

УДК: 547.787.2 + 535.33/.34

Апоптоз энтероцитов при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите: исследование методом флуоресцентных зондов

А.С.Ткаченко¹, Е.М.Корниенко², Е.А.Посохов³

¹Харьковский национальный медицинский университет (Харьков, Украина)

²Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

³Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт» (Харьков, Украина)

yevgenposokhov@gmail.com

В настоящей работе было проведено исследование состояния липидного бислоя мембран энтероцитов крыс в условиях протекания хронического гастроэнтероколита. Для исследования нами использовались флуоресцентные зонды – орто-гидроксипроизводные оксазола, молекулы которых нековалентно связываются с мембранами клеток и реагируют на изменения микроокружения. Установлено, что в ходе протекания хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита происходит увеличение гидратированности полярных областей мембран энтероцитов, что свидетельствует об активации апоптоза энтероцитов. Показано, что флуоресцентный зонд (2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол) может быть использован в качестве индикатора для детекции апоптоза энтероцитов.

Ключевые слова: энтероциты, биомембрана, каррагинан, флуоресцентный зонд.

Апоптоз ентероцитів при хронічному карагінан-індукованому гастроентероколіті: дослідження методом флуоресцентних зондів

А.С.Ткаченко, Є.М.Корнієнко, Є.О.Посохов

У даній роботі було проведено дослідження стану ліпідного бішару мембран ентероцитів щурів в умовах протікання хронічного гастроентероколіту. Для дослідження нами використовувалися флуоресцентні зонди – орто-гідроксипохідні оксазолу, молекули яких нековалентно зв'язуються з мембранами клітин і реагують на зміни мікрооточення. Встановлено, що в ході протікання хронічного карагінан-індукованого гастроентероколіту відбувається збільшення гідратованості полярних областей мембран ентероцитів, що свідчить про активацію апоптозу ентероцитів. Показано, що флуоресцентний зонд (2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол) може бути використаний як індикатор для детекції апоптозу ентероцитів.

Ключові слова: ентероцити, біомембрана, карагінан, флуоресцентний зонд.

Apoptosis of enterocytes in chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis: a study by fluorescent probes

A.S.Tkachenko, Ye.M.Korniyenko, Ye.O.Posokhov

A study of the lipid bilayer of membranes of enterocytes of rats with chronic gastroenterocolitis was performed in this work. For the study we used fluorescent probes – ortho-hydroxy derivatives of oxazole, molecules of which bind non-covalently to the membranes of cells and respond to changes in the microenvironment. It has been found that during the course of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis an increase in hydration of the polar regions of enterocyte membranes occurs. The increase in hydration is attributed to the activation of enterocytes apoptosis. It has been shown that a fluorescent probe (2-(2'-OH-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole) can be used for the detection of apoptosis of enterocytes.

Key words: enterocytes, biomembrane, carrageenan, fluorescent probe.

Введение

Каррагинан представляет собой высокомолекулярный анионный полимер, который получают путем экстракции из красных морских водорослей (Borthakur, 2007). Каррагинан выполняет функцию природного гелеобразователя и загустителя в молочных, кондитерских и мясных продуктах. Пищевой каррагинан (пищевая добавка Е407) имеет средний молекулярный вес более 100 кДа с небольшим процентом более мелких фрагментов. Данная пищевая добавка не разрушается в пищеварительном тракте и не всасывается. В экспериментальной медицине каррагинан широко применяется для

моделирования воспалительных процессов. Так, в патологической физиологии каррагинан используют для моделирования перитонита, плеврита, артрита и каррагинан-индуцированного отека конечностей у крыс (Morris, 2003). Каррагинан-индуцированное воспаление является острым, неиммунным и легко воспроизводимым. Отек, гипералгезия и эритема развиваются сразу после подкожной инъекции каррагинана и являются результатом действия таких провоспалительных агентов, как брадикинин, гистамин, тахикинины, компоненты системы комплемента, активные формы кислорода и азота (Morris, 2003). Существуют данные об онкогенной трансформации клеток под воздействием каррагинана – авторами найдена положительная корреляция между использованием продуктов с этой добавкой в диете и увеличением риска развития карциномы молочной железы (Tobacman et al., 2001). Известна также модель язвенно-некротического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита (Pricolo et al., 1996).

В связи с этим возникает вопрос о безопасности применения каррагинана в качестве пищевой добавки. В современной литературе нет достоверных данных о влиянии систематического употребления каррагинана ни на организм взрослого человека, ни на организм ребенка, ни на организм плода при наличии данной добавки в рационе питания беременной женщины. В клинике изучение данной проблемы весьма проблематично, поэтому возникает острая необходимость исследования влияния каррагинана на метаболические показатели в условиях экспериментальной модели. В Харьковском национальном медицинском университете на базе модели язвенно-некротического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита разработана модель хронического каррагинанового гастроэнтероколита средней степени тяжести, без язвенно-некротического процесса, путем использования более низких доз данной пищевой добавки (Спосіб моделювання ..., 2012).

В предыдущих публикациях (Жуков, Ткаченко, 2013; Ткаченко и др., 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015) было показано, что при развитии хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита в эндотелии кишечника крыс происходит активация апоптотических процессов. О последнем судили по активации протеинкиназы 1, регулирующей апоптотический сигнал (ASK-1) (Жуков, Ткаченко, 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015); активации металлопротеиназы-2 (MMP-2) (Ткаченко и др., 2013); инактивации поли-(АДФ)-рибозы-полимеразы (ПАРП) (Жуков, Ткаченко, 2013; Ткаченко и др., 2013); активации каспазы-3 (Ткаченко и др., 2013); увеличению уровня фрагментации ДНК (Жуков, Ткаченко, 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015).

Однако, непосредственное исследование изменений в мембранах энтероцитов, происходящих в результате активации апоптотических процессов, не проводилось.

Целью настоящей работы явилось исследование состояния липидного бислоя мембран энтероцитов крыс в условиях активации апоптотических процессов. Для этого нами использовались флуоресцентные зонды – орто-гидроксипроизводные оксазола, молекулы которых нековалентно связываются с мембранами клеток и реагируют на изменения микроокружения (Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001).

Материалы и методы

Эксперимент проводился на половозрелых крысах-самках линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария. Лабораторные животные были разделены на 2 группы. 1-я группа включала животных с экспериментальным хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом, 2-я группа являлась контрольной и состояла из интактных животных. Хронический каррагинан-индуцированный гастроэнтероколит воспроизводили путем свободного доступа животных к 1% раствору каррагинана в питьевой воде. Через месяц после начала приема раствора каррагинана животные выводились из эксперимента путем декапитации. Кишечник извлекался на холоде немедленно после декапитации крыс. Перфузию кишечника проводили при помощи охлажденного физиологического раствора. Эпителиальные клетки отделяли путем соскабливания с внутренней поверхности кишечника анатомическим ножом. Готовили суспензию эпителиальных клеток в трис-HCl буфере (pH 7,4). Для исследования использовали суспензию клеток, соответствующей 56–57 %.

Для исследования состояния липидного бислоя мембран энтероцитов крыс нами использовались флуоресцентные зонды, успешно применявшиеся ранее для исследований биомембран (Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001): 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол (зонд **O1O**) и 2-(2'-ОН-фенил)-фенантр(10,11)-1,3-оксазол (зонд **PH7**).

Выбор флуоресцентных зондов **O10**, **PH7** (орто-гидроксипроизводные 2,5-диарил-1,3-оксазола) для исследования мембран энтероцитов крыс обусловлен тем фактом, что флуоресцентные характеристики этих зондов зависят от физико-химических свойств их микроокружения: от водородосвязывающей способности (т.е. способности к образованию водородных связей), полярности и вязкости микроокружения (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002).

В настоящей работе были проведены измерения флуоресценции зондов в физиологических растворах, содержащих: (а) энтероциты крыс с хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом (опытная группа); (б) энтероциты интактных здоровых животных (контрольный образец).

Флуоресцентные зонды растворяли в ацетонитриле до начальной концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. 10 мкл каждого из соответствующих растворов зонда добавляли к 2 мл суспензии энтероцитов. Конечная концентрация каждого из зондов в суспензии исследуемых мембран – $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, таким образом, молярное отношение липид/зонд составляло 1000:1. В настоящей работе были проведены измерения флуоресценции зондов **O10** и **PH7** в физиологических растворах, содержащих энтероциты крыс с хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом. Измерение спектров флуоресценции производилось на спектрофлуориметре «Hitachi 850» через 1 час после прибавления зондов к раствору клеток. Спектры флуоресценции зондов измеряли в области 340–600 нм при ширине щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции 5 и 5 нм соответственно, и длине волны возбуждения 330 нм.

Результаты исследований

Об активации апоптотических процессов в эндотелии кишечника крыс при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите судили по активации протеинкиназы-1, регулирующей апоптотический сигнал (ASK-1): с 1,77 (контроль) до 4,43 ед/мин. мг белка (гастроэнтероколит 4 недели) (Жуков, Ткаченко, 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015); активации металлопротеиназы-2 (MMP-2): с 7,29 (контроль) до 11,43 нг/мл (гастроэнтероколит 4 недели) (Ткаченко и др., 2013); инактивации поли-(АДФ)-рибозы-полимеразы (ПАРП): с 1,37 (контроль) до 0,46 мкмоль/мг белка (гастроэнтероколит 4 недели) (Жуков, Ткаченко, 2013; Ткаченко и др., 2013); активации каспазы-3: с 0,90 (контроль) до 34,57 нг/мл (гастроэнтероколит 4 недели) (Ткаченко и др., 2013); увеличению уровня фрагментации ДНК: с 15,8% (контроль) до 23,9% (гастроэнтероколит 4 недели) (Жуков, Ткаченко, 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015).

Известно, что в возбужденном состоянии для орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола характерно протекание реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) (рис. 1): гидроксильная группа в орто-положении бокового бензольного кольца – выступает в роли протодонора, а атом азота оксазольного цикла – в роли протонаакцептора (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002). Результатом реакции ВМФПП является образование фототаутомерной формы (T^*), флуоресцирующей в существенно более длинноволновой области по сравнению с исходной формой (N^*) (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002).

Наличие двухполосной флуоресценции позволяет проводить ратиометрические измерения, т.е. использовать отношение интенсивностей флуоресценции фототаутомерной формы (I_{T^*}) и исходной формы (I_{N^*}) в качестве параметра для оценки физико-химических свойств микросреды.

Использование ратиометрических флуоресцентных проб позволяет исключить как погрешности измерений, связанные с девиацией концентрации флуоресцентной пробы (например, неравномерным содержанием флуоресцентной пробы в различных мембранах), так и погрешности измерений, связанные с девиацией настроек флуоресцентной техники (девиации интенсивности источника возбуждающего излучения, изменения в фокусировке, изменения в чувствительности фотодетектора и т.д.) (Shapiro, 1995).

Для настоящего исследования были отобраны соединения, различающиеся своей липофильностью (Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001). Ожидается, что области локализации отобранных зондов в мембране различны и соответствуют липофильности зондов (рис. 2) (Добрецов, 1989; Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001). Ожидаемая локализация и ориентация **O10** и **PH7** на основе их флуоресцентных свойств в липидных мембранах (Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов,

2011; Посохов и др., 2001) и на основе их структурного подобия с флуоресцентными зондами с известной локализацией в липидных мембранах (Добрецов, 1989): зонд **O10** – в области глицериновых остатков фосфолипидов (ближе к центру липидного бислоя), в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов, прилегающих к области карбонильных групп; зонд **RH7** – в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов (вблизи центра бислоя) и в центре липидного бислоя мембран (рис. 2).

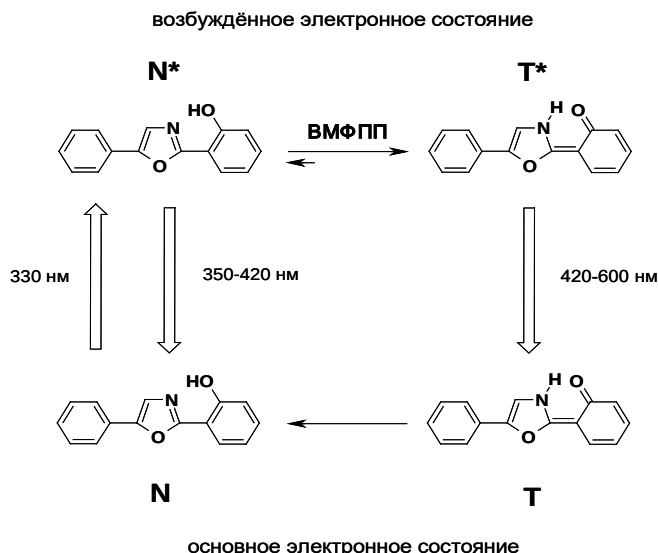


Рис. 1. Схема внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) в 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазоле (зонд O10). Стрелка, направленная вверх, представляет электронное возбуждение, а стрелки, направленные вниз, представляют испускание света (флуоресценцию). Около соответствующих стрелок приведены диапазоны испускания исходной и фототаутомерной форм (нм)

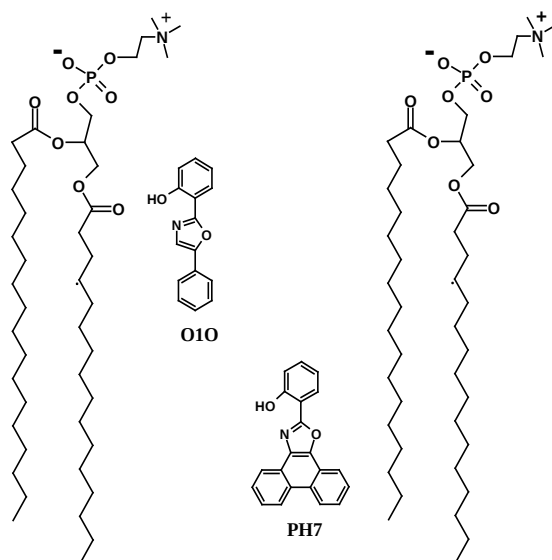


Рис. 2. Ожидаемая локализация и ориентация флуоресцентных зондов O10 и RH7 на основе их флуоресцентных свойств в липидных мембранах (Посохов, 2011; Посохов и др., 2001) и на основе их структурного подобия с флуоресцентными зондами с известной локализацией в

липидных мембранах (Добрецов, 1989). Для обозначения локализации зондов показаны две молекулы фосфатидилхолина из внешнего монослоя

Согласно литературным данным (Fadok et al., 2000; Martin et al., 1995; Matsura et al., 2005; Schlegel et al., 1993; Van den Eijnde, 1997; Zwaal, Schroit, 1997), протекание апоптоза сопровождается следующими изменениями мембраны клетки: (а) теряется липидная асимметрия (Zwaal, Schroit, 1997). Заряженные липиды (фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ)) оказываются во внешнем слое мембраны (Fadok et al., 2000; Martin et al., 1995; Van den Eijnde, 1997; Zwaal, Schroit, 1997); (б) увеличивается негативный заряд внешнего липидного слоя мембраны (Fadok et al., 2000), уменьшается упорядоченность липидов (Schlegel et al., 1993), происходит активация процессов окисления липидов (Matsura et al., 2005). Все вышеупомянутые изменения должны приводить к росту полярности и росту гидратированности мембраны (Disalvo et al., 2008; Ho, Stubbs, 1992; Ho et al., 1995).

На основании свойств используемых нами зондов (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001; Doroshenko et al., 2000, 2002) можно ожидать, что рост полярности и гидратированности мембраны будет приводить к: росту относительной интенсивности флуоресценции исходной (нормальной) формы N^* ; уменьшению относительной интенсивности флуоресценции фототаутомерной формы T^* ; уменьшению соотношения интенсивностей флуоресценции исходной и фототаутомерной форм (I_{T^*}/I_{N^*}).

Таблица 1.
Интенсивность флуоресценции* зондов O10 и RH7 для мембран энтероцитов животных с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов

Образец	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.					
	Зонд O10			Зонд RH7		
	390 нм	470 нм	I_{470}/I_{390}	425 нм	485 нм	I_{485}/I_{425}
контроль	3,7	21,0	5,7	55,4	112,3	2,0
апоптоз	4,0	14,1	3,5	53,9	113,6	2,1

*Примечание: *относительная погрешность значений: (а) интенсивности флуоресценции составляет менее 5%; (б) соотношения I_{T^*}/I_{N^*} составляет менее 10%.*

Действительно, в случае энтероцитов животных с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов наблюдалось заметное уменьшение интенсивности длинноволновой полосы флуоресценции таутомерной формы (I_{T^*}) зонда **O10**, в то же время, интенсивность полосы флуоресценции нормальной формы (N^*) зонда **O10** немного увеличилась (табл. 1, рис. 3). Таким образом, соотношение интенсивностей таутомерной и исходной формы I_{T^*}/I_{N^*} для зонда **O10** уменьшается в условиях активации апоптотических процессов (рис. 4).

Уменьшение интенсивности полосы флуоресценции таутомерной формы (I_{T^*}) и увеличение соотношения I_{T^*}/I_{N^*} зонда **O10** свидетельствует об увеличении полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения этого зонда в мембранах энтероцитов крыс с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов. Такое увеличение полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения зонда **O10** указывает на увеличение гидратированности микроокружения этого зонда в мембранах энтероцитов животных экспериментальной группы. Наблюдаемое увеличение гидратированности области локализации зонда **O10**, т.е. полярных областей мембраны, свидетельствует о том, что в ходе протекания хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита происходит активация апоптоза энтероцитов.

В то же время, в случае зонда **RH7** не наблюдалось заметных изменений его флуоресцентных параметров в мембранах энтероцитов крыс с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов (табл. 1). Отсутствие изменений в области локализации зонда **RH7** (т.е. в более гидрофобных областях липидного бислоя) объясняется тем, что, по-видимому, в ходе активации апоптоза энтероцитов не происходит значительного изменения гидратированности гидрофобных областей липидного бислоя.

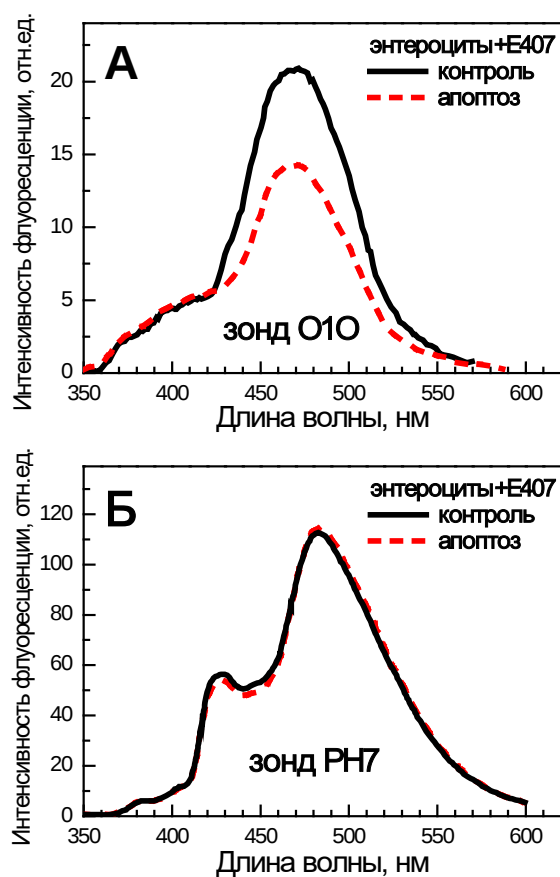


Рис. 3. Спектры флуоресценции зондов O10 (А) и RH7 (Б) в растворах, содержащих энтероциты: (а) контрольные (сплошная линия); (б) животных с карагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов (пунктирная линия)

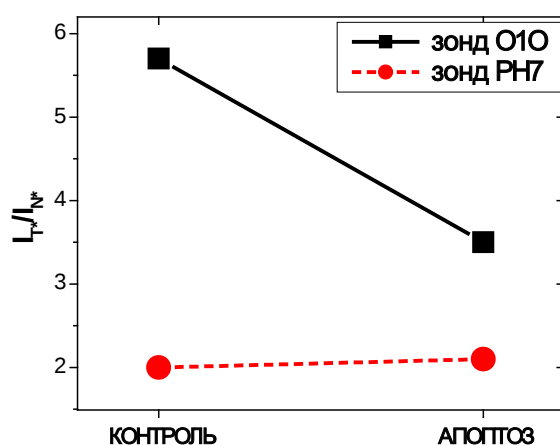


Рис. 4. Соотношение интенсивностей таутомерной и исходной формы I_{T^*}/I_{N^*} для зондов O10 (квадраты) и RH7 (круги) в мембранах энтероцитов

Таким образом, показано, что в мембранах энтероцитов крыс с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов происходит увеличение гидратированности области локализации зонда **O1O**, т.е. достаточно полярных областей мембраны: предположительно, области глицериновых остатков фосфолипидов (ближе к центру липидного бислоя), области карбонильных групп фосфолипидов и области жирнокислотных цепочек фосфолипидов, прилегающих к области карбонильных групп. Наблюдаемое изменение гидратации полярных областей мембраны отнесено к активации апоптоза энтероцитов в ходе хронического гастроэнтероколита. В то же время, в условиях активации апоптотических процессов не выявлено изменений в области локализации зонда **PH7**, т.е. в более гидрофобных областях мембран энтероцитов: предположительно, в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов (вблизи центра бислоя) и в центре липидного бислоя мембран.

Выводы

1. Установлено, что в ходе протекания хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита происходит увеличение гидратированности полярных областей мембран энтероцитов, что свидетельствует об активации апоптоза энтероцитов.
2. Показано, что флуоресцентный зонд (2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол) может быть использован в качестве индикатора для детекции апоптоза энтероцитов.

Список литературы

- Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277с. /Dobretsov G.Ye. Fluorestsennyye zondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteinov. – M.: Nauka, 1989. – 277s./
- Дорошенко А.О., Посохов Е.А., Шершуков В.М. и др. Реакция фотопереноса протона в возбужденном состоянии в ряду орто-окси-производных 2,5-диарилксазола // Химия высоких энергий. – 1997. – Т.31, №6. – С. 428–435. /Doroshenko A.O., Posokhov Ye.A., Shershukov B.M. i dr. Reaktsiya fotoperenosa protona v vzbuzhdyonnom sostoyanii v ryadu orto-oksi-proizvodnykh 2,5-diarilokszola // Khimiya vysokikh energiy. – 1997. – T.31, №6. – S. 428–435./
- Дорошенко А.О., Посохов Е.А. Реакция фотопереноса протона в ряду орто-гидрокси производных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола в полистирольных пленках // Теор. и exper. химия. – 1999. – Т.35, №6. – С. 357–361. /Doroshenko A.O., Posokhov Ye.A. Reaktsiya fotoperenosa protona v ryadu orto-gidroksi proizvodnykh 2,5-diaril-1,3-okszola i 2,5-diaril-1,3,4-okszadiazola v polistirolnykh plenkakh // Teor. i eksper. khimiya. – 1999. – T.35, №6. – S. 357–361./
- Жуков В.И., Ткаченко А.С. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите // Научные ведомости Белгородского университета. Медицина. Фармация. – 2013. – №18 (161), вып.23. – С. 138–141. /Zhukov V.I., Tkachenko A.S. Sistema perekisnogo okisleniya lipidov i aktivnost' apoptoza pri eksperimental'nom khronicheskom gastroenterokolite // Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo universiteta. Meditsina. Farmatsiya. – 2013. – №18 (161), vyp.23. – S. 138–141./
- Набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран. Пат. 68871 Україна, МПК G01N 33/483, G01N 21/64 (2006.01). / Є.О.Посохов, заявник і власник патенту Харківський нац. ун-т імені В.Н.Каразіна. №U201112552; заявл. 26.10.2011; опубл. 10.04.2012, Бюл. №7. /Nabir fluorestsennykh zondiv dlya vyznachennya fiziko-khimichnykh vlastyivostey lipidnykh membrane. Pat. 68871 Ukraina, MPK G01N 33/483, G01N 21/64 (2006.01). / Ye.O.Posokhov, zayavnyk i vlasnyk patentu Kharkivskyy nats. un-t imeni V.N.Karazina. №U201112552; zayavl. 26.10.2011; opubl. 10.04.2012, Byul. №7./
- Посохов Е.А. Орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований мембран клеток обонятельного анализатора крыс // Вісник Харківського національного університету. – 2011. – №976, серія «Хімія», вип.20 (43). – С. 92–99. /Posokhov Ye.A. Orto-gidroksi proizvodnyye 2,5-difenil-1,3-okszola i 2,5-difenil-1,3,4-okszadiazola v kachestve fluorestsennykh zondov dlya toksikologicheskikh issledovaniy membran kletok obonyatel'nogo analizatora krys // Visnyk Kharkivskogo natsional'nogo universytetu. – 2011. – №976, seriya «Khimiya», vyp.20 (43). – S. 92–99./
- Посохов Е.А., Бойко Т.П., Бевзюк Д.А. Орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований модельных биомембран // Вестник Харьковского национального университета. – 2001. – №532, серия «Химия», вып.7 (30). – С. 192–194. /Posokhov Ye.A., Boyko T.P., Bevzyuk D.A. Orto-gidroksi proizvodnyye 2,5-difenil-1,3-okszola i 2,5-difenil-1,3,4-okszadiazola v kachestve fluorestsennykh zondov dlya toksikologicheskikh issledovaniy model'nykh biomembran // Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta. – 2001. – №532, seriya «Khimiya», vyp.7 (30). – S. 192–194./
- Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту. Пат. 97322 Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01). / Т.О.Іваненко, В.О.Коробчинський, Г.І.Губіна-Вакулик та ін.; заявник і патентовласник Харківський нац. мед. ун-т. №a201014510; заявл. 06.12.2010; опубл. 25.10.2012, Бюл. №2/2012. /Sposib modelyuvannya khronichnogo gastroenterokolitu. Pat. 97322 Ukrayina, MPK G09B 23/28 (2006.01). / T.O.Ivanenko, V.O.Korobchynskyy, G.I.Gubina-

Vakulyk ta in.; zayavnyk i patentovlasnyk Kharkivs'kyi nats. med. un-t. №a201014510; zayavl. 06.12.2010; opubl. 25.10.2012, Byul. №2/2012./

Ткаченко А.С., Жуков В.И., Литвиненко Е.Ю. Окислительный стресс и активность апоптоза при хроническом карагінан-індуцированном гастроентероколіті // *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. – 2013. – Т.8, №1. – С. 74–79. /Tkachenko A.S., Zhukov V.I., Litvinenko Ye.Yu. Okislitel'nyy stress i aktivnost' apoptoza pri khronicheskom karragenan-indutsirovannom gastroenterokolite // *Zagal'na patologiya ta patologichna fiziologiya*. – 2013. – Т.8, №1. – С. 74–79./

Borthakur A., Bhattacharyya S., Dudeja P.K. et al. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – Vol.292 (3). – P. 829–838.

Disalvo E.A., Larion F., Martini F. et al. Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces // *Biochim Biophys. Acta.* – 2008. – Vol.1778. – P. 2655–2670.

Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A., Ptyagina L.M. Excited state intramolecular proton transfer reaction and luminescent properties of the ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole // *J. Physical Organic Chemistry*. – 2000. – Vol.13. – P. 253–265.

Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A. et al. Radiationless deactivation of excited phototautomer form and molecular structure of ESPT-compounds // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – No 1. – P. 92–99.

Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M. et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells // *Nature*. – 2000. – Vol.405. – P. 85–90.

Gubina-Vakyulyk G.I., Gorbach T.V., Tkachenko A.S., Orlova M.A. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis // *Comp. Clin. Pathology*. – 2015. – Vol.24, issue 6. – P. 1473–1477.

Ho C., Stubbs C.D. Hydration at the membrane protein-lipid interface // *Biophysical Journal*. – 1992. – Vol.63. – P. 897–902.

Ho C., Slater S.J., Stubbs C.D. Hydration and order in lipid bilayers // *Biochemistry*. – 1995. – Vol.34. – P. 6188–6195.

Martin S.E., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol.182. – P. 1545–1556.

Matsura T., Togawa A., Kai M. et al. The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol.1736. – P. 181–188.

Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse // *Inflammation Protocols*. – 2003. – №225. – P. 115–121.

Pricolo V.E., Madhere S.M., Finkelstein S.D. Effects of lambda-carrageenan induced experimental enterocolitis on splenocyte function and nitric oxide production // *J. Surg. Res.* – 1996. – Vol.66, №1. – P. 6–11.

Schlegel R.A., Stevens M., Lumley-Sapanski K. et al. Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes // *Immunol. Lett.* – 1993. – Vol.36. – P. 283–288.

Shapiro H.M. Flow cytometry. – New York: Science, 1995. – 542p.

Tobacman J.K., Wallace R.B., Zimmerman M.B. Consumption of carrageenan and other water-soluble polymers used as food additives and incidence of mammary carcinoma // *Med. Hypotheses*. – 2001. – Vol.56 (5). – P. 589–598.

Van den Eijnde S.M., Boshart L., Reutelingsperger C.P.M. et al. Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis // *Cell Death Differ.* – 1997. – Vol.4. – P. 311–316.

Zwaal R.F., Schroit A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells // *Blood*. – 1997. – Vol.89. – P. 1121–1132.

Представлено: Н.Н.Іванова / Presented by: N.N.Ivanova

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 31.03.2016