

УДК 573 : 615.27

# МОДЕЛЬНЫЕ БИОМЕМБРАНЫ, КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИОННЫХ ДИАПАЗОНОВ ВРЕДНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ И ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

О.М. Алексеева<sup>1</sup>, А.В. Кременцова<sup>1</sup>,  
А.В. Кривандин<sup>1</sup>, О.В. Шаталова<sup>1</sup>,  
Ю.А. Ким<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимической физики РАН  
им. Н.М. Эммануэля, 119334, г. Москва,  
Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биофизики клетки  
Российской академии наук, Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
науки «Федеральный исследовательский  
центр «Пушкинский научный центр  
биологических исследований Российской  
академии наук», 142290, г. Пушкино,  
Московская область, Российская Федерация

**В** работе представлены данные по изменениям модельных биомембран (липосомы, тени эритроцитов, эритроциты), используемых, как тест-объекты, для определения тех областей концентраций биологически активных веществ, в которых не происходит нарушения структуры или функции экспериментальных объектов. В качестве биологически активных веществ отобрали синтетические: регулятор роста растений - мелафен, применяемый в малых дозах в предпосевной обработке семян и производные антиоксиданта – фенозана, феноксан и ИХФАНЫ. Показали методом ДСК, что производные фенозана в концентрациях равных  $10^{-5}$  М и более, разрушают микродоменную организацию в бислоях фосфолипидных мультиламеллярных липосом и переформируют белковые микродомены в тенях эритроцитов. Мелафен в малых и больших концентрациях полимодно изменяет микродоменную организацию в бислоях фосфолипидных мультиламеллярных липосом, не разрушая структуру, не влияет на белковые микродомены в тенях. Спектральным анализом выявили увеличение проницаемости мембран в изолированных целых эритроцитах при действии мелафена в больших и малых концентрациях. Методом малоуглового дифракционного рассеяния показали отсутствие влияния мелафена в широком диапазоне концентраций на толщину фосфолипидных бислоев и порядок их упаковки в мультиламеллярных липосомах.

**Ключевые слова:** фосфолипиды, мультиламеллярные липосомы, биологически активные вещества, тени эритроцитов, эритроциты, ДСК, малоугловое дифракционное рассеяние.

**Введение.** Необходимость определения концентрационных ограничений при применении биологически активных веществ (БАВ) вызвана тем, что использование в «терапевтических» концентрациях, обычно миллимолярных и более, вызывает и побочные эффекты. Отслеживание на клеточном и субклеточном уровне мишеней и механизмов действия БАВ может позволить предупредить негативное влияние. На примере син-

тетических БАВ: регулятора роста растений гидрофильного мелафена [1] и производных антиоксиданта фенозана: его калиевой соли – гидрофильного феноксана, и гидрофобизованных ИХФАНов [2,3], было исследовано действие БАВ в широком диапазоне концентраций (разведений) на структуру и функции модельных и биологических экспериментальных объектов разного уровня организации.

**Алексеева Ольга Михайловна (Alekseeva Olga Michailovna)**, старший научный сотрудник ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, olgavek@yandex.ru

**Кременцова Анна Владимировна (Krementsova Anna Vladimirovna)**, кандидат физ. мат. наук, старший научный сотрудник ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, akrementsova@mail.ru

**Шаталова Ольга Владимировна (Shatalova Olga Vladimirovna)**, научный сотрудник Центра рентгенодифракционного анализа ФГБУН Института биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Shatalova@sky.chph.ras.ru

**Кривандин Алексей Владимирович Krivandin Aleksey Vladimirovich)**, кандидат физ. мат. наук, ведущий научный сотрудник, руководитель Центра рентгенодифракционного анализа ФГБУН Института биохимической физики РАН .a. krivandin@sky.chph.ras.ru

**Ким Юрий Александрович (Kim Yuri Alexandrovich)**, доктор физ. мат. наук, ведущий научный сотрудник Института биофизики клетки РАН, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

В качестве первых наиболее простых липидных модельных мембранных объектов использовались фосфолипидные мультиламеллярные липосомы [4]. Устойчивые липосомы в виде взвеси в фосфатном буфере были сформированы или из синтетического индивидуального фосфолипида димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), или из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина. Мультиламеллярных липосомы формировали с единообразным фосфолипидным составом для того, чтобы исследовать методом ДСК влияние БАВ на структурном уровне микродоменов. Тестирование влияния БАВ на следующем структурном уровне – организации упаковки бислоев в многослойной липосоме и толщинах этих бислоев, проводили методом МУРР в взвеси мультиламеллярных липосом, состоящих из упорядоченной смеси природных фосфолипидов. Схематическая структура фосфолипидных мультиламеллярных липосом показана на рисунке 1. Как модель мультиламеллярные липосомы отражают многослойное строение или взаимное расположение внутриклеточных органелл (митохондрий, аппарата Гольджи, ядерной оболочки, эндоплазматического ретикула, плазмалеммы).

Необходимо отметить, что, так как в исследовании использовались БАВ разной природы: гидрофобные ИХФАНЫ и гидрофильные феноксан и мелафен, то мы обосновали насыщение всей структуры мультиламеллярной липосомы этими веществами, основываясь на работах Антонова В.Ф. с соавторами [5], в которых было показано образование нанопор при определенных структурных состояниях бислоя.

По данным электронной микроскопии и ДСК известно, что в фосфолипидном бислое, состоящем только из ДМФХ, во временном и температурном промежутке между эндотермическими фазовыми переходами: предпереходом и основным фазовым переходом, существует риппл-фаза [6]. Предпереход – это неярко выраженный одиночный пик на кривых плавления в области 14-15°C, при котором происходит перестройка упорядоченной упаковки фосфолипидов в гель-фазе в риппл-фазу (рифленую фазу). При повышении температуры до 24,3°C достигается основной фазовый переход ДМФХ – это одиночный пик с большой амплитудой, отражающий кооперативную перестройку в менее упорядоченное состояние – фазу жидкого кристалла. Методом электронной микроскопии риппл-фазу наблюдали для ДМФХ и ДПФХ (дипальмитоилфосфатидилхолина) с характерным для каждого вида липидов периодом волнистости. Периодичность волнистости и ее амплитуда меняется в зависимости от факторов, влияющих на бислои [6]. С точки зрения воздействия БАВ на мембраны риппл-фаза представляет большой

интерес, т.к. в этот период сосуществуют фосфолипидные микродомены, находящиеся в состоянии гель-фазы и микродомены – в состоянии жидкого кристалла. Это и обуславливает рифленую картину при электронной микроскопии. На стыке между микродоменами образуются короткоживущие гидрофильные наноразмерные поры [5], через которые гидрофильное вещество проникает ко всем внутренним липосомам, составляющим мультиламеллярную липосому (рис.1). Гидрофобные вещества накапливаются в гидрофобных областях бислоев. Поэтому влияние БАВ на липидный бислой в настоящей работе тестировали методом ДСК по изменениям параметров пика основного фазового перехода ДМФХ.

В максимуме основного фазового перехода при 24,3°C, по площади пика определяется теплосмкость эндотермического пика, на полувысоте пика определяется полуширина – величина, обратная кооперативности перехода. В присутствии БАВ максимум перехода может сдвигаться по температурной шкале, что свидетельствует о влиянии БАВ на бислой, также и другие параметры могут быть изменены. Экспериментальный объект и ДСК метод в случае тестирования ДМФХ липосом – это адекватная модель для исследования действия БАВ на липидную составляющую биомембран. БАВ могут оказывать существенное влияние на липидный бислой, изменяя параметры фазовых переходов липидов, что указывает на локализацию БАВ в бислое, и позволяет предположить механизмы взаимодействия с липидами. Плавление бислоя в нашей работе происходит при физиологических температурах.

Итак, во время риппл-фазы происходит нарушение регулярности структуры (нарушение дальнего порядка) – одновременно с микродоменами, находящимися в состоянии жидкого кристалла, имеются и микродомены в состоянии гель-фазы. Между этими разнородными микродоменами образуются короткоживущие нанопоры с гидрофильными каналами [5]. В результате малые гидрофильные молекулы проникают во все внутренние водные прослойки мультиламеллярной липосомы и могут оказывать на бислои поверхностное влияние. Гидрофобные вещества насыщают гидрофобные области каждого бислоя. В результате БАВ, действуя снаружи бислоев и внутри, изменяют параметры во всей многослойной липосоме. По ДСК параметрам кривых плавления индивидуального фосфолипида с ярко выраженным пиком основного фазового перехода при воздействии БАВ, добавленного в разных концентрациях, четко выявляется доза-зависимая способность вещества встраиваться в фосфолипидный бислой или же действовать с поверхности бислоя. При определенных концентрациях либо разрушается микродоменная структура бислоя,

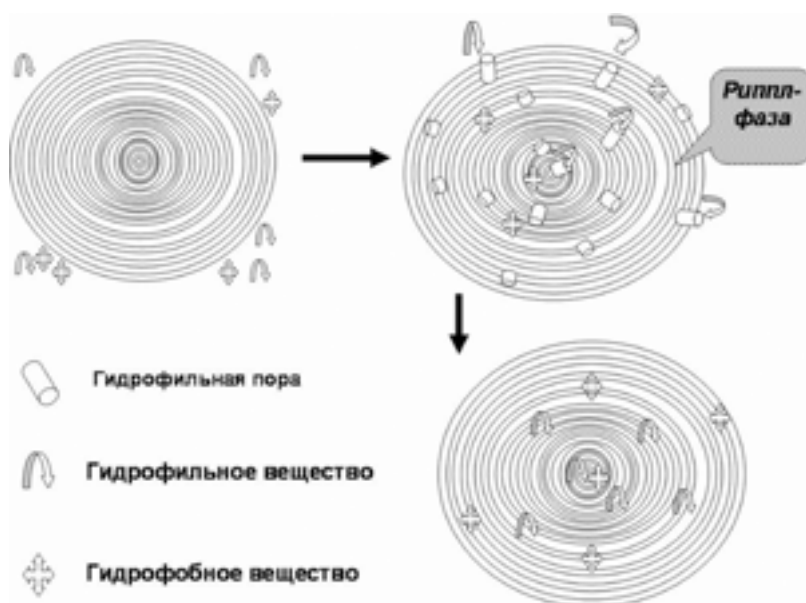
либо укрепляется для противодействия различным факторам внешней среды.

Исследования влияния БАВ на липидные бислои проводятся уже достаточно давно. Актуальность таких исследований обосновал Харакоз Д.П. [7]. В этой работе рассматривалась возможная физиологическая роль фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах. По-видимому, сдвиг температуры тела животного при гибернации или обычном сне вызывает перестройки микродоменов в бислоиных мембранах, что способствует упорядочиванию состава и структуры биомембран. Задача многочисленных работ по исследованию влияния БАВ на биомембраны состоит в выявлении возможностей регуляции фазового перехода «жидкое-твердое». В мембране, находящейся в состоянии жидкого кристалла, ее белковые компоненты (ионные каналы, ионные обменники, ионные насосы, рецепторы, ферменты) конформационно подвижны, и их функции могут быть активированы. При твердом состоянии мембраны функции белков угнетены. Необходимо отметить, что термограммы фазового перехода в мембранах, состоящих из единственного фосфолипида, имеют четко выраженные предпереход и основной переход. Поэтому достаточно просто определять воздействие БАВ на термоиндуцированные параметры липидного бислоя. Методом ДСК в мультиламеллярных фосфолипидных липосомах отслеживают влияние БАВ разной природы на организацию и перестройки микродоменов.

Для тестирования методом МУРР следующие организационного уровня эксперименталь-

ных объектов были использованы липосомы, содержащие смесь фосфолипидов. В состав мультиламеллярных липосом, сформированных из яичного лецитина, входят природные фосфолипиды: фосфодитилхолин, фосфатидилэтаноламин и в малых количествах фосфатидилинозитол и сфинголипиды. Их молекулы различны по строению и составу. Они содержат полярные группы: холин, этаноламин, инозит, а также жирнокислотные остатки разной величины и степени насыщенности. С точки зрения адекватности модели отметим, что такие фосфолипиды имеются практически во всех мембранах клеток животного происхождения. Необходимо отметить, что именно наличие заряда, длина молекул и их насыщенность позволяет образовывать мозаичную мембрану. Это играет основную роль в стабилизации клеточных мембран, их структурной целостности и обеспечении функционирования мембранных компонентов. В клетках молекулы, составляя бислой, взаимно располагаются соответственно своим стереоспецифическим характеристикам, осуществляя белок-липидные взаимодействия. Так, для активной работы интегрированных и ассоциированных мембранных белков: рецепторов, каналов, ионных обменников, насосов и ферментов, необходим определенный состав липидного окружения этих белковых структур.

Температуры плавления природных фосфолипидов в сложной смеси в значительной степени перекрываются, выделить отдельные индивидуальные пики можно только с помощью математических методов, что может и не отражать ре-



**Рис. 1.** Схема строения мультиламеллярных липосом, сформированных из фосфолипидов. Во время «риплл-фазы» образуются наноразмерные гидрофильные поры [5], и гидрофильные БАВ проникают к поверхности всех бислоиных липосом в составе мультиламеллярных липосом. Гидрофобные БАВ насыщают бислои, встраиваясь среди фосфолипидов.

ального структурного состояния микродоменов. Домены могут быть смешанными по составу. БАВ, встраиваясь или разрушая, будут влиять на состав микродоменов. При плавлении из-за разной стереоспецифичности липиды проявляют разную способность к латеральной диффузии и «флип-флоп»-перескокам в листках бислоев [8,9].

Картина термограмм при ДСК плавлении получится сложная, и количественная обработка и интерпретация будут затруднены. Поэтому нами был использован один из методов рентгенодифракционного анализа – малоугловое рентгеновское рассеяние МУРР [10]. Этот метод позволяет, проведя анализ измеренной интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния суспензией многослойных липосом, получить информацию о пространственной структуре липидных мембран и характере их взаимного расположения (укладке) в мультиламеллярных липосомах. Есть возможность определить механизм влияния БАВ по разрыхлению и уширению бислоев или уплотнению и сужению толщин бислоев, а также изменению пространства между бислоями. Это важно, т.к. в процессе жизнедеятельности клеток происходит слияние мембран, образование перемычек, разрыв и расхождение мембран [6]. Соответственно БАВ могут выступать в роли регуляторов этих процессов.

Для тестирования влияния БАВ на белок-липидные взаимодействия были использованы модели биомембран на следующем организационном уровне – тени эритроцитов. Это замкнутые оболочки эритроцитов, лишенные гемоглобина, но содержащие весь цитоскелет [11-13]. Если модели мультиламеллярных фосфолипидных липосом имитируют структуры клеточных органелл, то тени эритроцитов отражают основные элементы клетки – оболочку и цитоскелет. Для тестирования влияния БАВ на такой модели также применили метод ДСК, но с другими параметрами. Кривые эндотермических термограмм при прогревании взвеси теней эритроцитов показывают характеристики термоиндуцированной денатурации всех белковых микродоменов. Отражается влияние БАВ на перестройку ионных каналов, их компонентов и структурных белков. БАВ либо усиливают устойчивость к денатурации, либо ослабляют. В работах Акоев V.R. с соавторами [14] были обнаружены перестройки в белковых микродоменах теней эритроцитов человека при оксидативном стрессе, характерном для многих патологий. По-видимому, ДСК тестирование мембран и цитоскелета эритроцитов может помочь в диагностике.

Следующую ступень усложнения организации экспериментального объекта обеспечили изолированные клетки. Моделью были целые, полу-

ченные из кровяного русла, эритроциты. Ранее в работах Генделя Л.Я. с соавторами [15] было показано, что под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана происходят изменения поверхностной архитектоники эритроцитов. При этом антиоксидант встраивается преимущественно в верхний листок бислоя и меняет морфологию эритроцитов. В работах Бурлаковой Е.Б. с соавторами [16] подтверждено не только воздействие фенозана на структурные свойства – микровязкость мембран, но и влияние на биохимические свойства ферментов. В настоящей работе, учитывая эти данные по модификации мембраны, провели исследование влияния БАВ на целостность мембраны эритроцитов. Ее оценивали по проницаемости мембраны, характеризующейся степенью утечки гемоглобина из эритроцитов [17].

В настоящей работе все исследования воздействий биологически активных веществ: мелафена и производных фенозана, проводились в широком диапазоне концентраций. Такой подход к исследованиям был обусловлен тем, что необходимость исследований малых доз (концентраций или разведений, если нельзя точно определить) достаточно актуальна. Известно, что гидрофобные вещества, добавленные к экспериментальным объектам в малых концентрациях, накапливаются в гидрофобных областях мембран и в гидрофобных карманах белков до средних и больших концентраций. Во многих случаях БАВ не выводятся из организма, и далее могут возникать побочные эффекты. Гидрофильные БАВ также могут накапливаться в гидратных областях. Кроме того, происходит метаболизм или катаболизм БАВ в организме животных. В работах Прокопова А.А. и соавторов [18] при изучении метаболизма адаптогена фенозан-кислоты в организме кроликов обнаружено, что фенозан расщепляется на 2 метаболита, обладающих большей гепатопротекторной способностью, чем исходное вещество. Как показано в работах Бурлаковой Е.Б. с соавторами [19] репарация повреждений, нанесенных малыми дозами, как БАВ, так и радиации, может не активироваться, что представляет дальнейшую опасность. В итоге на основании перечисленных выше обоснований использования экспериментальных моделей, и тестирования влияния биологически активных веществ указанными методами *целью настоящей работы* явилось определение концентрационных границ для применения биологически активных веществ без деструкции биологических объектов.

**Материалы и методы исследования.** ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин, яичный лецитин (Sigma); NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , (Sigma); мелафен – меламинавая соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты, синтезирован в ИОФХ РАН им. А.Е. Арбузова; феноксан – калиевая соль фе-

нозана –  $\beta$ -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота, синтезирована в ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова; ИХФАНы – сложноеэфирные производные (метилокса) (3,5 дитрет бутил - 4-гидроксифенилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов, синтезированы в ИБХФ РАН им. Н.М. Эмануэля.

*Приготовление многослойных везикул.* Для приготовления водной дисперсии многослойных везикул из ДМФХ (0,2-0,3 мМ) использовали фосфолипид и хлороформ без дополнительной очистки согласно методу, предложенному McMullen T.P.W. [20]. Для получения липосом ДМФХ растворяли в хлороформе 1 мг/мл, под аргоном высушивали до состояния тонкой пленки на стенках колбы. На 12 часов для полного удаления растворителя колбу помещали под вакуум. Затем добавляли 10мМ фосфатный буфер pH 7,4 и 60 мин нагревали на водяной бане при температуре выше фазового перехода (45-50° C), и 30 мин при комнатной температуре гидратировали на шейкере. По данным электронной микроскопии полученные липосомы имеют мультиламеллярную структуру и достигают размеров до 2000 [4].

*Приготовление водных растворов и суспензий биологически активных веществ.* Водные растворы БАВ: мелафена или феноксана, в широком диапазоне концентраций ( $10^{-17}$ - $10^{-2}$  М) приготавливали методом последовательных разбавлений с интенсивным перемешиванием с помощью вортекса. Суспензии ИХФАНов приготавливали также методом последовательных разбавлений с интенсивным перемешиванием с помощью вортекса. Исходный концентрированный раствор ИХФАНов готовили в этаноле. Перед измерениями раствор БАВ добавляли в образец сравнения, содержащий фосфатный буфер, образец вносили в контрольную ячейку. Для приготовления экспериментального образца раствор БАВ добавляли в приготовленную дисперсию ДМФХ до необходимого молярного соотношения. Затем образец вносили в ячейку для измерения.

*Получение эритроцитов и теней эритроцитов* проводилось по методам дифференциального центрифугирования с соблюдением температурного режима [11-15].

*Измерение выхода гемоглобина* проводилось спектрофотометрическим методом [21].

*Микрокалориметрическое исследование.* Температурная зависимость избыточного удельного теплопоглощения экспериментальных модельных объектов отражалась в виде кинетической кривой – термограммы. Термограммы водных дисперсий многослойных везикул, сформированных из ДМФХ, регистрировали на дифференциальном адиабатном сканирующем микрокалори-

метре ДАСМ-4 (Специальное Конструкторское Бюро АН СССР, г. Пущино). Устройство, принцип работы и основные характеристики ДАСМ-4 описаны в работах Privalov P.L., Plotnikov V.V. [22]. Измерительная и сравнительная ячейки выполнены из платины и имеют объем 0,47 мл. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин. При модификации ДСК метода скорости прогрева составляли 0,125 град/мин; 0,25 град/мин; 0,5 град/мин; 1 град/мин. Уровень шума не превышал 30 мДж/К, воспроизводимость базовой линии 160 мДж/К.

Температурную зависимость избыточного молярного теплопоглощения (термограммы) каждого образца водной суспензии многослойных везикул, сформированных из ДМФХ в смеси с БАВ регистрировали в режиме цикла не менее трех раз. Аналогично проводили регистрацию термоиндуцированной денатурации белковых микромоменов в суспензии теней эритроцитов. Мелафен и феноксан добавляли к теням, ИХФАН-10 добавляли в процессе получения препарата теней из эритроцитов.

Анализ термограмм проводили с помощью программного пакета MicroCal Origin 5 («Microcal Software», Northampton, MA). Относительную удельную энтальпию мембран (DHcal) определяли после вычитания базовой линии путем сравнения нормированной на концентрацию мембран площади под термограммой образца (от 10° до 90 °C) с площадью электрической калибровочной метки прибора. Для получения базовой линии обе ячейки (измерительную и сравнительную) заполняли раствором, в котором в дальнейшем проводили измерение мембран, и проводили запись. Относительную интенсивность перехода определяли как величину удельной теплоемкости ( $DCr_{max}$ ) в максимуме пика теплопоглощения при соответствующей температуре максимума ( $T_{max}$ ). Относительную молярную энтальпию фазовых переходов многослойных везикул из ДМФХ и теней эритроцитов (DH), интенсивность переходов ( $DCr_{max}$ ), температуру максимумов ( $T_{max}$ ) и полуширины ( $DT_{1/2}$ ) переходов определяли, по методу Акоева В.Р. [14].

*Рентгеновское дифракционное исследование* липосом проводили на автоматизированном рентгеновском малоугловом дифрактометре с линейным координатным детектором, изготовленном на основе конструкции малоуглового рентгеновского дифрактометра АМУР-К (Институт кристаллографии РАН) [23]. Дифрактограммы регистрировали при комнатной температуре (21-22°C). Дисперсию липосом помещали в тонкостенный стеклянный капилляр. Источником рентгеновского излучения служила трубка БСВ29Cu с Ni-фильтром. Рентгеновский пучок фокусировался стеклянным зеркалом по схеме

Франкса и коллимировался при помощи щелей. Для учета вклада фонового рассеяния измеряли рассеяние капилляром с буфером без липосом. Для капилляра с дисперсией липосом и для капилляра с буфером были измерены коэффициенты поглощения рентгеновского излучения. Эти коэффициенты в пределах точности эксперимента имели одинаковые значения. Для определения «чистого» рассеяния липосомами из экспериментальных интенсивностей рассеяния капилляром с дисперсией липосом вычитали интенсивность рассеяния капилляром с буфером. Затем вводили коллимационную поправку на высоту рентгеновского пучка и ширину приемного окна детектора. Дифрактограммы представляли в виде функций от модуля дифракционного вектора  $S = (2\sin\theta)/\lambda$ , где  $\lambda$  – длина волны рентгеновского излучения (0,154 нм для  $\text{CuK}\alpha$ ),  $\theta$  – половина угла рассеяния. Период повторяемости мембран в липосомах  $D$  определяли по формуле Вульфа-Брэгга  $D = \lambda/(2\sin\theta_{max})$ , где  $\theta_{max}$  – половина угла рассеяния, соответствующего положению первого дифракционного максимума.

Профиль электронной плотности мембран  $\rho(x)$  в направлении перпендикулярном плоскости мембран рассчитывали преобразованием Фурье по интегральным интенсивностям дифракционных максимумов на дифрактограммах липосом (после введения коллимационной поправки) по формуле:

$$(1) \quad \rho(x) = \sum_{h=1}^N S(h)h\sqrt{I(h)} \cos\left(\frac{2\pi kh}{D}\right),$$

где  $h$  – номер дифракционного максимума,  $S(h)$  и  $I(h)$  – фазовый знак (+ или –) и интегральная интенсивность дифракционного максимума с номером  $h$ ,  $N$  – число дифракционных максимумов. Множитель  $h$  в формуле (1) является поправкой в интенсивность дифракционных максимумов, связанной с разориентацией мембран в дисперсии липосом (фактор Лоренца) [10]. Дифрактограммы каждого образца водной суспензии многослойных везикул, сформированных из яичного лецитина с добавлением БАВ, регистрировали не менее трех раз.

**Результаты и обсуждение.** На основании перечисленных во введении предпосылок были выполнены исследования воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на модельные биообъекты животного происхождения. Экспериментальные объекты можно расположить в ряд по степени усложнения структуры: мультиламеллярные фосфолипидные липосомы, сформированные из индивидуального синтетического фосфолипида – димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ); мультиламеллярные фосфолипидные липосомы, сформированные из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина; тени эритро-

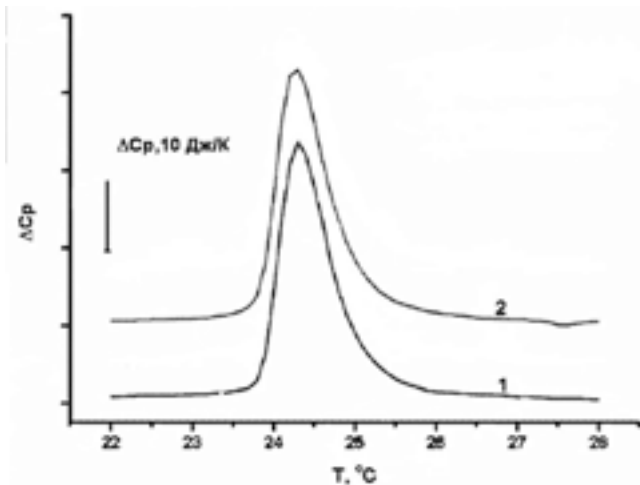
цитов; эритроциты. Для выяснения границ концентрационных диапазонов для БАВ, в которых применение не вызывает разрушения структуры экспериментальные объекты, тестирование проводили используя широкий концентрационный диапазон этих экзогенных веществ.

*Исследование воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на мембраны с использованием первой модели – мультиламеллярных липосом, сформированных из ДМФХ.* Изменение термоиндуцированных параметров фосфолипидных мультиламеллярных липосом при действии БАВ отражается на термограммах плавления ДМФХ. В зависимости от концентрации применяемого вещества может выявляться сдвиг по температуре максимума основного эндотермического фазового перехода, изменяться амплитуда пика и происходить его уширение или сужение.

При регистрации ДСК термограмм плавления ДМФХ в присутствии мелафена в большой концентрации  $10^{-5}$  М было обнаружено, что пик основного эндотермического фазового перехода остается единственным, по сравнению с контрольной термограммой добавочных пиков не появляется (рис. 2). Это указывает на то, что все бислои в многослойной липосоме претерпели изменения, и мелафен проник ко всем слоям мультиламеллярных липосом. Однако параметры термоиндуцированных основных переходов практически не различаются. Возможно, что мелафен в использованной концентрации не оказал влияния на микродоменную организацию бислоев ДМФХ.

Для выявления вероятного воздействия мелафена на структуру ДМФХ фосфолипидных мембран в мультиламеллярных липосом была применена модификация ДСК метода. Помимо стандартного измерения в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин были проведены измерения при разных скоростях плавления. При этом скорости прогрева ячеек с контрольным и опытными образцами составляли 0,125 град/мин; 0,25 град/мин; 0,5 град/мин; 1 град/мин. Таким образом, устойчивую структуру бислоев можно вывести из состояния равновесия. Снижение скорости подачи тепла к ячейкам с контрольным и опытным образцами значительно меняет параметры основного термоиндуцированного фазового перехода ДМФХ. По-видимому, релаксационные процессы в этом случае происходят по-разному. Действительно, и в контрольных образцах суспензией ДМФХ в буферном растворе в отсутствие БАВ были отмечены изменения. При уменьшении скорости подачи тепла к ячейкам значительно снижается энтальпия, незначительно – температура фазового перехода, кооперативность незначительно увеличивается.

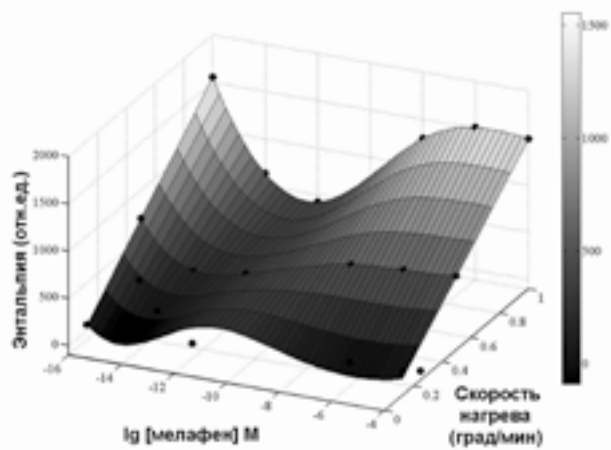
Изменив параметры плавления, мы выявили, что поверхностное воздействие мелафена меняет



**Рис. 2.** Влияние мелафена на структуру фосфолипидных мембран в мультиламеллярных липосомах. Термограммы плавления ДМФХ мультиламеллярных липосом. Основной термоиндуцированный эндотермический фазовый переход. Обозначения: 1 – контроль, 2 –  $10^{-5}$  М. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин.

термоиндуцированные параметры бислоев ДМФХ. В этом случае измерения провели, применяя разведения мелафена в широком диапазоне концентраций от  $10^{-4}$  М до  $10^{-16}$  М. Отметим, что при добавлении к ДМФХ – липосомам раствора мелафена во всем диапазоне концентраций во всех зарегистрированных термограммах выявлялся единственный пик основного термоиндуцированного перехода. Таким образом, можно считать, что мелафен проник ко всем бислоям в мультислойной липосоме и поверхностно промодифицировал бислои. Эти данные представлены на результирующем графике зависимости энтальпии основного термоиндуцированного перехода ДМФХ от концентрации добавленного раствора мелафена и скоростей прогрева экспериментальных ячеек ДАСМ-4 (рис. 3). Помимо энтальпии таким же изменениям подверглась кооперативность основного фазового перехода. Произошли сдвиги максимума температуры основного фазового перехода. На графиках зависимостей термодинамических параметров плавления ДМФХ от концентрации мелафена при всех исследованных скоростях плавления наблюдались экстремумы в области концентраций мелафена  $10^{-14}$  –  $10^{-8}$  М. В настоящей работе исследования проводились на моделях, имитирующих мембраны животного происхождения, как раз эти концентрации являются действующими для стимуляции развития и роста растительных организмов [24].

Так же для исследования влияния на структуру фосфолипидных микродоменов в мультиламеллярных липосомах применили другое экзогенное синтетическое вещество – феноксан. Это



**Рис. 3.** Влияние мелафена на структуру фосфолипидных микродоменов в мультиламеллярных липосомах. Энтальпия индуцированного основного перехода ДМФХ при разных скоростях прогрева ячеек с образцами. При модификации ДСК метода скорости прогрева 0,125 град/мин; 0,25 град/мин; 0,5 град/мин; 1 град/мин.

гидрофильное производное антиоксиданта фенозана – калиевая соль фенозан-кислоты. В работах Кривандина А.В. и соавторов [23] методом МУРР было показано, что большие (процентные) концентрации фенозана и феноксана разрушают регулярную структуру липидной мембраны: изменяется ширина бислоя и нарушается порядок упаковки бислоев в мультиламеллярных липосомах, сформированных из природных липидов.

В настоящей работе методом ДСК протестировали воздействие водных растворов в широком диапазоне концентраций феноксана на структуру мембраны, сформированной из ДМФХ. Это другой организационный уровень – влияние на микродомены в бислоях. Как и в случае с мелафеном, также выявляется только единственный эндотермический пик основного фазового перехода, что указывает на то, что на все бислои, входящие в состав многослойной мультиламеллярной липосомы, действует феноксан. Было обнаружено, что высокие концентрации феноксана, в отличие от мелафена, деструктурируют бислои, нарушая его микродоменную структуру. На это указывает исчезновение пика основного эндотермического фазового перехода. При добавлении водного раствора феноксана в концентрации  $10^{-4}$  М пик основного эндотермического перехода ДМФХ значительно уменьшается. При более высокой концентрации мелафена пик не выявляется, и энтальпия не высчитывается, что отражено в таблице 1.

Соответственно можно говорить о том, что если фенозан-кислота значительно разрушает структуру фосфолипидных мембран, то ее гидрофиль-

Таблица 1

**Влияние феноксана на термоиндуцированные параметры мембран в фосфолипидных мультисамеллярных липосомах, сформированных из ДМФХ. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогресса 1 град/мин.**

Концентрация феноксана (М)	Энтальпия ДМФХ (отн. ед.)	Температура максимума перехода ДМФХ (оС)	Кооперативность (отн.ед.) Н ½ ДМФХ
В 10-3	0	0	0
10-4	67,4	24,3	0,7
10-5	417,9	24,3	0,8
10-6	420,9	24,3	1
10-7	184,3	24,3	0,8
10-8	273,2	24,3	0,8
10-9	465,8	24,3	1
10-10	431,2	24,3	1
10-11	411,2	24,3	0,7
10-12	410,8	24,3	0,7
10-13	434,4	24,3	0,8
10-14	436,6	24,3	0,8

ное производное феноксан деструктивно влияет только в больших концентрациях – более  $10^{-4}$  М.

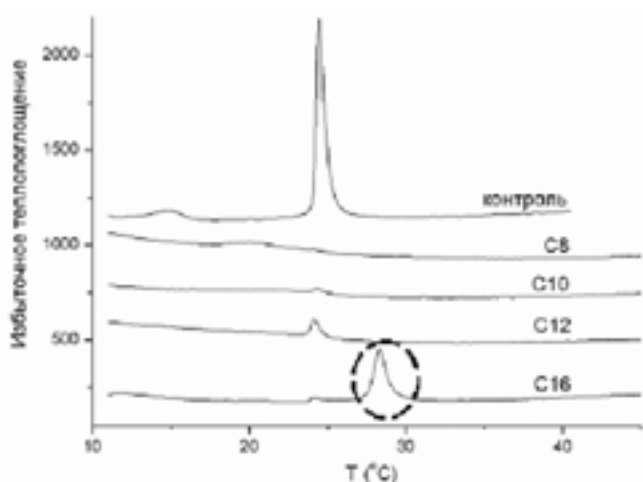
Разрушение микродоменной структуры мембраны, сформированной из ДМФХ, происходит и при тестировании воздействий других производных феноксана – гибридных антиоксидантов ИХФАНов. Это сложные молекулы, имеющие полярную часть с зарядом на атоме азота и гидрофобные алкильные остатки, разной длины. Соответственно, заряженная часть молекул располагается в гидратной оболочке, находящейся вокруг липосом, а гидрофобные остатки внедряются в бислои и располагаются среди жирнокислотных хвостов фосфолипидов. В настоящей работе применяли эмульсию ИХФАНов в среде этанол – вода. Использовали также поэтапное разведение для получения меньших концентраций. Полученные данные представлены на рисунке 4. При концентрации феноксана  $10^{-3}$  М и ИХФАНов в концентрации  $10^{-5}$  М термоиндуцированный переход ДМФХ не выявляется, по-видимому, периодическая структура мембраны липосом значительно нарушается, что согласуется с литературными данными, полученными для больших концентраций феноксана и феноксана [23]. Видно, что ИХФАНы в концентрации  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  М значительно деструктурируют ДМФХ – бислои, пик основного фазового перехода практически исчезает по сравнению с контролем. ИХФАН с самым длин-

ным алкильным остатком формирует собственный пик перехода в бислои. Можно сделать вывод, что гибридные антиоксиданты группы ИХФАНов могут применяться только в малых концентрациях.

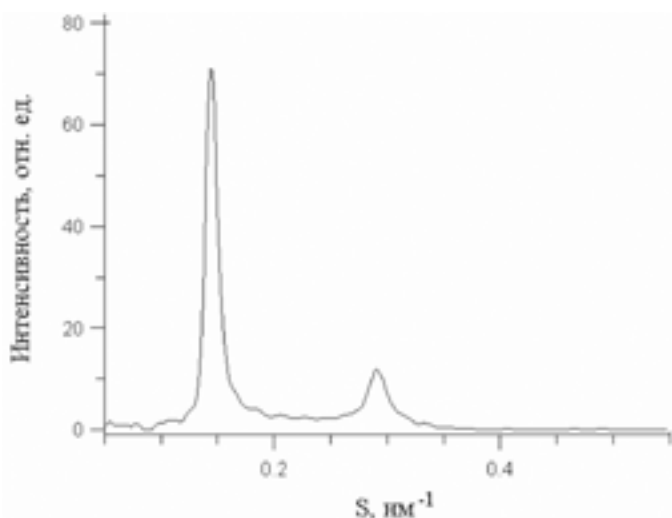
Это согласуется и с данными Кривандина А.В. с соавторами [25], полученными по методу МУРР, из которых следует, что ИХФАН-10 значительно меняет толщины бислоев и порядок их упаковки в мультисамеллярных липосомах, сформированных из природных фосфолипидов.

*Исследование воздействия БАВ – меланфина, на мембраны с использованием второй модели – мультисамеллярных липосом, сформированных из яичного лецитина.* Это более сложный экспериментальный объект и в большей степени приближенный к строению и составу к природным био мембранам. Благодаря стереоспецифическим особенностям природных фосфолипидов бислои в таких мультисамеллярных липосомах имеют мозаичную устойчивую упаковку. Выстраивание бислоя происходит соответственно зарядам молекул, размерам их гидрофильных головок, насыщенности и длине жирнокислотных остатков, а также форме молекул (цилиндрическая, трапециевидная). Поэтому такие бислои оказываются более устойчивыми к воздействию БАВ.





**Рис. 4.** Термограммы плавления ДМФХ мультламеллярных липосом в присутствии гидрофобных БАВ - ИХФАНов с разной длиной гидрофобной части молекул от С8 до С12. ИХФАН-16 формирует собственную фазу доменов в бислое при концентрациях  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  М (отмечено овалом). Большие концентрации С10 и С12 максимально меняют бислои, С8 и С16 влияют меньше. Оптимальная длина проникающих в бислой алкильных остатков С10, С12. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин.



**Рис. 5.** Малоугловая дифрактограмма дисперсии липосом, сформированных из яичного лецитина, после введения коллимационной поправки.

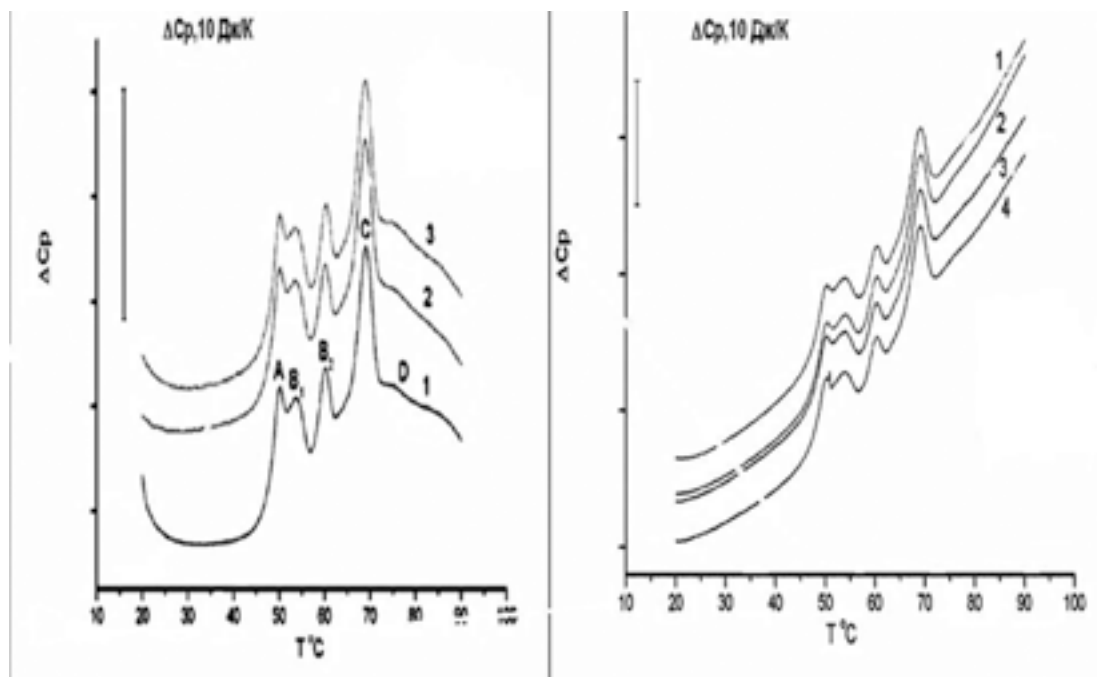
В настоящей работе с применением метода МУРР было выяснено, что на структурные характеристики: толщины бислоев и упорядоченность их упаковки мультламеллярных липосомах, мелафен в широком концентрационном диапазоне ( $10^{-18}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-6}$  М) не влияет. Дифрактограмма исследованных дисперсий липосом приведена на рисунке 5. На дифрактограммах всех исследованных суспензий липосом наблюдаются два дифракционных пика с максимумами при  $S \approx 0.14 \text{ нм}^{-1}$  и  $S \approx 0.29 \text{ нм}^{-1}$ , которые являются первым и вторым

порядками отражения от упорядоченных мультислоев липидных мембран в мультламеллярных липосомах.

Дифрактограммы всех исследованных дисперсий липосом с добавлением растворов мелафена в широком диапазоне концентраций – от ультра малых до больших, абсолютно одинаковы. Дифрактограммы всех исследованных дисперсий липосом с БАВ и контрольных совпадают. Следовательно, структура мембран в этих липосомах одинаковая. Период повторяемости мембран в липосомах  $D$  составляла 6.9 нм. При расчете по формуле (1) профиля электронной плотности липидных мембран в липосоме толщина одной мембраны, определенная как расстояние между пиками электронной плотности, соответствующими положению полярных групп липидов, составляет около 4 нм. Результаты проведенного рентгеновского дифракционного анализа показывают, что мелафен в широком диапазоне концентраций не изменяет организацию бислоев в фосфолипидных мультламеллярных липосомах.

Как уже ранее указывалось, исследования методом МУРР влияния производных фенозана на организацию фосфолипидных мультламеллярных липосом были проведены в работах Кривандина А.В. и соавторов [23, 25]. Фенозан, феноксан и ИХФАН-10, примененные в больших концентрациях, при встраивании в липосомы значительно изменяли структуру бислоев и упаковку в мультламеллярных липосомах.

Исследование воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на мембраны с использованием третьей модели – тени эритроцитов. Методом ДСК тестировали влияние БАВ на структуру тени эритроцитов. Тени эритроцитов это белок-липидная модель строения плазматической мембраны и цитоскелета большинства клеток животного организма. Известно, что белки плазматической мембраны и цитоскелета эритроцитов тесно взаимодействуют друг с другом и образуют мембранные домены, денатурация которых формирует структурные тепловые переходы [13,14]. Это 5 идентифицированных структурных денатурационных переходов (А-, В1-, В2-, С- и D- переходы). А-пик соответствует денатурации белков цитоскелета – спектрина и актина, которые обеспечивают способность эритроцитов к деформации, что является важнейшей характеристикой. В1-пик соответствует денатурации белков цитоскелета – анкирина и демантина и белков электрофоретических полос 4,1 и 4,2, которые являются мембранными фрагментами ионных каналов. В2-пик соответствует денатурации белков электрофоретической полосы 3, которые являются цитоплазматическими фрагментами ионных каналов. С-пик соответствует денатурации 55 кДа белка в электрофоретической полосе 3, этот



**Рис. 6.** Влияние мелафена на структуру белковых микродоменов при старении мембран теней эритроцитов. Слева термограммы денатурационных переходов в первый день после получения теней, справа во второй день. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин. Обозначения: 1-й день – 1- контроль; 2-  $10^{-5}$  М мелафен; 3-  $10^{-3}$  М мелафен. 2-й день – 1- контроль; 2-  $10^{-8}$  М мелафен; 3-  $10^{-6}$  М мелафен; 4-  $10^{-4}$  М мелафен. А,  $B_1$ ,  $B_2$ , С, D – пики термоденатурационных переходов белковых микродоменов теней эритроцитов.

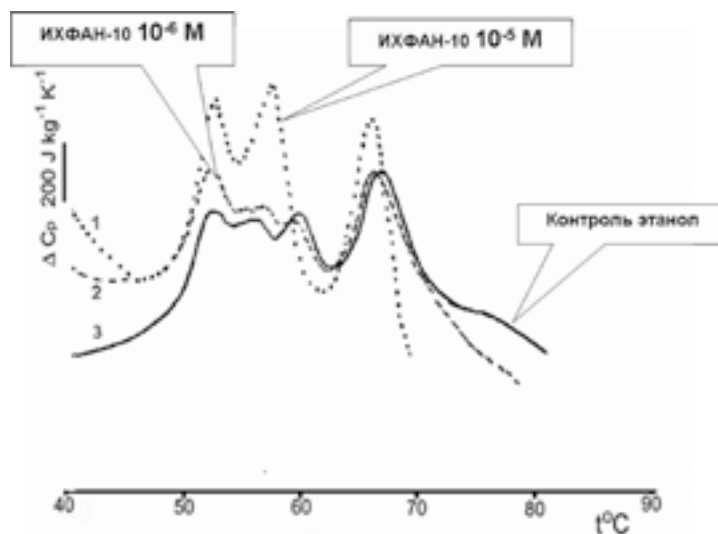
белок является мембранным фрагментом ионных каналов. D-пик соответствует денатурации не идентифицированных белков, приводящей к разрушению мембраны.

Для исследования воздействия мелафена на тени эритроцитов, учитывая устойчивость предыдущих моделей к воздействию этого БАВ в широком диапазоне концентраций, тени подвергли состариванию. Известно, что при хранении белок-липидных везикул происходит разрыхление структуры, она становится менее упорядоченной и более уязвимой для воздействий. Тени эритроцитов подвергались термоиндуцированной денатурации сразу после их получения и на второй день, т.е. состаренные. Кривые термоиндуцированной денатурации – термограммы теней в присутствии разных концентраций мелафена ( $10^{-8}$  М –  $10^{-3}$  М) представлены на рисунке 6.

Данные, полученные при денатурации теней эритроцитов, указывают на устойчивость всех белковых компонентов плазматической мембраны и цитоскелета эритроцитов к воздействию больших и малых концентраций мелафена. Если гидрофильный мелафен не влиял на структуру белковых микродоменов теней, то производные фенозана вызывали перегруппировку белковых микродоменов. Доза-зависимо менялась их устойчивость к термоденатурации. На рисунке 7 представлены термограммы теней эритроцитов в первый день после получения. Видно, что кон-

трольная термограмма проявляет все 5 термоденатурационных пика. Добавление во время процедуры получения теней из эритроцитов ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-5}$  М вызывает слияние пиков  $B_1$  и  $B_2$ , изменение температур максимумов переходов по сравнению с контролем. Но в присутствии ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-6}$  М вид термограммы возвращается к контрольному. По-видимому, происходит встраивание ИХФАН-10, нарушающее распределение белковых микродоменов при больших концентрациях БАВ, и стабилизирующее – при меньших концентрациях.

Обнаружено, что ИХФАН-10, в меньших по сравнению с феноксаном (данные не указаны на рисунках) концентрациях, деструктурирует мембранные белки. Однако белковые домены оказываются более устойчивыми к действию производных фенозана, чем чисто липидные. ИХФАН-10 и феноксан смещают А-переход в область более высоких температур,  $B_2$ , С и D-переходы смещаются в область более низких температур. На термограммах видно, что цитоскелетные белки теней эритроцитов: 5 структурных переходов на термограммах, не меняют своей формы при действии феноксана в концентрации  $10^{-5}$  М и ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-6}$  М. Феноксан в концентрации  $10^{-5}$  М также не менял форму термограмм. Но ИХФАН в концентрации  $10^{-5}$  М вызывает слияние  $B_1$  и  $B_2$  переходов) и происходит смещение температуры максимумов переходов.



**Рис. 7.** Влияние ИХФАН-10 на структуру белковых микродоменов мембран теней эритроцитов. Обозначения термограмм денатурационных переходов: 1 - с добавлением  $10^{-5}$  М ИХФАН-10; 2 - с добавлением  $10^{-6}$  М ИХФАН-10; 3 - контрольный образец с добавлением фосфатного буфера с этанолом. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин.

Сдвиги максимальных значений термоиндуцированных переходов свидетельствуют о перестройках в организации белковых доменов в присутствии феноксана и ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-5}$  М. При воздействии феноксана и ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-6}$  М домены сохраняются, но меняются их термодинамические параметры.

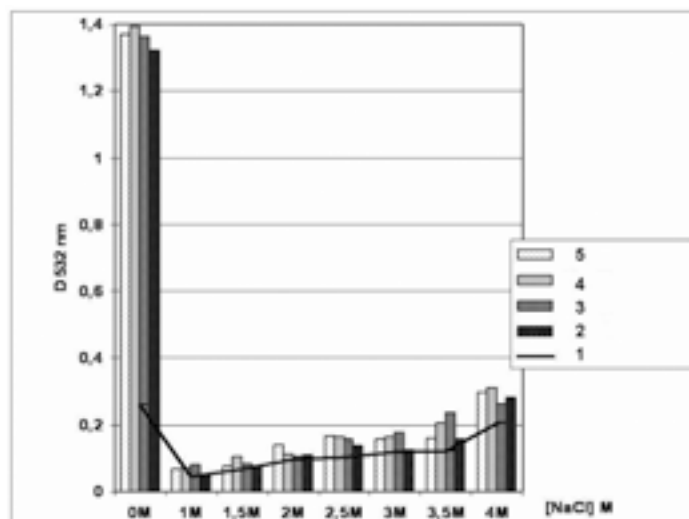
Полученные данные коррелируют с исследованиями, проведенными для феноксана, феноксана и ИХФАН-10 Кривандиным А.В. с соавторами [23, 25], в которых методом МУРР были показаны значительные деформирующие воздействия на организацию мембран в мультиламеллярных липосомах. Фаткуллина Л.Д. с соавторами [26] показала, что малые концентрации ИХФАН-10 стабилизируют бислои, встраиваясь между жирнокислотными остатками фосфолипидной фазы, а также тормозят процессы перекисного окисления.

*Исследование воздействия БАВ – мелафена, на мембраны с использованием четвертой модели – изолированных из кровяного русла эритроцитов.* Помимо тестирования воздействия на мембраны липидные, белок-липидные необходимо было также провести и наблюдение за поведением целых клеток в присутствии изучаемого БАВ. Ранее уже было показано влияние феноксана и его производных на морфологию и структурные свойства клеток – эритроцитов [15, 26]. В настоящей работе с учетом того, что наряду с воздействием экзогенного вещества может меняться и окружающая среда, рассмотрели сочетание воздействия мелафена и физико-химического изменения экспериментальной среды. При изменении ионной силы среды, в которую помещались эритроциты и добавлялись растворы мела-

фена в широком диапазоне концентраций, была проведена спектрофотометрическая регистрация освобождения гемоглобина из эритроцитов. Известно, что изменение ионной силы среды посредством добавления растворов NaCl значительно меняет проницаемость [27] эритроцитов. На рисунке 8 приведен график изменения проницаемости мембран эритроцитов в зависимости от концентрации мелафена и NaCl.

Было обнаружено, что мелафен в концентрациях  $10^{-3}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-7}$  М,  $10^{-9}$  М значительно увеличивает проницаемость эритроцитов для гемоглобина, что вызывает добавочное повреждение мембран по сравнению с контролем в присутствии разных значений ионной силы экспериментальной среды. Таким образом, было показано, что в целых клетках – эритроцитах мелафен вызывает дополнительную проницаемость мембран в условиях осмотического стресса. Поэтому не может применяться, как протектор для защиты целостности клеточной мембраны.

В итоге проведенных исследований выяснили, что в зависимости от степени усложнения экспериментального объекта менялся и вид воздействия мелафена и производных феноксана. Биологически активные вещества изменяли структуру синтетических мультиламеллярных липосом. Липосомы из смеси природных фосфолипидов проявили большую устойчивость структуры к воздействию биологически активных веществ. Далее исследования воздействия веществ проводились на экспериментальных моделях с более высокими уровнями организации структуры: тени эритроцитов, и целые клетки – эритроциты, Эффекты веществ на строение более сложные объектов но-



**Рис. 8.** Влияние мелафена на гипо- и гиперосмотический гемолиз эритроцитов. Обозначения: 1 - контроль; 2 -  $10^{-3}$  М мелафен; 3 -  $10^{-5}$  М мелафен; 4 -  $10^{-7}$  М мелафен; 5 -  $10^{-9}$  М мелафен.

силы не просто структурное воздействие, но влияли и на функционирование органелл и клеток.

**Заключение.** Было показано, что экзогенные синтетические вещества: мелафен и производные фенозана при применении в определенных концентрациях не разрушают чисто липидные мембраны и белок – липидный цитоскелет тений эритроцитов. В этом случае они могут использоваться, как регуляторы активностей природных объектов при воздействии на уровне липидных и белковых компонентов клеток. Экспериментальные объекты могут представлять интерес и как переносчики веществ. Фосфолипидные мультиламеллярные липосомы насыщаются, как гидрофобными, так и гидрофильными веществами. Температура переходов из жидко-кристаллического состояния в гели-

евое может регулироваться веществами, что важно для формирования гидрофильных нанопор и понимания структуры биомембран при охлаждении и нагревании. Изменения структуры цитоскелета под действием веществ также будет оказывать влияние на функционирование клетки. Проницаемость мембран органелл и клеток, обеспечивающая активацию мембранных компонентов, может быть регулируемой не только эндогенными, но и экзогенными (синтетическими и природными) веществами. Полученные результаты с применением биологически активных веществ позволяют увидеть дальнейшие перспективы в регуляции структуры клеточных объектов и их компонентов, без разрушения, что приведет к возможности регуляции функций.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фатахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис гидроксиметил фосфиновой кислоты (Мелафен), как новый сильный регулятор роста растений. В кн. Материалы 13 интернациональной конференции химии фосфорных соединений. С-Пб. 2008. 80.
2. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно- затрудненные фенолы. М. Химия. 1972.
3. Никифоров, Г.А. Белосточкая И.С., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Горбунов Д.Б. Биоантиоксиданты «поплавокного» типа на основе производных 2,6 дитретбутил-фенола. В сб.: Биоантиоксидант. Научный вестник мед акад.2003; 50-51.
4. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидро-кверцетина) с мультиламеллярными липосомами из димиритоилфосфатидилхолина. Биофизика. 2008; 53:78-
5. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. Липидные мембраны при фазовых превращениях. М: Наука. 19
6. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. М.: Издательство ЛКИ. 2011.
7. Харкоз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах. Успехи Биологических Наук. 20264-3
8. Филиппов А.В., Рудакова М.А., Гиматдинов Р.С., Семина И.Г. Диффузия липидов в биологических мембранах. Учебное пособие для студентов третьего и четвертого курсов специализации. Медицинская физика физического факультета. Казань 20
9. Lindblom G., Oradd G., Filippov A. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation. Chem Phys Lipids. 2006; 141: 179-184.
10. Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М. Изд. Наука. 19
11. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 1963; 100: 199-130.
12. Sato Y, Yamakose H, Suzuki Ya. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. Biol. Pharm. Bull. 1993; 16: 506-512.
13. Акоев В.Р., Щербинина, С.П. Матвеев А.В., Тараховский Ю.С., Деев А.А., Шныров В.Л. Исследование структурных переходов в мембранах эритроцитов при наследственном гемохроматозе. Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. 1997; 123: 279-2
14. Акоев В.Р., Матвеев А.В., Беляева Т.В., Ким Ю.А. The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. Biochim Biophys Acta. 1998; 1371: 284-2
15. Гендель Л.Я., Ким Л.В., Лунёва О.Г., Федин В.А., Крулякова К.Е. Изменения поверхностной архитектоники эритроцитов под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана-Известия РАН. Серия Биология. 1996; 4: 508-5
16. Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Трещенкова Ю.А. Действие малых доз фенозана на биохимические свойства лактатдегидрогеназы и микровязкость мембран микросом мозга мышей. Радиационная биология. Радиозонология. 2003; 3: 320-3
17. Ким Ю.А., Елемесов Р.Е., Акоев В.Р. Гиперосмотический гемолиз эритроцитов и антигемолитическая активность фракции сапонинов и тритерпеновых гликозидов из *Panax Ginseng* C.A.Meyer. Биологические мембраны. 2000; 17: 15-
18. Прокопов А.А., Шуйкиль Л.В., Берлянд А.С. Изучение метаболизма фенозан-кислоты в организме кроликов. Химико-фармацевтический журнал. 2006; 40: 3-
19. Бурлакова Е.Б. Эффект сверхмалых доз. Вестник российской Академии наук. 1994; 64: 425 - 431.
20. McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhane R.N. Differential scanning calorimetry study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. Biochemistry. 1993; 32: 516-552.
21. Jager F.C. Determination of vitamin E

requirement in rats by means of spontaneous haemolysis in vitro. *Nutr. et Diets.* 1968; 10: 215–223.

22. Privalov P.L., Plotnikov V.V. Three generations of scanning microcalorimeters for liquids. *Therm. Acta.* 1989; 139: 257–277.

23. Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б., Кривандин А.В., Погорельская И.Л. Влияние феносана на структуру фосфолипидных

мембран. *Нейрохимия.* 1996; 13:128–1

24. Фаттахов С.Г. Мелафен – перспективный препарат для сельского хозяйства, биотехнологий и экобиотехнологии. В кн.: Мелафен: механизм действия и области применения. ред. Фаттахова С.Г., Кузнецова В.В., Загоскиной Н.В. Казань: Печать – Сервис XXI век; 2014: 9–25. Кривандин А.В. Фаткуллина Л.Д.

Исследование встраивания антиоксиданта ИХФАН в липосомы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Химическая физика.* 2013; 32: 91–

26. Fatkullina L.D., Vekshina O.M. (Aleksieva O.M.), Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Kim Yu.A. Stabilization of cell membranes by hybrid antioxidants in therapy of neurodegenerative diseases. In book "In Biotechnology: State of

the Art and Prospects for Development" Ed. by P.E. Stott and G.E. Zaikov. New York. Nova Science Publishers; 2008: Chapter 115–123. 27. Kim Yu.A., Elemensov P.E., Akoev V.P. Гиперосмотический гемолиз эритроцитов и антигемолитическая активность фракции сапонинов и тритерпеновых гликозидов из *Panax Ginseng* C.A.Meyer. *Биологические мембраны.* 2000; 17: 15–

## REFERENCES:

1. Fattakhov S.G., Reznik V.S., Konovalov A.I. Melamine Salt of Bis (hydroxymethyl) Phosphinic Acid (Melaphene) as a New Generation Regulator of Plant Growth Regulator. Proceedings of the 13th International Conference on Chemistry of Phosphorus Compounds. St. Petersburg, 202 (in Russian).

2. Ershov V.V., Nikiforov G.A., Volodkin A.A. Spatially hampered phenols. *M. Khimia.* 19(in Russian).

3. Nikiforov G.A., Belostotskaya I.S., Vol'eva V.B., Komissarova N.L., Gorbunov D.B. Bioantioxidants "float types" at base of derivatives 2,6 ditret butyl fenyl. Scientific Bulletin of the Tyumen Academy of Medicine: «Bioantioxidants". 2003; 1: 50–51 (in Russian).

4. Tarachovsky Yu.S., Kusnetsova S.M., Vasilieva N.A., Egorochkin M.A., Kim Yu.A. Relationships of taxifolin (dihydroquercetin) with multilamellar liposomes from dimyristoylphosphatidylcholine. *Biophysics.* 2008; 5: 279–84 (in Russian).

5. Antonov V.F., Smirnova E.Yu., Shevchenko E.V. Lipid membranes under the phase transitions. *M. Nauka.* 19(in Russian).

6. Tarachovsky Yu.S. Intellectual lipid's nana containers at address transport of medical substances. *M. Iki.* 20(in Russian).

7. Charakoz D.P. About the possible physiological role of phase transition "liquid-solid" at biological membranes. 2001; 41: 54–7 (in Russian).

8. Filippov A.V., Rudakova M.A., Gimadtinov

R.S., Semina I.G. Lipids diffusion at biological membranes. Educational material for students of third and fourth courses specialization. Medical physics of physics department. Kazan. 20(in Russian).

9. Lindblom G., Oradd G., Filippov A. Lipid lateral diffusion in bilayers with phosphatidylcholine, sphingomyelin and cholesterol. An NMR study of dynamics and lateral phase separation. *Chem Phys Lipids.* 2006; 141: 179–184.

10. Svergun D.I., Feigin L.A. Rentgen and neutron small angle scattering. *M. Nauka.* 19(in Russian).

11. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1963; 100: 199–130.

12. Sato Y., Yamakose H. Suzuki Ya. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 1993; 16: 506–512.

13. Akoev V.R., Sherbinina S.P., Matveev A.V., Tarachovsky Yu.S., Deev A.A., Shnirov V.L. Investigations of structural transitions at erythrocytes' membrane when hereditary hemochromatosis. *Bulletin Experimental biology and medicine.* 1997; 123: 279–84 (in Russian).

14. Akoev V.R., Matveev A.V., Belyaeva T.V., Kim Y.A. The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1371: 284–294.

15. Gendel L.J., Kim L.V., Luneva O.G., Fedin V.A., Burlakova K.E. Changes of cursory architectonics of erythrocytes under the impact of synthetic antioxidant Fenosan-Reports of Russian Academy of Science. *Series. Biol.* 1996; 4: 508–512 (in Russian).

16. Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Treschenkova U.A. The low doses actions to the biochemical properties of lactatdehydrogenase and microviscosity brain microsomes membranes of mice. *Radiation biology. Radioecology.* 2003; 3: 320–323 (in Russian).

17. Kim Yu.A., Elemensov R.E., Akoev V.R. Hyperosmotic hemolysis of erythrocytes and triterpens glycosides from *Panax Ginseng* C. A. Meyer. *Biological Membrane.* 2000; 17: 15–26 (in Russian).

18. Prokopov A.A., Berland A.C., Shukil L.V. Investigation of Phenosan-acid acid metabolism at rabbit body. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2006; 2: 3–4 (in Russian).

19. Burlakova E.B. Effect of super low doses. *Herald of Russian Academy of science.* 1994; 64: 425–431(in Russian).

20. McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., Mc Elhanev R.N. Differential scanning calorimetry study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry.* 1993; 32: 516–552.

21. Jager F.C. Determination of vitamin E requirement in rats by means of spontaneous haemolysis in vitro. *Nutr. et Diets.* 1968; 10:

215–223.

22. Privalov P.L., Plotnikov V.V. Three generations of scanning microcalorimeters for liquids. *Therm. Acta.* 1989; 139: 257–277. 23. Archipova G.V., Burlakova E.B., Krivandin A.V., Pogoretskaya I.L. Phenosan-acid influence to phospholipid membrane. *Neurochemistry.* 1996; 13: 128–132 (in Russian).

24. Fattakhov S.G. Melaфен- perspective preparation for agricultural, biotechnology and ecobiotechnology. At Book: Melaфен: mechanism of action and regions of using. Eds: Fattakhov S.G., Kuznetsov V.V., Zagoskina N.V., Kazan: Print-Servis-XXI century; 2014: 9–14 (in Russian).

25. Krivandin A.V., Fatkullina L.D. Investigation of antioxidant IHFAN incorporation to liposomes by method small angle Rentgen scattering. *Chemical Physics.* 2013; 32: 91–(in Russian).

26. Fatkullina L.D., Vekshina O.M. (Aleksieva O.M.), Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Kim Yu.A. Stabilization of cell membranes by hybrid antioxidants in therapy of neurodegenerative diseases. In book "In Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development" Ed. by P.E. Stott and G.E. Zaikov. New York. Nova Science Publishers; 2008: Chapter 115–123.

27. Kim Yu. A. Elemensov R. E. Akoev V. R. Hyper osmotic hemolysis of erythrocytes and antihemolytic activity of saponins fraction and triterpens glycosides from *Panax Ginseng* C. A. Meyer. *Biological Membrane.* 2000; 17: 15–26 (in Russian).

O.M. Alekseeva<sup>1</sup>, A.V. Kremetsova<sup>1</sup>, A.V. Krivandin<sup>1</sup>, O.V. Shatalova<sup>1</sup>, Yu.A. Kim<sup>2</sup>

## MODEL BIOMEMBRANES AS TEST OBJECTS FOR THE DETERMINATION OF CONCENTRATION RANGES OF HARMFUL CHEMICAL SUBSTANCES IN BIOLOGICAL MEDIUMS AND OBJECTS OF EXTERNAL ENVIRONMENT

<sup>1</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russian Federation

The paper presents data on changes in model biomembranes (liposomes, erythrocyte shadows, erythrocytes) used as test objects to determine those ranges of concentrations of biologically active substances in which there is no violation of the structure or function of experimental objects. Melaphene, plant growth regulator used in small doses in seed pre-treatment, and antioxidant phenosan derivatives, phenoxane and IHFANs, have been used as biologically active substances. It was shown by DSC that phenosan derivatives at concentrations equal to  $10^{-5}$  M and higher destroy the microdomain organization in the bilayers of phospholipid multilamellar liposomes and reshape protein microdomains in the shadows of red blood cells. Melaphene in small and large concentrations changes polymodal the microdomain organization in the bilayers of phospholipid multilamellar liposomes without destroying the structure and does not affect the protein microdomains in the shadows. An increase in the membrane permeability in isolated intact erythrocytes in the presence of melaphene in large and small concentrations has been revealed by means of spectral analysis. The method of small-angle diffraction scattering showed the absence of the effect of melaphene in a wide range of concentrations on the thickness of phospholipid bilayers and the order of their packaging in multilamellar liposomes.

**Keywords:** phospholipids, multilamellar liposomes, biologically active substances, erythrocyte shadows, erythrocytes, DSC, small-angle diffraction scattering.

Материал поступил в редакцию 23.04.2019 г.