

УДК 543.865

Д.В. Криворотенко, М.Ю. Лосицький, А.О. Баланда, С.М. Ярмолюк
 Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ

БІЛКИ ТА ЦІАНИНОВІ БАРВНИКИ.

IV. БЕНЗТІАЗОЛО-4-[2,6-ДИМЕТИЛПІРИДИНІЄВІ] МОНОМЕТИНОВІ ЦІАНИНОВІ БАРВНИКИ ДЛЯ ГОМОГЕННОЇ ДЕТЕКЦІЇ БІЛКІВ

© Криворотенко Д.В., Лосицький М.Ю., Баланда А.О., Ярмолюк С.М., 2000

Досліджено спектрально-люмінесцентні властивості ряду нових монометинових ціанінових барвників у присутності білків та нуклеїнових кислот. Барвник P-5 з фрагментом 3-індолілоцтової кислоти в структурі виявив у присутності BSA підвищення інтенсивності флюоресценції на три порядки. Результати досліджень спектральних властивостей P-5 вказують на те, що зв'язування цього барвника з BSA відбувається шляхом взаємодії P-5 зі специфічним сайтом білка, сформованим на рівні третинної структури. Барвник P-5 може бути використаний для визначення білка в гомогенних системах детекції.

The spectral-luminescent properties of the series of novel monomethyne cyanine dyes in presence of proteins and nucleic acids were studied. The P-5 dye which contains the 3-indolylacetic acid template in its structure increased its fluorescence intensity in the complexes with BSA in 3 orders of magnitude. The results of studies show us that binding of P-5 with BSA occurs through the interaction of dye with the specific protein site, formed at the level of tertiary structure. We consider the P-5 cyanine to be the perspective fluorescent probe for the homogeneous protein detection.

Вступ. Кількісне визначення білка в біологічних рідинах має велике значення в аналітичній біохімії та медицині [1].

Особливо швидкою та зручною є флюоресцентна детекція білків у гомогенних системах, – коли немає потреби видаляти незв'язаний з білком надлишок молекул зонда. Така детекція базується на використанні зондів, які мають слабку власну флюоресценцію, а в присутності білків підвищують її інтенсивність у сотні разів [2].

Для кількісного визначення білків у розчині фірма Molecular Probes пропонує ряд чутливих флюоресцентних зондів, серед яких є і ціанінові барвники [2]. Найкращий з запропонованих зондів Nano Orange може використовуватись для визначення білка в інтервалі від 10 нг/мл до 10 мкг/мл. Проте Nano Orange не є специфічним до певного білка, отже, його не можна використовувати для визначення якогось одного білка в присутності інших.

Нещодавно було описано аніонні ціанінові поліметинові барвники АВ 633 та АВ 670 (рис. 1), які є специфічними зондами для детекції сироваткового альбуміну людини (HSA) [1]. Ці зонди мають нижню межу визначення білка у розчині 0,2 мкг/мл та максимальне підвищення інтенсивності флюоресценції при зв'язуванні з білковими молекулами до 1000 разів.

У нашій лабораторії проводиться пошук ціанінових барвників для гомогенної детекції біополімерів, зокрема і білків. В одній з попередніх робіт ми запропонували карбоціанін 14К (рис. 1) як чутливий зонд для детекції сироваткового альбуміну бика (BSA) та лектину [3].

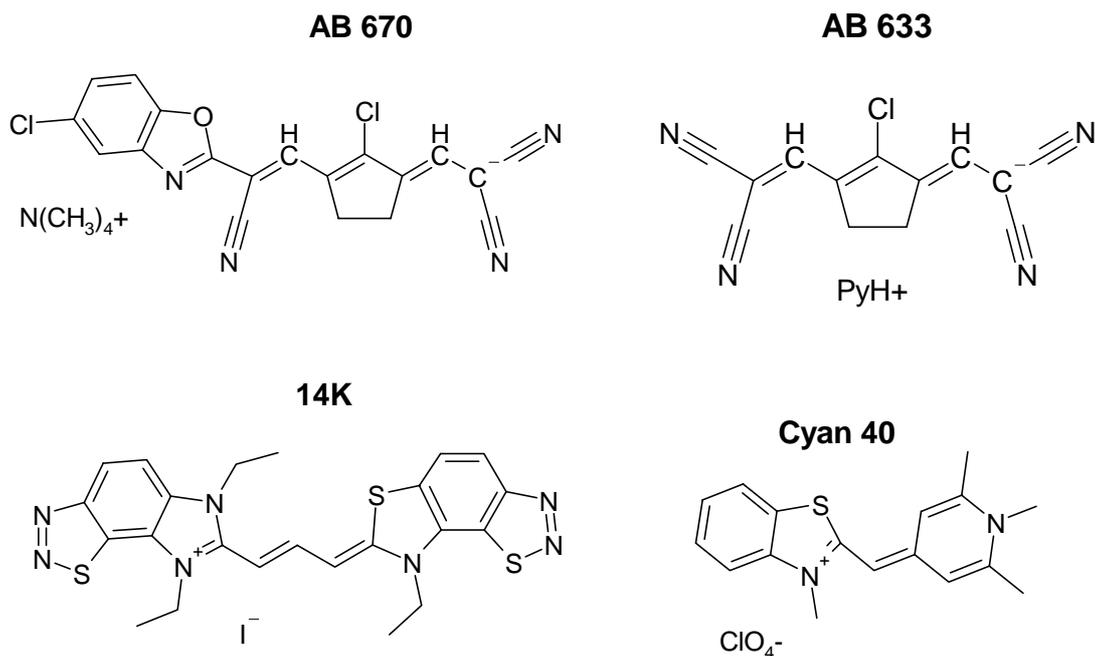


Рис. 1. Структурні формули ціанінових барвників

Раніше нами було сформульовано принцип “ефекторних груп” як підхід до створення нових флюоресцентних зондів для детекції біополімерів [4]. Ці групи не входять до хромофору молекули і практично не спотворюють його π -електронну систему, але впливають на зв’язування зонда з біополімером, а відтак і на флюоресцентні властивості цього зонда у присутності біополімера. Ми реалізували цей принцип при створенні ряду флюоресцентних барвників для визначення нуклеїнових кислот на основі барвника Суан 40 (рис. 1) [5]. Було досліджено спектральні властивості отриманих барвників у вільному стані та в присутності нуклеїнових кислот. Нами було показано, що “ефекторні групи” значно впливають на інтенсивність флюоресценції комплексів барвників з нуклеїновими кислотами [4].

Метою цієї роботи був пошук та спектральні дослідження нових чутливих флюоресцентних зондів для кількісного визначення білкових молекул у гомогенних системах детекції. Нами було синтезовано ряд ціанінових барвників на основі Суан 40 з різноманітними ароматичними багатоциклічними “ефекторними групами” та досліджено спектрально-люмінесцентні властивості отриманих ціанінів в присутності білків та нуклеїнових кислот.

Матеріали і методи. Використані у цій роботі барвники було синтезовано ацилюванням барвника з аміногрупою D-23 хлорангідридами карбонових кислот чи карбоновими кислотами в присутності КДІ (карбонілдіімідазолу) за [6] (рис. 2).

Для спектроскопічних досліджень були використані: загальна ДНК з еритроцитів курчат, загальна дріжджова РНК, BSA, гемоглобін, лізоцим, HSA, тріпсин, цитохром С, амінокислоти (гліцин, триптофан), “Sigma” (США). Денатурацію білків проводили нагріванням їх розчинів при 90°C протягом 45 хв за [7].

Спектроскопічні виміри. Спектри поглинання записували за допомогою спектрофотометра Spesord M-40 (Німеччина). Для реєстрації спектрів флюоресценції застосовували спектрофлюориметр “Hitachi” Model 850 (Японія).

Флюоресцентні виміри проводились у кварцевій кюветі (1 × 1 см).

Приготування стокових розчинів нуклеїнових кислот, білків та барвників. Стокові розчини барвників ($2 \cdot 10^{-3}$ М) готувались розчиненням наважки барвників в ДМФА. Стокові розчини білків та нуклеїнових кислот готували розчиненням наважки відповідного біополімера у буфері, їх концентрації становили 2 мг/мл білка і 4 мг/мл ДНК та РНК. Як буфери використовували Тріс-НСІ (рН 7.9), ацетатний буфер (рН 4.8) та гідрофосфатний буфер (рН 11.5).

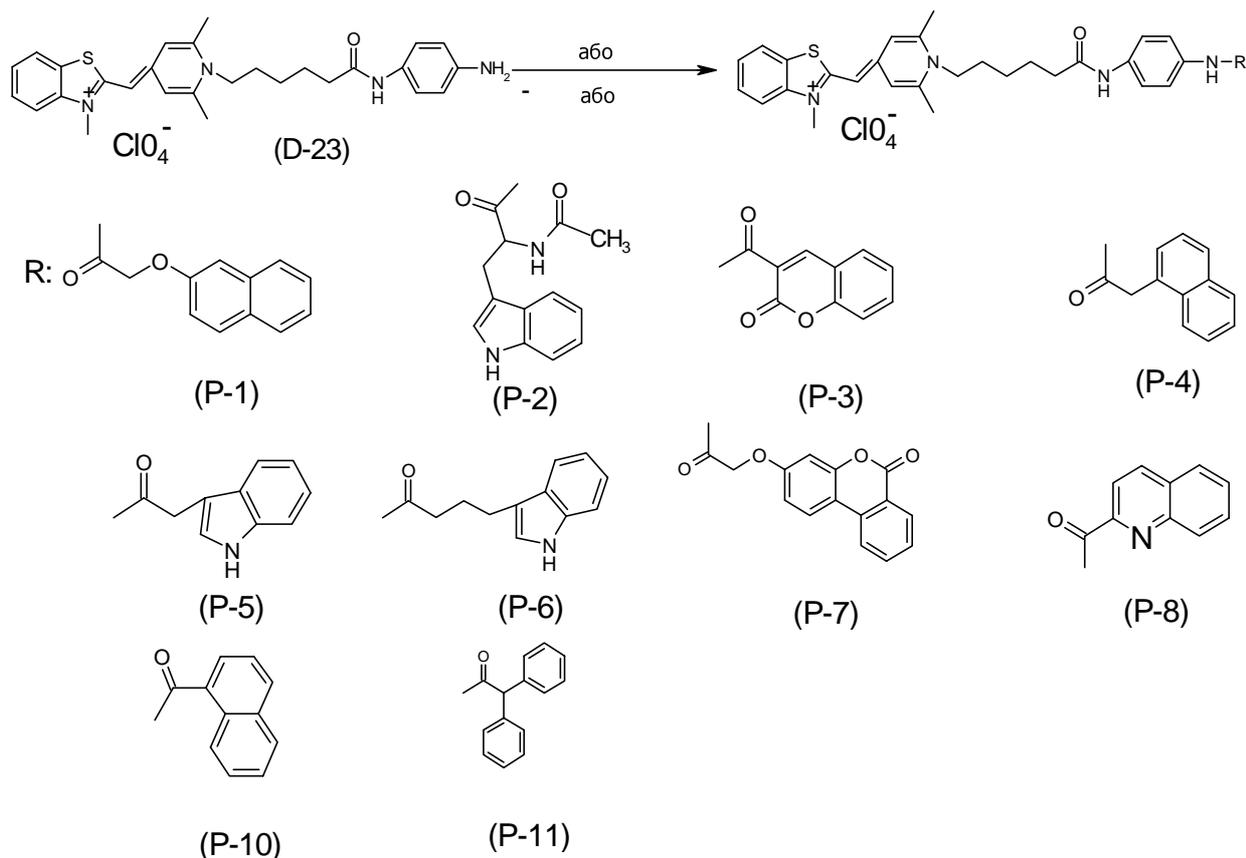


Рис. 2. Схема синтезу і хімічні структури досліджених ціанінових барвників

Приготування робочих розчинів. Робочі розчини барвників у вільному стані та в присутності білків і нуклеїнових кислот готувались безпосередньо перед вимірюванням розведенням стокових розчинів барвника та відповідного біополімера у буфері. Концентрація робочих розчинів барвників у кюветі становила 10^{-5} М. Концентрація білків у робочих розчинах дорівнювала 0,1 мг/мл, а нуклеїнових кислот – 40 мкг/мл.

Результати і обговорення. У попередній нашій роботі [4] було встановлено, що наявність в молекулі ціаніну фрагменту багатоциклічної ароматичної структури сприяє збільшенню інтенсивності його флюоресценції в присутності білка. З метою надання барвнику властивості специфічно взаємодіяти з білком нами було синтезовано серію ціанінів з ароматичними фрагментами як ефektorних груп.

**Характеристики спектрів поглинання та флюоресценції розчинів барвників
(рН_{буфера}=7.9)**

№	Спектри поглинання				Спектри флюоресценції		
	в ДМФА		в буфері		в буфері		
	$\lambda_{\text{погл.}}$, нм	$\varepsilon \cdot 10^5$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{погл.}}$, нм	$\varepsilon \cdot 10^5$, $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{фл.}}$, нм	ΔS , нм	I_0 , в.о.*
P-1	443	0.94	429 452*	0.42	579	150	0.72 0.12 ⁺
P-2	443	0.85	440	0.51	486	46	0.47
P-3	445	0.92	441	0.37	~560	~119	0.055 0.025 ⁺
P-4	444	0.88	430	0.22	581	151	0.40 0.12 ⁺
P-5	444	1.12	427 448*	0.38	575	141	0.29 0.16 ⁺
P-6	444	0.97	437	0.61	575	138	0.36 0.2 ⁺
P-7	444	0.88	426 455*	0.36	581	155	0.6 0.12 ⁺
P-8	444	0.97	438	0.38	575	137	0.12 0.088
D-8	446	0.74	443	0.7	484	41	0.32
P-10	444	0.98	432	0.38	580	148	0.175 0.15 ⁺
P-11	444	0.83	427	0.35	571	144	0.38 0.17 ⁺

Примітки: *Проявляється у формі плеча.

⁺ Інтенсивність флюоресценції вільного барвника виміряно на довжині хвилі максимуму флюоресценції барвника в присутності білка.

Спектральні властивості барвників (табл. 1). Спектри поглинання розчинів досліджуваних барвників у ДМФА мають один чітко визначений максимум, який розташований у межах 443–446 нм. Коефіцієнти молярної екстинкції набувають значень від $0.83 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ до $1.12 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. При переході до водного буфера (рН=7.9) спостерігається гіпсохромне зсування (3–18 нм) основного максимуму та зменшення коефіцієнта молярної екстинкції в 1,5–4 рази. При цьому смуги поглинання розширюються і поряд з основною смугою з'являється плече. Такі зміни можуть свідчити про утворення агрегатів барвників.

Для розчинів більшості барвників у буфері (рН=7.9) максимуми випромінювання знаходяться в інтервалі 560–581 нм (крім барвників P-2 та D-8, у яких максимуми флюоресценції розташовані при 486 і 484 нм, відповідно). Спектр флюоресценції барвника P-5 показано на рис. 3.

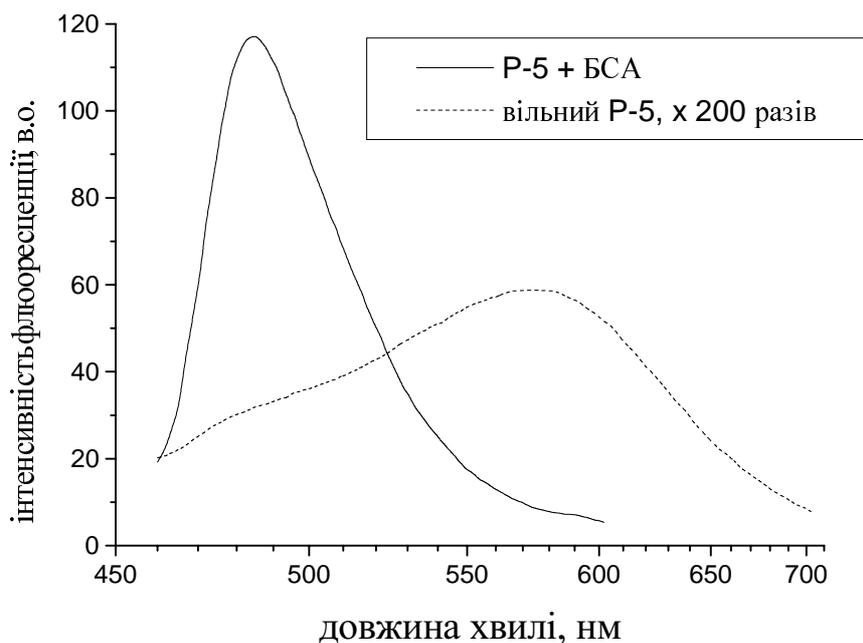


Рис. 3. Спектри флюоресценції барвника P-5 ($10^{-5}M$) у вільному стані (—) та в присутності 1 мг/мл BSA (- - -). Низькоінтенсивний спектр вільного барвника для наглядності збільшено у 200 разів. Інтенсивність подано у відносних одиницях (в.о.)

При зменшенні концентрації барвника довгохвильовий максимум флюоресценції зникає, а з'являється максимум приблизно 485 нм. Найімовірнішим видається, що довгохвильова смуга відповідає випромінюванню агрегатів барвника, а короткохвильова – випромінюванню його мономерних молекул. На підтвердження цього потрібно зазначити, що положення вищезгаданих смуг є наближеними до положень відповідно агрегатної (590 нм) та мономерної (473 нм) смуг барвника Суан 40 [8], на основі якого синтезовано досліджувані у цій роботі сполуки.

Усі барвники мають невеликі значення інтенсивності власної флюоресценції (0,12–0,72 відносних одиниць (в.о.)). Барвник P-3 має найнижчу інтенсивність флюоресценції – 0,055 в.о.

Спектральні властивості барвників у присутності BSA (табл. 2.). Максимуми поглинання барвників у присутності BSA розташовані в інтервалі 427–451 нм. У присутності BSA для усіх барвників, крім P-6 та P-7, спостерігається зростання коефіцієнта молярної екстинкції.

Максимуми флюоресценції барвників в присутності BSA лежать у межах 481–487 нм. На рис. 3 зображено спектр флюоресценції барвника P-5 в присутності BSA. Спектри розчинів барвників у присутності BSA мають стоксові зсуви 33–55 нм, крім P-7 (160 нм). Величина збільшення інтенсивності флюоресценції ΔQ є відношенням інтенсивності випромінювання барвника у присутності білка до інтенсивності випромінювання чистого барвника на довжинах хвиль максимумів відповідних спектрів. Для барвників P-4, P-5 та P-11 ця величина при концентрації BSA 0,1 мг/мл становить 29,25, 63,40 та 22,3, відповідно. Для барвників P-8, D-8 і P-10 інтенсивність флюоресценції в присутності 0,1 мг/мл білка збільшується від 6,7 до 8,9 раза. Інші барвники дають збільшення флюоресценції до 3,4 раза

Як було зазначено вище, більшість досліджуваних барвників у вільному стані утворюють молекулярні агрегати. Внаслідок цього максимуми флюоресценції вільних барвників зсунуті до

100 нм у довгохвильову область відносно відповідних максимумів в присутності BSA (рис. 3). Тому фактичне збільшення інтенсивності флюоресценції (ΔQ^*) є відношення інтенсивності випромінювання барвника в присутності білка до інтенсивності випромінювання вільного барвника, виміряної на довжині хвилі максимуму флюоресценції комплексу барвника з білком (надалі у цій роботі ми будемо використовувати тільки цю величину). Для барвників P-4, P-5 та P-11 значення ΔQ^* при концентрації BSA 0,1 мг/мл становить 97,5, 115 та 50, відповідно, а при концентрації BSA 1 мг/мл воно дорівнює 600 для P-4 та 750 для P-5.

Таблиця 2

Характеристики спектрів поглинання та флюоресценції барвників у присутності BSA ($\text{pH}_{\text{буфера}}=7.9$)

№	Спектри поглинання		Спектри флюоресценції			
	Барвники в присутності 1 мг/мл BSA		Барвники в присутності 0.1 мг/мл BSA			
	$\lambda_{\text{погл}}$, нм	$\epsilon \cdot 10^5$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{фл}}$, нм	I^{BSA} , в.о.*	ΔQ	ΔQ^*
P-1	428	0.46	483	1.2	1.7	10
P-2	440	0.57	482	1.57	3.3	-
P-3	444	0.43	481	0.083	1.5	3.3
P-4	449 437*	0.44	487	11.7	29.25	97.5
P-5	451 431*	0.45	484	18.4	63.4	115
P-6	439	0.59	482	1,18	3.3	5.9
P-7	427 454*	0.35	587	0.6 0.32 ⁺	1	2.7
P-8	446 431*	0.41	483	0,8	6,7	9,1
D-8	444	0.59	486	2,95	8.9	-
P-10	428 446*	0.52	482	1.55	8.8	10,3
P-11	442 427*	0.47	486	8.5	22.3	50

Примітки:* Проявляється у формі плеча.

+ Інтенсивність флюоресценції вільного барвника виміряно на довжині хвилі максимуму флюоресценції барвника у присутності білка.

Спектральні властивості барвників у присутності інших білків. З метою дослідження специфічності зв'язування синтезованих барвників з окремими білками ми провели спектральні дослідження барвників у присутності 5 інших білків, а саме HSA, лізоциму, тріпсіну, гемоглобіну та цитохрому С (табл. 3). У присутності HSA барвники P-4, P-5 P-7, P-8, P-10 та D-8 збільшують інтенсивність флюоресценції в 10–17 разів. На флюоресценцію барвників P-1 – P-3 та P-6 присутність HSA майже не впливає. У присутності інших білків інтенсивність випромінювання усіх досліджених барвників змінюється незначно (до 2 разів).

Таким чином, у водному розчині барвники P-8, P-10 та D-8 на порядок підвищують інтенсивність флюоресценції в присутності BSA та HSA, тоді як P-4 та P-5 проявляють чітко виражену специфічність до BSA.

Таблиця 3

Значення ΔQ^* барвників у присутності різних білків

	ΔQ^* барвників у присутності 0,1 мг/мл білка					
	BSA	HSA	трипсин	лізоцим	гемоглобін	цитохром С
P-4	97.5	11.5	1.1	1.3	0.83	0.9
P-5	131	13.2	1.1	1.2	0.9	1.0
P-7	2.7	10.3	0.83	1.2	0.67	0.9
P-8	9.1	16.8	1.25	1.14	0.91	0.8
D-8	8.94	12.6	1.21	1.24	1.03	0.94
P-10	10.3	16.7	1.2	1.27	0.92	1.0

Залежність флюоресценції барвників в присутності білка від рН буфера, наведена у табл. 4.

Таблиця 4

Підвищення інтенсивності флюоресценції барвника P-5 в присутності нативних (н) та денатурованих (дн) білків в різних буферах

рН	I_0 , в.о.	ΔQ^* , барвник в присутності 0.1 мг/мл білка										
		BSA		HSA		трипсин		лізоцим		гемоглобін		цитохром С
		н	дн	н	дн	н	дн	н	дн	н	н	дн
4.8	0.3	16.8	18.3	2.73	13.2	1	-	1.05	-	0.8	0.9	-
7.9	0.14	131	34.8	13.2	33.9	1.1	1.4	1.2	7.6	0.9	1.0	1.1
11.5	0.15	211	-	40.7	-	1.1	-	1.2	-	0.6	1.0	-

Відомо, що зміна значення рН середовища суттєво впливає на електростатичний заряд білкової молекули, що, своєю чергою, може вплинути на зв'язування білка з катіонним барвником. Тому для барвника P-5 була вивчена залежність інтенсивності випромінювання комплексу барвник-білок від рН буфера. Інтенсивність випромінювання вільного барвника при збільшенні рН буфера незначно зменшується (табл. 4). У присутності BSA та HSA значення ΔQ^* при переході до більш лужного розчину зростають відповідно в 1,6 та 3,1 раза, а при переході до більш кислого буфера зменшується в 7,8 та 4,8 раза, відповідно. Зокрема, у буфері з рН 11.5 барвник P-5 в присутності 1 мг/мл BSA збільшує інтенсивність флюоресценції у 1060 разів. Отже, електростатичний заряд BSA та HSA відіграє важливу роль у взаємодії з ними барвника P-5.

У присутності інших білків збільшення інтенсивності флюоресценції барвника як в кислому, так і в лужному буфері є незначним (не більше ніж 1,2).

Флюоресценція барвників в присутності денатурованих білків. Для того, щоб з'ясувати можливий механізм взаємодії барвників P-5 та D-8 з білками, ми порівняли значення ΔQ^* для цих барвників в присутності нативних та денатурованих білків. Для барвника P-5 значення ΔQ^* при переході від нативного до денатурованого білка в присутності BSA зменшується від 131 до 34.8, а в присутності HSA зростає від 13,2 до 33,9 (отже, для обох денатурованих білків значення ΔQ^* практично однакове) (табл. 4).

Можливо, взаємодія P-5 з глобулою BSA відбувається шляхом специфічної взаємодії з сайтом, сформованим на рівні третинної структури білка. При денатурації цей сайт руйнується і ми спостерігаємо зменшення ΔQ^* . У той самий час, з глобулою HSA барвник P-5, очевидно, взаємодіє неспецифічно, зв'язуючись з негативно зарядженою ділянкою поверхні через електростатичні, гідрофобні та Ван дер Ваальсові взаємодії. При денатурації білка його поліпептидний ланцюг розгортається, кількість “посадочних” місць для барвника збільшується, внаслідок чого зростає величина ΔQ^* . Незначне підвищення цієї величини при переході від нативного до денатурованого стану інших білків може бути пов'язане з підвищенням в'язкості розчину при денатурації білка.

На відміну від барвника P-5, барвник D-8 при переході від нативного до денатурованого білка підвищує значення ΔQ^* як у випадку BSA, так і у випадку HSA. Таким чином, цей барвник з обома білками взаємодіє неспецифічно, що і пояснює приблизно однакові значення ΔQ^* цього барвника.

Вплив ДНК, РНК та амінокислот на флуоресценцію барвників. Значення ΔQ^* для досліджуваних барвників в присутності РНК і ДНК (40 мкг/мл, або $1.2 \cdot 10^{-5}$ М основ) лежать у широкому інтервалі від 14,6 до 257 (табл. 5).

Таблиця 5

Значення ΔQ^* барвників у присутності ДНК та РНК

	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7	P-8	D-8	P-10	P-11
РНК	16.3	14.6	20.4	28.9	23.1	85	40.3	98.9	256	134	88.2
ДНК	34.2	43.8	53.6	51.7	68.8	174	84.2	177	108	239	224

Зокрема, для барвників P-4 та P-5 ΔQ^* дорівнює відповідно 51,7 та 68,8 в присутності ДНК і 28,9 та 23,1 в присутності РНК. Наявність амінокислот не впливає на флуоресценцію розчину барвника в присутності BSA.

Висновки. Серед досліджених барвників P-4 та P-5 виявили властивості специфічних флуоресцентних зондів для детекції BSA. Барвник P-5 в присутності 1мг/мл цього білка у буфері з рН 11.5 збільшує інтенсивність флуоресценції у 1060 разів. Присутність домішок інших біомолекул суттєво не впливає на визначення BSA.

Можна припустити, що взаємодія ціаніну P-5 з BSA відбувається шляхом взаємодії зі специфічним сайтом, сформованим на рівні третинної структури білка. У той самий час взаємодія цього барвника з HSA, як і барвника D-8 з BSA та HSA, відбувається шляхом взаємодії з зовнішніми негативно зарядженими ділянками білкової молекули.

Роботу було виконано згідно з умовами угоди про матеріальну підтримку № B507077 за програмою IPP Міністерства Енергетики США між Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ та Лівеморською національною лабораторією Каліфорнійського університету, м. Лівемор, Каліфорнія, США.

1. Kessler M. A. and Wolfbeis O.S. *Laser-induced fluorometric determination of albumin using longwave absorbing molecular probes // Analytical biochemistry.* 1992. 200. P.254–259.
2. Naughland R.P. // *Molecular probes. Detection and Quantitation of Protein in Solution; Molecular Probes.* Eugene: OR, 1996. P.180–182. 3. Ярмолюк С.М. Несиметричний карбоціаніновий барвник 14К – новий флуоресцентний зонд для гомогенного визначення білків в розчині // *Біополімери і клітина.* 2000. 16. №3. С.236–239. 4. Криворотенко Д.В.,

Ковальська В.Б., Ярмолюк С.М. Взаємодія ціанінових барвників з нуклеїновими кислотами. Синтез та спектральні властивості нових бензтіазоло-4-[2,6-диметилпіридинієвих] монометинових ціанінових барвників // Біополімери і клітина. 2000. 16. №2. С.145–152.

5. Yarmoluk S.M., Kovalska V.B., Smirnova T.V., Shandura M.P., Kovtun Yu.P., Matsuka G.Kh. Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. II. Spectroscopic properties of methyleneoxy analogues of Thiazole Orange // Біополімери і клітина. 1996. 12. №6. С.74–81.

6. Yarmoluk S.M., Kryvorotenko B.M., Kovalska V.B. Interaction of Cyanine Dyes with Nucleic Acids. XX. New Methods for the Preparation of Fluorescent Probes Based on Benzothiazol-4-[2,6-dimethylpyridinium] Cyanine Dyes // Dyes and Pigments, in press.

7. Привалов П.Л. // Исследование белков в денатурированом состоянии: Тез. Всесоюз. симп. химии белков. Тбилиси. 1990.

8. Ogul'chansky T.Yu., Yarmoluk S.M., Yashchuk V.M., Losytskyu M.Yu. The spectral response on DNA interaction with some monomethyne cyanine dyes // Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions, Edited by J.Greve, G.J. Puppels and C. Otto, 1999, Kluwer academic publishers, Dordrecht / Boston / London, pp. 309–310.

УДК 547.381.5

В.М. Сеньків, Г.О. Маршалок, Й.Й. Ятчишин, М.Д. Федевич,
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра аналітичної хімії

СИНТЕЗ АЛКІЛАКРОЛЕЇНІВ

© Сеньків В.М., Маршалок Г.О., Ятчишин Й.Й., Федевич М.Д., 2000

Описано оптимальні умови синтезу α -етилакролеїну за реакцією Манніха. Розглянуто основні методи отримання α -алкілакролеїнів та подано їх порівняльну характеристику з погляду кількісного виходу цільових продуктів та їх чистоти.

The most suitable conditions for synthesis of α -ethylacrolein by Mannich reaction are described in represented article. The main methods of obtaining α -alkilacroleins are discussed and their comparative descriptions from the point of view of yield of products and their purity are given.

Ненасичені альдегіди ряду акролеїну знаходять застосування як вихідні речовини для одержання відповідних ненасичених кислот. Ненасичені кислоти, своєю чергою, можуть бути використані для одержання складних ефірів цих кислот або безпосередньо як мономери при синтезі високомолекулярних сполук [1].

На сьогодні найбільш інтенсивно вивчаються переважно два шляхи синтезу α -алкілакролеїнів. У роботі [2] наведено спосіб одержання ненасичених альдегідів каталітичним окисненням олефінів киснем повітря. Відомо, що високої селективності процесу окиснення можна досягнути тільки у випадку окиснення пропілену та ізобутилену. Вищі гомологи етилену утворюють значну кількість побічних продуктів, що утруднює процес виділення кінцевого продукту.

Іншим технічним способом отримання α -алкілакролеїнів є альдольна конденсація формальдегіду з аліфатичними альдегідами. Однак цей процес також проходить з невисоким ступенем перетворення вихідних речовин і низькими виходами цільових продуктів [3].