з кардіоліпіном, а також через змінну просторової конфігурації білкової і гемової компоненти.

ВИСНОВКИ

1. Встановлені особливості фізико-молекулярних змін як природних мембран так і модельних ліпідних везикул за умов їх опромінення низько інтенсивним лазерними випромінюванням в широкому частотному діапазоні.
2. Мембранна поверхня клітин *S.cerevisiae* реагує на дію лазерного випромінювання широкого частотного діапазону зміною поверхневих електричних властивостей. НІЛВ з довжиною хвилі (337 нм; 532 нм; 70,мкм) викликає перерозподіл поверхневих зарядів клітин *S.cerevisiae*.
3. Найбільш чутлива мембрана дріжджів до дії зеленого лазера (532 нм), про що свідчить зростання кількості центрів сорбції барвника на клітинній поверхні за умови інтервального опромінення після 10 та 20 хвилин.
4. НІЛВ (632,8 нм) впливає на кінетичні параметри комплексотворення Цит С з модельними мембранами з різним ліпідним складом. Найбільший ефект досягається при опроміненні фосфатидилхолінових ліпосом з вмістом 40% кардіоліпіну. Досліджувані білок-ліпідні взаємодії супроводжуються конформаційними змінами макромолекул як білкової частини Цит С, так і зв'язку гем-глобін.
5. Взаємодія опроміненого гелій-неоновим лазером цитохрому с з ліпідним бішаром модельних мембран характеризується зміною параметрів комплексотворення. Встановлено зростання кінетичних параметрів комплексотворення (k_1 , k_2) опроміненого Цит С з ліпосомальними мембранами з вмістом кардіоліпіну 40% у порівнянні з неопроміненим контролем. Формування білок-ліпідних комплексів супроводжується конформаційними змінами як білкової частини цитохрому, так і зв'язку гем-глобін.

СПИСОК ВИКОРАСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. C. Peetla, A. Stine, V. Labhasetwar. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery//Molecular Pharmaceutics. 2009. 6(5). P.1264-1276.
2. G. Shahane, W. Ding, M. Palaiokostas, M. Orsi. Physical properties of model biological lipid bilayers: insights from all-atom molecular dynamics simulations//Molecular Modeling. 2019. 25(3). P. 1-13.
3. Y. He, W. Zhang, Q. Xiao, L. Fan, D. Huang, W. Chen, W. He. Liposomes and liposome-like nanoparticles: From anti-fungal infection to the COVID-19 pandemic treatment//Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2022. 17(6). P. 817-837.
4. H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Bawab, W. Alshaer. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications//Heliyon. 2022. 8(5). P. 1-15.
5. P. Liu, G. Chen, J. Zhang. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives//Molecules. 2022. 27(4). P. 1372- 1397.
6. C. de Freitas, I. Calori, A. Tessaro, W. Caetano, N. Hioka. Rapid formation of Small Unilamellar Vesicles (SUV) through low-frequency sonication: An innovative approach//Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019. P. 837-844.
7. Y. Lu, Y. Zhang. Nano-particulate Drug Delivery System: Current Status and Future Perspective//Molecules. 2022. P. 27-38.
8. K. Ewert, P. Scodeller, L. Simón-Gracia, V. Steffes, E. Wonder, T. Teesalu, C. Safinya. Cationic Liposomes as Vectors for Nucleic Acid and Hydrophobic Drug Therapeutics//Pharmaceutics. 2021. 13(9). P. 1365-1398.
9. D. Balleza. Mechanical properties of lipid bilayers and regulation of mechanosensitive function//Channels. 2012. 6(4). P. 220-233.

10. Y. Ma, K. Poole, J. Goyette, K. Gaus. Introducing Membrane Charge and Membrane Potential to T Cell Signaling//Frontiers in Immunology. 2017. P. 1-11.
11. H. Keşfi, T. Bakış. The Cell Membrane: A Historical Narration// Bezmialem Science 2020. 8(1). P. 81-88.
12. J. Francois. Cell surface interference with plasma membrane and transport processes in yeasts// Advances in Experimental Medicine and Biology. 2016. 892. P. 11-31.
13. R. Kollar, E. Petrakova, G. Ashwell, P. Robbins, E. Cabib. Architecture of the Yeast Cell Wall// Journal of biological chemistry 1995 3 P. 1170-1178.
14. P. Lipke, R. Ovalle. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges// Journal of bacteriology. 1998. 15. P. 3735-3740.
15. M. Van de Rest, A. Kamminga, A. Nakano, Y. Anraku, B. Poolman, W. Konings. The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function, and Biogenesis// Microbiological Reviews. 1995. 2. P. 304-322.
16. R. Ventura, I. Martínez-Ruiz, M. Hernández-Alvarez. Phospholipid Membrane Transport and Associated Diseases//Biomedicines. 2022. 10(5). P. 1201-1219.
17. X. Ma, X. Li, W. Wang, M. Zhang, B. Yang, Z. Miao. Phosphatidylserine, inflammation, and central nervous system diseases//Frontiers in Aging Neuroscience. 2022. P. 1-18.
18. H. Watson. Biological membranes//Essay in Biochemistry. 2015. 59. P. 43-69.
19. R. Lewis, R. McElhaney. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy//BBA Biomembranes. 2013. 10. P. 2347-2358
20. C. Fedosejevs, M. Schneider. Sharp, localized phase transitions in single neuronal cells//PNAS USA. 2022. 119(8). P. 1-6.
21. F. Alenghat, D. Golan. Membrane Protein Dynamics and Functional Implications in Mammalian Cells//Current Topics in Membranes. 2013. 72. P. 89-120.

22. A. Pohorille, D. Deamer. Self-assembly and function of primitive cell membranes// *Research Microbiology*. 2009. 7. P. 449-456.
23. N. Wilke, B. Maggio. Electrostatic field effects on membrane domain segregation and on lateral diffusion//*Biophysical Reviews*. 2011. 3(4). P. 185-192.
24. S. Pöyry, I. Vattulainen. Role of charged lipids in membrane structures – Insight given by simulations// *BBA – Biomembranes*. 2016. 10. P. 2322-2333.
25. X. Yuan, Y. Song, Y. Song, J. Xu, Y. Wu, A. Glidle, M. Cusack, U. Ijaz, J. Cooper, W. Huang, H. Yin. Effect of Laser Irradiation on Cell Function and Its Implications in Raman Spectroscopy//*Applied and Environmental Microbiology*. 2018. 84(8). P.1-84
26. M. Zeigler, D. Chiu. Laser Selection Significantly Affects Cell Viability Following Single-Cell Nanosurgery//*Photochemistry and Photobiology*. 2009. 85(5). P. 1218-1224.
27. F. Pérez-Gutiérrez, S. Camacho-López, R. Evans, G. Guillén, B. Goldschmidt, J. Viator, G. Aguilar. Plasma Membrane Integrity and Survival of Melanoma Cells After Nanosecond Laser Pulses//*Annals of Biomedical Engineering*. 2010. 38(11). P. 3521-3531.
28. T. Zapara, S. Treskova, A. Ratuszniak. Effect of Antioxidants on the Interaction of Terahertz (Submillimeter) Laser Radiation and Neuronal Membrane// *Journal of Surface Investigation X-ray Synchrotron and Neutron Techniques*. 2015. 9(5). P. 869-871.
29. Y. Cui, Z. Guo, Y. Zhao, Y. Zheng, Y. Qiao, J. Cai, S. Liu Reactive Effect of Low Intensity He-Ne Laser upon Damaged Ultrastructure of Human Erythrocyte Membrane in Fenton System by Atomic Force Microscopy//*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2007. 39(7). P. 484-489.
30. E. Kovacs, M. Makropoulou, T. Savopol, R. Moraru, A. Serafetinides. He-Ne laser radiation effects on the membrane of human erythrocytes//*SPIE.2630*. P 1-