

Подано експериментальні дані про особливості будови, розвитку і функціонування рослинних і тваринних організмів, одержаних науковцями НДІ фізіології та біологічного факультету. Викладено також нові дані про патофізіологічні закономірності й біохімічні механізми регуляції процесів на клітинному та органному рівнях після впливу різноманітних фізико-хімічних чинників.

Для викладачів, наукових співробітників, аспірантів і студентів.

The experimental dates development and function of the plant and animal organisms of research institute and biological faulty. Results of newly pathophysiological aspects and biochemical mechanisms of cell and organism processes regulation under the influence of different factors are presented.

For scientists, professors, aspirants and students.

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ РЕДАКТОР	Л.І. Остапченко, д-р біол. наук, проф.
РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ	Є.О. Торгалю, канд. біол. наук (відп. секр.); Т.В. Берегова, д-р біол. наук, проф.; С.В. Демидов, д-р біол. наук, проф.; М.Е. Держинський, д-р біол. наук, проф.; І.Ю. Костіков, д-р біол. наук, доц.; В.С. Мартинюк, д-р біол. наук, проф.; М.С. Мірошніченко, д-р біол. наук, проф.; М.М. Мусієнко, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. УААН; М.Ю. Макарчук, д-р біол. наук, проф.; В.К. Позур, д-р біол. наук, проф.; В.П. Поліщук, д-р біол. наук, проф.; В.К. Рибальченко, д-р біол. наук, проф.; В.В. Серебряков, д-р біол. наук, проф.
Адреса редколегії	03187, Київ-33, просп. акад. Глушкова, 2, корп. 12, біологічний факультет; ☎ (38044) 522 17 95
Затверджено	Вченою радою біологічного факультету 16.02.10 (протокол № 7)
Атестовано	Вищою атестаційною комісією України. Постанова Президії ВАК України № 1-05/7 від 09.06.99
Зареєстровано	Міністерством юстиції України. Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації Серія KB № 16053-4525 ПР від 09.11. 2009
Засновник та видавець	Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет" Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02
Адреса видавця	01601, Київ-601, б-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43 ☎ (38044) 239 31 72, 239 32 22; факс 239 31 28

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБІВ ОЧИСТКИ ПРОТЕЇНУ С

Протеїн С є основним компонентом антикоагулянтної ланки системи гемостазу. Недостатність протеїну С (набута або спадкова) призводить до розвитку тромботичних ускладнень. Тому одержання препаратів протеїну С є актуальною задачею біотехнології. В даній роботі представлено порівняльну характеристику хроматографічних методів очистки протеїну С. Показано перевагу методу імуноафінної хроматографії з використанням моноклональних антитіл до протеїну С.

Protein C is the main component of anticoagulant cascade of haemostasis system. Protein C deficiency (inherited or acquired) leads to development of thrombotic complications. That's why the obtaining of protein C preparations is an actual task of biotechnology. In the present paper the possible chromatographic procedures for protein C purification have been analyzed. The advantage of immunochromatography with monoclonal antibodies against protein C has been shown.

Вступ. Протеїн С (ПС), вітамін-К-залежний білок плазми крові, є фізіологічним антикоагулянтом, який виконує регуляторну функцію при активації процесів зсідання крові та фібринолізу, бере участь в локалізації системної запальної відповіді, зменшенні апоптозу ендотеліальних клітин у відповідь на дію цитокінів і розвитку ішемії [2].

Протеїн С є дволанцюговим глікопротеїдом з молекулярною масою 62 кДа, що синтезується в печінці у вигляді неактивного проферменту. Активація протеїну С здійснюється на фосфоліпідній мембрані комплексом тромбін-тромбомодулін [2]. Концентрація білка в крові складає 3-5 мг/л, час напівжиття активованого ПС – 16-30 хвилин [5]. Антикоагулянтна функція активованого ПС здійснюється за принципом негативного зворотнього зв'язку. Активовані протеїн С в присутності протеїну S як кофактору, іонізованого кальцію і фосфоліпідів високоселективно інактивує фактори Va і VIIIa шляхом їх гідролізу, тим самим перешкоджаючи перетворенню протромбіну в тромбін [2]. Клінічні дослідження показали, що ПС має перспективу широкого застосування. Препарат може бути використаний не тільки для лікування генетично дефіцитних на ПС пацієнтів, але також за септичного шоку для стримання розвитку запальної відповіді, при операціях заміни колінних і кульшових суглобів, некрозі тканин внаслідок дії кумарину, при гепариніндукованій тромбоцитопенії і т.і. Крім того, для діагностики та лікування велике значення має своєчасне визначення вмісту/активності ПС в плазмі крові людини, що дозволяє оцінити антикоагулянтний потенціал крові і є прогностичним показником [1, 2, 4].

Оскільки, на відміну від інших антикоагулянтів, протеїн С циркулює в кровотоці у вигляді зимогену та активується лише у випадку необхідності, концентрат ПС є засобом попередження і лікування тромбозів у пацієнтів з набутим дефіцитом ПС і сприяє уникненню проблем, пов'язаних з переливанням свіжозамороженої плазми, не викликаючи побічних ефектів за рахунок його антикоагулянтної та антитромботичної дії [16].

Для остаточного розуміння функцій ПС, особливо на молекулярно-клітинному рівні, уточнення його властивостей, які необхідно враховувати при практичному застосуванні препарату ПС, важливим є продовження досліджень як *in vivo*, так і *in vitro*. Створення модельних систем, наближених до умов *in vivo*, які б відтворювали протікання процесів за участі ПС як регулятора, вимагає використання електрофоретично чистого білкового препарату. Оскільки проблеми по виділенню протеїну С пов'язані з невисокою концентрацією білка в плазмі крові і складними умовами відокремлення ПС від інших вітамін-К-залежних білків плазми крові, метою роботи було порівняння ефективності різних способів очистки ПС з плазми крові людини та фракції IV-1 за Коном.

Матеріали і методи досліджень. Фракцію IV-1 за Коном (фракція білків плазми крові, яку одержано етаноловим осадженням за методом Кона) надано ЗАТ "Біофарма", м. Київ. Для одержання концентрату, що містив протеїн С, 15 г фракції IV-1 суспендували в фізіологічному розчині за присутності 1мМ бензамідину, додавали (NH₄)₂SO₄ до 40% насичення та інкубували 12 год при 4°C. Суспензію центрифугували протягом 40 хв при 6000 г. До отриманого супернатанту додавали (NH₄)₂SO₄ до 70% насичення, інкубували протягом 1 год при 4°C і потім центрифугували 40 хв при 6000 г. Отриманий осад розчиняли у 0,02 М трисфосфатному буфері рН 6,0, що містив 2 мМ бензамідину і центрифугували суспензію протягом 40 хв при 6000 г. Супернатант знесолювали на G-25. Одержану суміш білків використовували для отримання протеїну С.

Плазму крові донорів надано співробітниками Центру крові Київського військового госпіталю.

Контрольна плазма крові ліофілізована (Ренам, Росія). Метало-афінний та гідрофобний сорбенти синтезовано у відділі хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії за модифікованою методикою згідно [15]. Спочатку шляхом взаємодії епоксिमетакрилатів різної молекулярної маси з імінодіоцтовою кислотою синтезували метакрилатні мономери, які містили залишки імінодіоцтової кислоти. Синтезовані мономери кополімеризували

за радикально-ланцюговим механізмом з акриламідом та метиленбісакриламідом, внаслідок чого утворювалась нерозчинна матриця металоафінного сорбенту. Після синтезу отриману матрицю ретельно промивали водою та обробляли розчином сульфату міді. В результаті обробки утворювався металоафінний сорбент, який було використано для очищення протеїну С [3].

Електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності DS-Na проводили за методом Лемлі [13]. Як маркери використовували суміш білків Low Molecular Weight Calibration Kit (Pharmacia, 97; 66; 43; 31; 21,5; 14,4 кДа) та # 0671 Fermentas, 170; 130; 95; 72; 55; 43; 34; 26; 17; 11 кДа). Для відновлення дисульфідних зв'язків зразки обробляли 5% β-ME протягом 10 хв при 60°C. Гелі фарбували 0,125% розчином кумасі G-250, що містить 25% ізопропанолу і 10% оцтової кислоти, або азотнокислим сріблом. Концентрацію білків у розчині з нейтральним рН визначали за методом Бредфорда [6] у модифікації Седмака.

Амідолітичну активність визначали, використовуючи хромогенний субстрат S₂₃₆₆ для протеїну С ("Chromogenic", Швеція). Швидкість вивільненого під дією ферменту rNA визначали в двупроменевому режимі при 405 – 492 нм на рідері Titertec Multiscan MC ("Titertech", Фінляндія), приймаючи коефіцієнт поглинання 1М розчину rNA при 405 нм рівним 10500 [8].

В роботі використано сефадекс ДЕАЕ-А-50 (Pharmacia, Sweden), гідрофобний сорбент на основі епоксिमатакрилату та стиролу (Інститут біохімії НАНУ, Київ), металоафінний сорбент з використанням іонів міді (Інститут біохімії НАНУ, Київ), активована BrCN-сефароза 4В з іммобілізованими антитілами до протеїну С (люб'язно надано лабораторією біохімії Американського Червоного Хреста, м. Роквілл, США).

Результати досліджень та їх обговорення. Традиційне очищення протеїну С з плазми крові або з фракції IV-1 за Коном складається з декількох етапів: адсорбція сульфатом барію, фракціонування сульфатом амонію та застосування методів колоночної хроматографії. Перші два етапи вважаються класичними для отримання препарату протромбіну, але вони визнані доцільними також і для очищення протеїну С [9, 14, 15].

Методи включають використання різних афінних сорбентів для отримання вітамін К-залежних факторів зсідання крові (фактори II, VII, IX, X та протеїни С, S та Z) [11] або для фракціонування матеріалу, який містить

фактори II, VII, та IX та протеїн С [11, 12, 15]. З метою отримання останнього можна використовувати іонообмінну, гідрофобну та різновиди афінної хроматографії. Іонообмінна хроматографія є доцільною не тільки для одержання протеїну С з плазми крові, але і з фракції IV-1 за Коном [5, 14]. Остання є побічним продуктом при отриманні сироваткового альбуміну людини і є сировиною для виділення протеїну С (один грам концентрату фракції IV-1 містить приблизно 100 мкг протеїну С) [14].

Гідрофобну хроматографію використовують, як правило, для очищення протеїну С, отриманого з концентрату, що містить вітамін-К-залежні фактори зсідання крові II, VII, IX та протеїн С [10]. Метод афінної хроматографії придатний для одержання протеїну С з будь-якої сировини, що містить цей білок, і є найбільш зручним [7, 16].

З метою вибору ефективного методу одержання електрофоретично чистого функціонально активного протеїну С ми використали вищезазначені види хроматографії і порівняли отримані результати. Як сировину ми використовували плазму крові людини і фракцію IV-1 за Коном.

Імуноафінна хроматографія з використанням моноклональних антитіл до протеїну С

Принцип методу полягає в утворенні комплексу антиген-антитіло (в даному випадку – протеїн С-моноклональні антитіла до протеїну С) для селективної екстракції потрібного матеріалу з багатокомпонентної білкової суміші. Основна перевага методу полягає в його потенційно високій вибірковості, що дозволяє вилучати із складної суміші компоненти дуже низького вмісту. Крім того, отриманий на імуноафінних сорбентах білок може мати до 1000-кратного ступеню очистки [7].

Для одержання протеїну С (вміст білка в крові складає 3-5 мг/л) нами було використано активовану BrCN-сефарозу з іммобілізованими на ній моноклональними антитілами 7D7B10 до протеїну С (колонка 1x10 см). Сорбент врівноважували 0,05М трис-НСІ буфером рН 7,4, що містив 0,15М NaCl, 1мМ ЕДТА, наносили плазму крові (150 мл), яку попередньо було діалізовано проти того самого буферу. Швидкість нанесення матеріалу та швидкість елюції складала 0,65 мл/хв. Елюцію протеїну С здійснювали 0,05М трис-НСІ буфером рН 7,4, що містив 0,15М NaCl та 10мМ CaCl₂. Гомогенність одержаного білка перевіряли методом DS-Na електрофорезу. Профіль елюції представлено на рис. 1

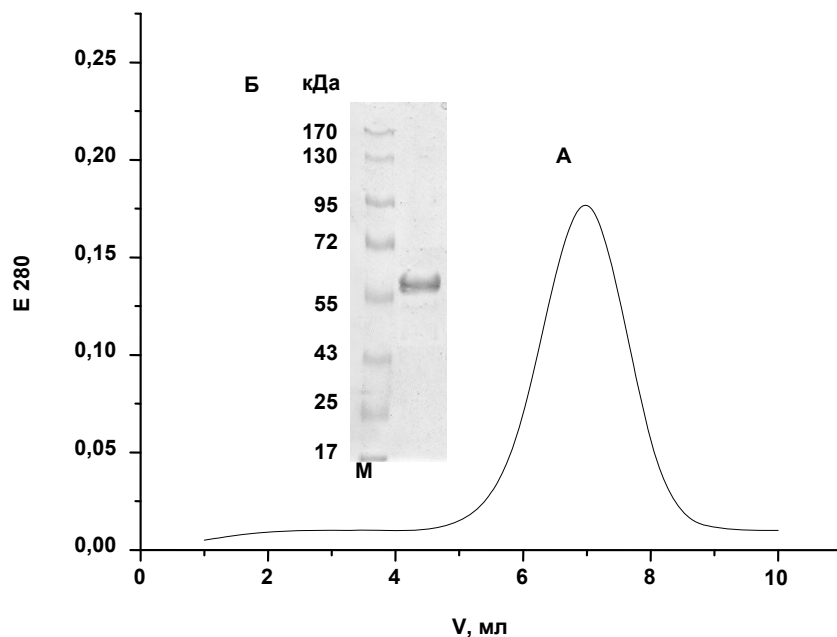


Рис 1. А – профіль елюції протеїну С на сефарозі 4В з іммобілізованими моноклональними антитілами до протеїну С; Б – електрофореграма отриманого матеріалу (М – маркери, кДа)

В результаті застосування цього способу виділення протеїну С можна досягти майже 100% виходу кінцевого продукту, який зберігає активність, якщо повторити нанесення на сорбент вихідної сировини. Перевагою даного способу виділення протеїну С з плазми крові є одноетапна процедура очищення і висока специфічність: з моноклональними антитілами зв'язується тільки протеїн С.

Недоліком є висока вартість афінного сорбенту, але при дотриманні умов його експлуатації та зберігання ця незручність компенсується багаторазовим використанням, стабільністю носія і високою якістю отриманого матеріалу.

Іонобінна хроматографія на сефадексі ДЕАЕ А-50

Для вилучення протеїну С з фракції IV-1 за Коном було використано сефадекс ДЕАЕ А-50 (колонка 2x23 см), врівноважений 0,02М трис-фосфатним буфером рН 6,0, що містив 2М бензамідину і 0,15М NaCl. Розділення ПС-вмісної білкової суміші (26 мл), одержаної як описано в Матеріалах і методах, проводили в тому самому буфері лінійним градієнтом 0,15–0,6М NaCl зі швидкістю елюції 20 мл/год. Хроматограма розділення суміші білків з використанням даного носія (рис. 2) практично співпадає з даними літератури [5, 12].

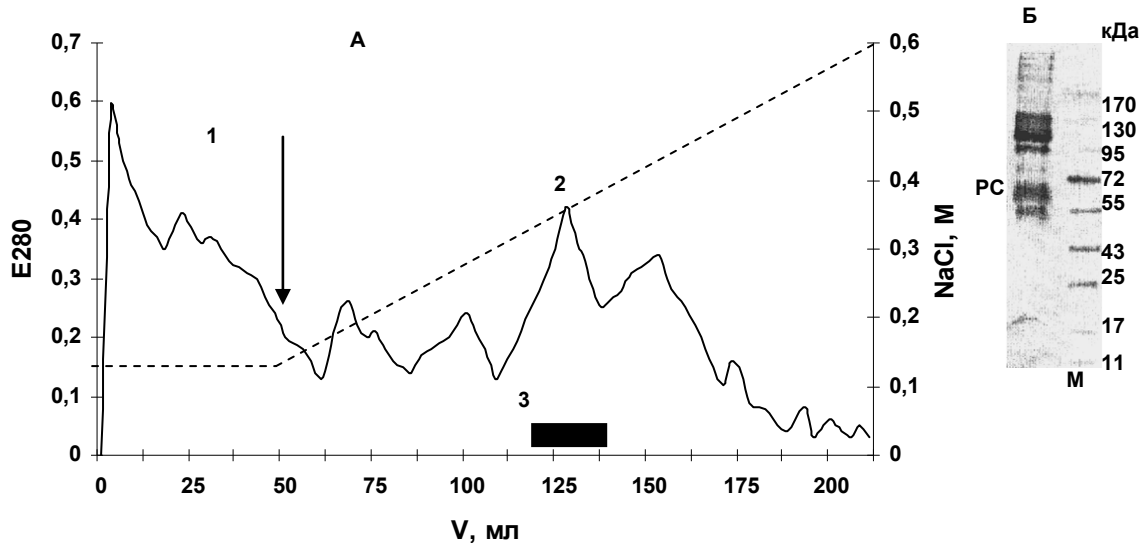


Рис. 2. А – хроматограма розділення суміші білків, отриманих з фракції IV-1 за Коном, на сефадексі ДЕАЕ А-50:

- 1 – матеріал, що не зв'язався з сорбентом; 2 – фракція, що містила протеїн С;
3 – зона активності протеїну С, визначена за хромогенним субстратом S2366.

Стрілка вказує на початок елюції лінійним градієнтом 0,15–0,6М NaCl. Б – електрофореграма фракції, що містила протеїн С

Однак використання зазначеного сорбенту не дало змоги отримати електрофоретично гомогенний білок. Цілком ймовірно, що для кращого очищення та економії часу слід, можливо, застосовувати більш ефективний аніонобмінник та ступінчастий градієнт.

Металоафінна хроматографія на мідь-вмісному сорбенті

Метод базується на використанні іонів металів як ліганду, з яким зв'язуються білки, що мають на поверхні залишки гістидину. Загальноновживаними є іони Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} . До іонів двох останніх металів значну афінність мають фосфопротеїни [14, 15] та деякі глікопротеїни. Метод є недорогим, відносно специфічним і придатним для отримання білків, які важко відокремити один від одного. Ці властивості сорбенту можуть бути використані для ефективного очищення протеїну С від протромбіну [9, 12, 14].

Нами синтезовано метало-афінний сорбент, який за властивостями був схожий з сорбентом, рекомендованим в роботах [14]. Молекула протеїну С містить 18 залишків гістидину, з них 15 є поверхнево доступними, тоді як протромбін має 5 гістидинових залишків, з яких поверхнево доступними є лише 4 [10, 14], що обумовлює різну силу зв'язування з лігандом. 15 мл білкової суміші, одержаної як описано в Матеріалах і методах, змішували з 15 мл сорбенту та інкубували протягом 2 год при 4°C. Елюцію з носія здійснювали 0,02 М фосфатним буфером рН 7,0, який містив 15 мМ імідазолу (гістидиновий конкурент) зі швидкістю 10 мл/год. Ре-

зультати хроматографії на металоафінному сорбенті представлено на рис. 3.

Отримана хроматограма відповідає даним літератури [14, 15]. Однак, електрофоретичний аналіз зразків елюату показав наявність високомолекулярних домішок. Тому наступним кроком в перевірці методів одержання ПС було застосування гідрофобної хроматографії.

Гідрофобна хроматографія на сорбенті 1

Для розділення вітамін-К залежних білків рядом авторів була запропонована методика використання гідрофобних сорбентів [10, 11]. В роботі [10] для очищення рекомбінантного протеїну С використовували Тоуреарл phenyl 650 М. Автори роботи вважають, що завдяки цьому сорбенту відбувається ефективно відокремлення протеїну С від інших вітамін-К-залежних білків. Поширеним афінним сорбентом є також Phenyl-сефароза НР. Доцільним може бути використання Тоуреарл phenyl 650 М, ДЕАЕ-сефарози-FF і феніл-сефарози [11]. Спосіб одержання протеїну С на гідрофобних сорбентах є одноетапним, доволі швидким і простим, однак має свої недоліки: по-перше, низький ступінь очистки; по-друге, спорідненість до даного носія, крім протеїну С, мають фактор Х зсідання крові та деякі супутні білки плазми крові. З цієї причини отриманий матеріал не є гомогенним і повинен підлягати додатковому очищенню.

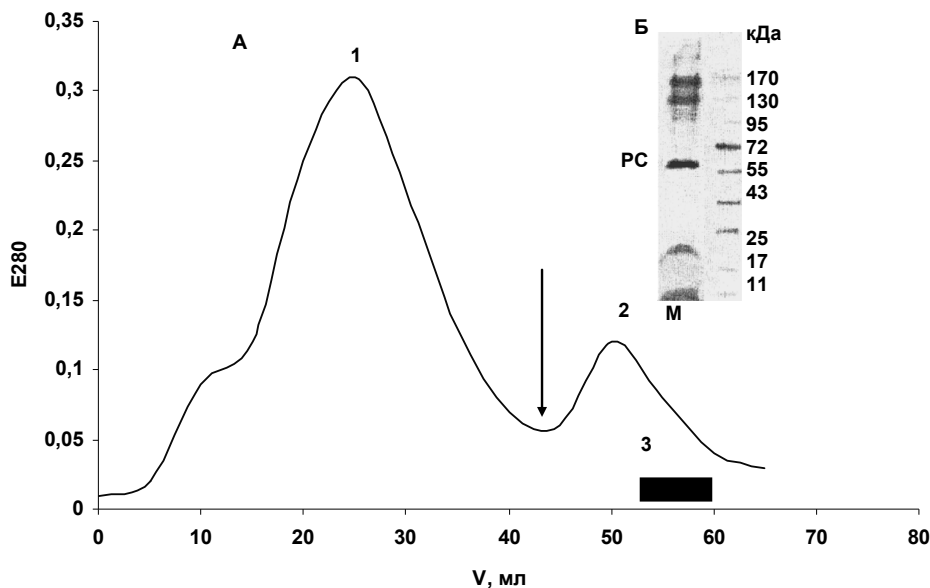


Рис. 3. А – хроматограма розділення суміші білків, отриманих з фракції IV-1 за Коном, на мідь-вмісному сорбенті: 1 – матеріал, що не зв'язався з сорбентом; 2 – фракція, що містила протеїн С; 3 – зона активності протеїну С, визначена за хромогенним субстратом S2366. **Б** – електрофореграма фракції, що містила протеїн С. Стрілка вказує на початок елюції

Нами було синтезовано гідрофобний сорбент 1 на основі стиролу. На рис. 4 наведено результати хроматографічного розділення на гідрофобному сорбенті 1 фракції IV-1 за Коном, яка підлягала попередньому фракціонуванню сульфатом амонію.

23 мл білкової суміші, одержаної як описано в Матеріалах і методах, в 0,1 М фосфатному буфері рН 7,0, що містив 1мМ бензамідину та 0,8 М сульфату амонію, наносили на сорбент, врівноважений тим самим буфером, і залишали на інкубування протягом ночі при 4°C. Матеріал, що не зв'язався з носієм, елюювали 0,1 М фосфатним буфером рН 7,0, що містив 1 мМ бензамідину і 1,1 М сульфату амонію зі швидкістю 20 мл/год. Елюцію РС проводили тим самим буфером, але без сульфату амонію, з тією самою швидкістю. Отриманий матеріал характеризували електрофоретично (рис. 4).

Аналіз зразків показав, що використання такого сорбенту для очищення IV-1 фракції за Коном було ефек-

тивніше, ніж сефадексу ДЕАЕ А-50 та мідь-вмісного сорбенту, однак отриманий матеріал теж містив домішки інших білків плазми крові і потребував додаткового очищення (застосування гель-фільтрації на сефакрилі S-200, Superdex-75 або іонообмінної хроматографії на іонообміннику, подібному до Mono Q).

Детальний аналіз одержаних результатів показав, що шлях отримання протеїну С традиційними хроматографічними методами не дуже вдалий, оскільки вся хроматографічна процедура доволі тривала: процес включає два етапи (матеріал, отриманий на сефадексі ДЕАЕ А-50, мідь-вмісному та гідрофобному сорбентах не є електрофоретично чистим і потребує подальшого очищення), що вимагає додаткової витрати часу і матеріалів, і, крім того, використані способи одержання РС не давали 100% виходу кінцевого продукту.

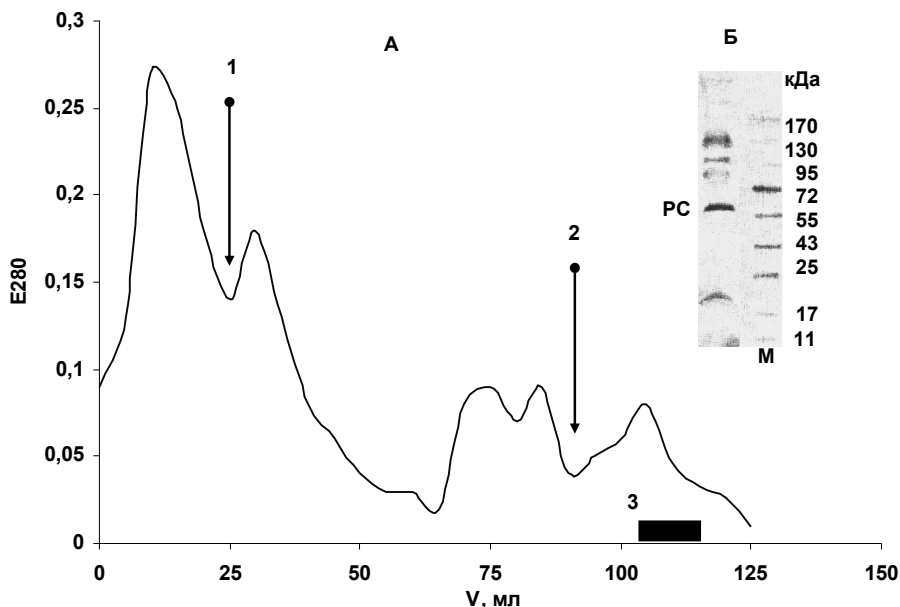


Рис. 4. А – хроматограма розділення суміші білків, отриманих з фракції IV-1 за Коном, на гідрофобному сорбенті 1: 1 – матеріал, що не зв'язався з сорбентом. Стрілка вказує початок елюції за присутності 1,1М (NH₄)₂SO₄; 2 – фракція, що містила протеїн С. Стрілка вказує на початок елюції за відсутності 1,1М (NH₄)₂SO₄;

3 – зона активності протеїну С, визначена за хромогенним субстратом S2366. **Б** – електрофореграма фракції, що містила протеїн С

В ході роботи ми перевіряли ефективність не тільки способів отримання ПС, але й сировину, з якої вилучали білок. Результати роботи показали, що IV-1 фракція за Коном, як джерело ПС, не є вдалим вибором для отримання цього білка з ряду причин: по-перше, для одержання матеріалу, який підлягає хроматографії, фракцію IV-1 необхідно піддати додатковому очищенню, процедура якого складається з 8 етапів [9]; по-друге, в отриманому матеріалі містяться не тільки віта-

мін К-залежні білки, одним з яких є ПС, але й інші компоненти плазми крові (альбумін, альфа-2-макроглобулін, антитромбін III, церулоплазмін та ін.), що значно утруднює процес одержання електрофоретично чистого препарату ПС; по-третє, матеріал отриманої фракції (а дуже часто і матеріал вихідної сировини) є частково проактивованим, що не дає можливості одержати повноцінний продукт. Попередню характеристику способів одержання протеїну С представлено в таб. 1.

Таблиця 1. Порівняння методів очистки протеїну С

*Метод очистки	**Вміст протеїну С отриманих фракцій, %
Іонообмінна хроматографія на сефадексі ДЕАЕ А-50	26
Металоафінна хроматографія на мідь-вмісний сорбенті	62
Гідрофобна хроматографія з використанням гідрофобного сорбенту 1	36
Імуноафінна хроматографія	98

Примітка: *в перших трьох випадках вихідною сировиною слугувала фракція IV-1 за Коном, в останньому випадку – плазма крові людини; **розрахунок вмісту протеїну С в отриманих фракціях проводили за результатами електрофорезу з використанням програми Totallab TL 100 (Nonlinear dynamics, UK).

Таким чином, порівняння якості фракціонування вітаміну К-залежних білків показало, що, незважаючи на необхідність додаткового очищення, найбільш ефективними для отримання протеїну С є мідь-вмісний та гідрофобний сорбенти. Однак, всі види хроматографії, крім імуноафінної, мають загальний суттєвий недолік: активність протеїну С у процесі отримання суттєво знижується.

Висновки. 1. Найефективнішим способом одержання препарату протеїну С, який можна використовувати для фундаментальних і прикладних досліджень, є імуноафінна хроматографія з іммобілізованими моноклональними антитілами до протеїну С.

2. Не завжди прагнення до дешевизни є виправданим і обґрунтованим, про що свідчать результати проведеної роботи. Спосіб очистки протеїну С методом імуноафінної хроматографії не є дешевим, однак дозволяє одержати кінцевий продукт високої якості.

1. Горницька О.В., Платонова Т.Н. Выделение и свойства активатора протеина С из яда щитомордника обыкновенного // Биомед. химия. – 2003. – т. 49, №5. – С. 470-478. 2. Гришук В.І., Чернищенко Т.М., Горницька О.В. Роль протеїну С в системі гемостазу та визначення його активності за різних патологій // Медична хімія. – 2009. – т. 11, №1. – С. 11-17. 3. Маркарян О.К., Березницький Г.К., Жерносєков Д.Д., Забава Л.К. Синтез металоафінного сорбенту з іммобілізованими іонами міді для виділення препарату протеїну С із плазми крові людини. III Всеукраїнська наук. Конференція студ. Асп. І молодих учених, "Хімічні проблеми сьогодення", 2009, Донецьк, С. 103. 4. Платонова Т.М., Горницька О.В., Мороз Є.Д. Застосування активатора протеїна С з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) для визначення активності про-

теїну С у плазмі крові за різних патологій // Лаб. діагностика. – 2001. – №3. – С. 28-31. 5. Bernardi M.E., Bermudez M.C., Hurvitz A. et al Preparation of prothrombin complex concentrate (PCC) at intermediate scale: first experience in Argentina // J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1, Suppl. 1. – abstract number CD016. 6. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 78, N2. – P. 248-254. 7. Burgess R.R., Thompson N.E. Advances in gentle immunoaffinity chromatography // Curr. Opinion Biotechnol. – 2002. – V. 13. – P. 304-308. 8. Erlanger B. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates // Arch. Biochem. Biophys. – 1966. – Vol. 115. – P. 206-218. 9. Fenton J.N., Fasco M.J., Stackrow A.B. et al Human thrombins. Production, evaluation and properties of α -thrombin. // J. Biol. Chem. – 1977. – Vol. 252, N 11. –P. 3587 – 3598. 10. Husi H., Walkinshaw M.D. Separation of human vitamin K-dependent coagulation proteins using hydrophobic interaction chromatography // J. Chromat. B. – 1999. – Vol. 736, N 1-2. – P. 77-78. 11. Josic D., Hoffer L., Buchacher A. Preparation of vitamin K-dependent proteins, such as clotting factors II, VII, IX and X and clotting inhibitor Protein C // J. Chromatogr. B. – 2003. – Vol. 790, N 1-2 – P. 183-197. 12. Kisiel W. Human plasma protein C. Isolation, characterization and mechanism of activation by α -thrombin // J. Clin. Invest. – 1979. – Vol. 64, N 3. – P. 761-769. 13. Laemli K.U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P. 680-685. 14. Lee J.J., Bruley D.F., Kang K.A. Effect of pH and imidazole on protein C purification from Cohn fraction IV-1 by IMAC // Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol. 599. – P. 61-66. 15. Perez-Campos E., Cordoba F., Perez-Ortega E., et al Purification of protein C, a natural anticoagulant from human plasma by affinity chromatography with concavalin A // Preparative Biochem. Biotechnol. – 1996. – Vol. 26, N 3-4. – P. 183-188. 16. Regnault V., Rivat C., Pfister M., Stoltz J.-F. Monoclonal antibodies against human protein C and their uses for immunoaffinity chromatography // Thromb. Res. – 1991. – Vol. 63, N 6. – P. 629-640.

Надійшла до редколегії 22.03.10

ЗМІСТ

Дворченко К., Вакал С., Береговий С. Перекисне окиснення у органах травного тракту за умов стресової виразки шлунка	4
Торгалo Є., Гайда Л., Степанов Ю. Вплив кверцетину та ліпофлавоу на активність глутатіонпероксидази за умов експериментального геморагічного інсульту	5
Лукашов Д. Параметри виведення важких металів з організму молюсків <i>Lumnaea stagnalis</i> (L.) як показники забруднення водних екосистем	6
Фалалєєва Т., Берегова Т. Аналіз участі центральних та периферичних іонотропних глутаматних рецепторів АМПА- та кайнатного- підтипів у реалізації базальної шлункової секреції кислоти у щурів	10
Крижановський С., Тукаєв С., Зима І. ЕЕГ-характеристики мнестичної діяльності у людей з різною частотою серцевих скорочень	12
Філімонова Н., Макарчук М., Сидько О. Електрична активність кори головного мозку людини при тестуванні оперативної пам'яті	15
Галенова Т., Конопельнюк В., Цудзевич Б. Активність ферментів антиоксидантного захисту у різних тканинах щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу	18
Прибитько І., Берегова Т., Харченко М. Вплив перерізки пілоричної гілки переднього стовбура блукаючих нервів на евакуацію з шлунка їжі вуглеводного складу та визначення швидкості пропульсії хімусу по дванадцятипалій кишці у собак	20
Цирюк О., Кухарський В., Непорада К. Зміни глікопротеїдних та протеогліканних компонентів шлункового слизу у щурів за умов тривалої гіпоацидності	23
Толстанова Г. Експресія транскрипційного фактору EGR-1 в товстій кишці щурів при експериментальному виразковому коліті	25
Чернінський А., Піскорська Н., Зима І. Асиметрія активації головного мозку людини при гедонічному сприйнятті одорантів	28
Пахольченко В., Тукаленко Е., Данилов С., Макарчук М. Рівень тривожності у тварин з різним досвідом соціальних взаємодій	30
Коваленко О., Говоруха Т., Бондаренко О., Макарчук М. Здатність до навчання та перекисне окислення ліпідів у щурів з різною схильністю до алкоголізму	32
Грудіна Н., Бацманова Л., Стороженко В. Преадаптація як елемент еволюції та фактор формування неспецифічної стійкості рослин	35
Сенін С., Дворченко К., Берегова Т., Остапченко Л., Вплив мультипробіотику "Симбітер® ацидофільний" на структурний стан ліпідів печінки щурів за умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії	37
Грищук В., Жерносєков Д., Березницький Г. Порівняльна характеристика способів очистки протеїну С	39
Злацький І., Гандзюра В. Вплив іонів міді на ембріональний розвиток <i>DANIORERIO</i> (Hamilton, 1822)	43
Антонюк Т., Оканенко О., Таран Н. Динаміка гліколіпідів вегетативних органів представників роду <i>RHODODENDRON L.</i> при аклімації до температурних умов лісостепу України	46
Андрійчук Т., Ракша Н., Драган Л., Лугова С. Залучення ферментів родини каспаз у радіаційно-індукований апоптоз лімфоцитів щурів	48
Скачкова О., Швець Ю., Храновська Н. Особливості міграції дендритних клітин у мишей лінії CBA	52
Гринюк І. Вплив H ₂ O ₂ ТА Ca ²⁺ на набухання мітохондрій тимоцитів	54
Гнатюк В., Мусієнко М., Гаврилюк В. Особливості радіонуклідного забруднення в рекреаційній зоні НПП "Подільські Товтри"	56

CONTENTS

Dvorshchenko C., Vakal S., Beregovuy S. Lipid peroxidation in organs of a digestive tract at stress stomach ulcer.....	4
Torhalo E., Gayda L., Stepanov Y. Impact quercetin and lipoflavon effect on the activity under conditions of experimental glutathione peroxidase hemorrhagic stroke	5
Lukashov D. Parameters of the metal depuration from organisms molluscs <i>LYMNAEA STAGNALIS</i> (L.) as factors of the water ecosystems contamination	6
Falaleeva T., Beregova T. Analysis of the participation of central and peripheral monotropony glutamate AMPA receptor-and-subtypes in kayinatnoho of basal gastric acid secretion in rats	10
Kryzhanovskiy S., Tukaev S., Zyma I. EEG-characteristics of mnemonic brain activity among people with different heart rate	12
Filimonova N., Makarchuk M., Sid'ko O. Electric activity of the cerebral cortex of the human at the working-memory tests	15
Galenova T., Konopelnyuk V., Tsudzevych B. Antioxidant enzyme activity in different tissues of rats of experimental type 2 diabetes mellitus	18
Prybyt'ko I., Beregova T., Kharchenko M. Influence pererizky pyloric branch of anterior trunk stray nerves on gastric evacuation of meals of carbohydrate composition and determining the propulsion himusu in the duodenum in dogs	20
Tsyrnyuk A., Kucharskiy B., Neporada K. Changes hlikoproteyidnyh proteohlikannyh components and gastric mucus in rats long hipoatsydnosti	23
Tolstanova G. Expression of transcription factor EGR-1 in the colon of rats with experimental ulcerative colitis	25
Cherninsky A., Piskorska N., Zyma I. The asymmetry of human brain activation during the perception of hedonic odors	28
Paholchenko V., Tukulenko Eu., Danilov S., Makarchuk M. Anxiety level in rats with different experience of social interactions	30
Kovalenko O., Govorukha T., Bondarenko A., Makarchuk M. Learning ability and lipid peroxidation of rats with different degree of alcoholic motivation	32
Grudina N., Batsmanova L., Storozhenko V., Preadaptation as evolution element and forming factor of non-specific plant resistance	35
Senin S., Dvorshchenko K., Beregova T., Ostapchenko I. Influence of multiprobiotic "Symbiter® acidophilic" on structural state of rat hepatic lipids under the conditions of long-term gastric hypochlorhydria	37
Gryshchuk V., Zhernosekov D., Bereznitskiy G. Comparison characteristics of the protein C purification methods.....	39
Zlatskiy I., Gandzyura V. Effect of cooper ions on embryogenesis development Danio Rerio (Hamilton, 1822)	43
Antonyuk T., Okanenko T., Taran N. Glycolipids dynamics of RHODODENDRON L. specie vegetative organs while acclimation to temperature conditions of Ukraine forest-steppe.....	46
Andreychuk T, Raksha N., Dragan L., Meadow S. Involvement of caspase family enzymes in radiation-induced apoptosis in rat lymphocytes	48
Skachkova O., Shvets Yu., Khranovska N. DC migration paculiarities in CBA mice	52
Grynyuk I. Influence of H ₂ O ₂ AND Ca ²⁺ on thymocytes mitochondrial swelling.....	54
Gnatyuk V., Musienko M., Gavrilyuk V. Features of radionuklidnogo contamination are in the rekreacyyniy area of NPP "Podil'ski Tovtri"	56