

УДК 577.352.2 : 661.162.6

# МОДЕЛЬНЫЕ БИОМЕМБРАНЫ КАК ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИОННОГО ДИАПАЗОНА ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, НЕ ВЫЗЫВАЮЩЕГО ДЕСТРУКЦИЮ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

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 полимодально изменяет микродоменную организацию в бислоях фосфолипидных мультиламеллярных липосом, не разрушая структуру, и 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.

**Список сокращений:** биологически активные вещества – БАВ; Фенол-Завод-Академия-Наук – фенозан; Институт-Химической-Физики-Академии-Наук – ИХФАН; димиристоилфосфатидилхолин – ДМФХ; дифференциальная сканирующая микрокалориметрия – ДСК; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; электронно-парамагнитный резонанс – ЭПР; атомно силовая

микроскопия – АСМ; динамическое светорассеяние – ДСР; перекисное окисление липидов – ПОЛ.

**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

**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

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

**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»

на клеточном и субклеточном уровне мишеней и механизмов действия БАВ может позволить предупредить негативное влияние. На примере синтетических 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.

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. Мультиламеллярные липосомы формировали с единообразным фосфолипидным составом для того, чтобы исследовать методом ДСК влияние БАВ на структурном уровне микродоменов в бислое. Тестирование влияния БАВ на следующем структурном уровне – организации упаковки бислоев в многослойной липосоме и толщинах этих бислоев, проводили методом МУРР во 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 ретикулума, плазмалеммы).

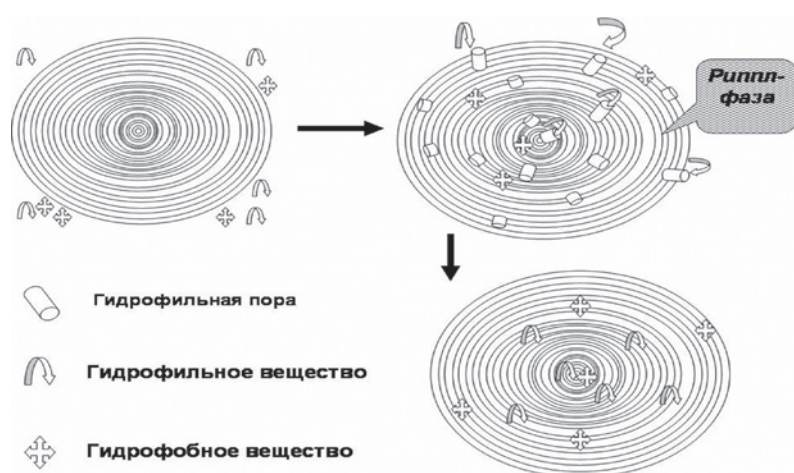
Необходимо отметить, что, так как в исследовании использовались БАВ разной природы: гидрофобные ИХФАНы и гидрофильные феноксан и мелафен, то мы обосновали насыщение всей структуры мультиламеллярной липосомы этими веществами, основываясь на работах Антонова В.Ф. с соавторами [5], в которых было показано 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 бислой [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 теплоемкость 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 ока-



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

зывать 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-твёрдое» в биологических мембранах. По-видимому, сдвиг температуры тела животного при гибернации или обычном сне вызывает перестройки микродоменов в бислоевных 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-твёрдое». 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 активиро-

ваны. При твердом состоянии мембранные 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 мультимеллярных фосфолипидных липосомах отслеживают влияние БАВ разной природы на организацию и перестройки микродоменов.

Для тестирования методом МУРР следующего организационного уровня экспериментальных объектов были использованы липосомы, содержащие смесь фосфолипидов. В состав мультимеллярных липосом, сформированных из яичного лецитина, входят природные фосфолипиды:

фосфодитилхолин, фосфатидилэтанолламин 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 бислои, 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 реального 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 проявля-

ют 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, полученные 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 указанных биологически активных веществ без деструкции биологических объектов.

**Материалы и исследования.** ДМФХ – димристорилфосфатидилхолин, 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 фенозана –  $\beta$ -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота, синтезирована в ИХФ РАН им. Н.Н. Семенова; ИХФАНы – сложноэ-

фирные производные (метилокса) (3,5 ди-трет-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 10 мМ фосфатный буфер рН 7,4 и 60 мин нагревали на водяной бане при температуре выше фазового перехода (45-50° С), и 30 мин при комнатной температуре гидратировали на шейкере. По данным электронной микроскопии полученные липосомы имеют мультиламеллярную структуру и достигают размеров до 2000 Å [4].

*Приготовление водных растворов и суспензий биологически активных веществ.* Водные растворы БАВ: мелафена или феноксана, в широком диапазоне концентраций ( $10^{-17}$ - $10^{-2}$  М) готовили методом последовательных разбавлений с интенсивным перемешиванием с помощью вортекса. Суспензии ИХФАНов приготовили 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 микрокалориметре ДАСМ-4 (Специальное Конструкторское Бюро АН СССР, г. Пушино). 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 микродоменов 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°С) 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 (DCrmax) в максимуме пика теплопоглощения при соответствующей температуре максимума (Tmax). Относительную молярную энтальпию фазовых переходов многослойных везикул из ДМФХ и теней эритроцитов (DH), интенсивность переходов (DCrmax), температуру максимумов (Tmax) и полуширины (DT1/2) 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°С). 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 ка-

пилляра 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

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

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.

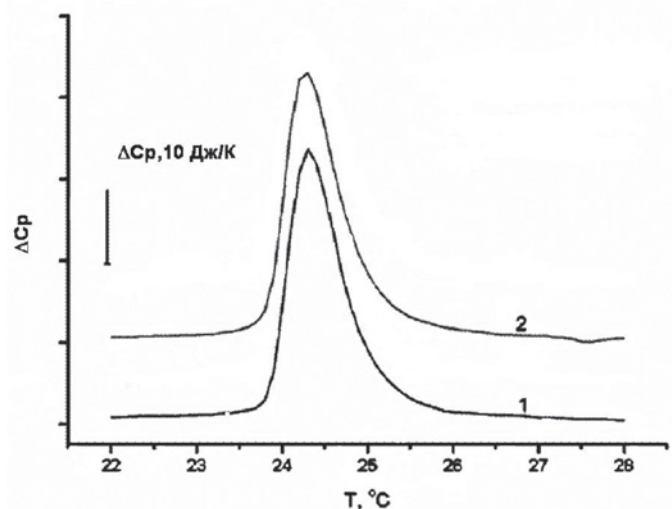
**Результаты и обсуждение.** На основании перечисленных во введении предпосылок были выполнены исследования воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на модельные биообъекты животного происхождения. Экспериментальные объекты можно расположить в ряд по степени усложнения структуры: мультиламеллярные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

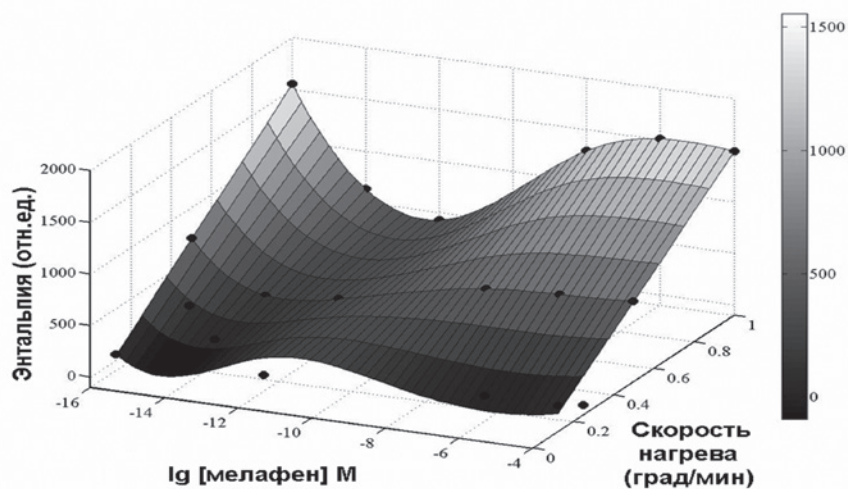
*Исследование воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на мембраны с использованием первой модели – мультиламеллярных липосом, сформированных из ДМФХ.* Изменение термоиндуцированных параметров фосфолипидных мультиламеллярных липосом при действии БАВ отражается на термограммах плавления ДМФХ. 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



**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.



**Рис. 3.** Влияние мелафена на структуру фосфолипидных микродоменов в мультислойных 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.

мембран в мультислойных липосомах 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 суспензий 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 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 мультис-

лойной 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 мультислойных липосомах применили другое экзогенное синтетическое вещество – феноксан. Это 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 мультислойных 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 гидрофильное 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 фенозана – 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 бислой 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 фенозана 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 длинным алкильным остатком формирует собственный пик перехода в бислое. Можно сделать вывод, что гибридные антиоксиданты группы ИХФАНов могут применяться только в малых концентрациях.

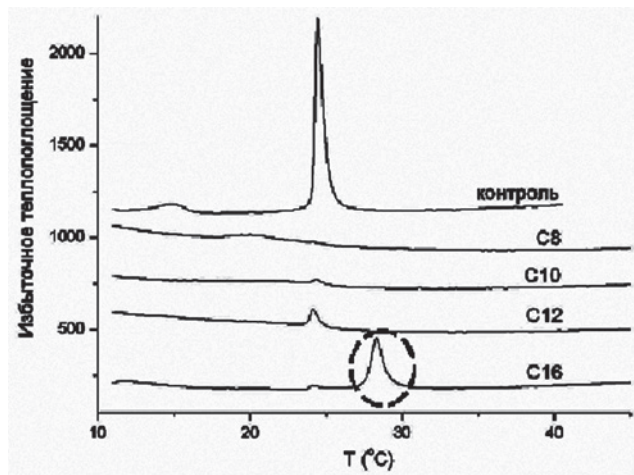
Это согласуется и с данными Кривандина А.В. с соавторами [25], полученными по методу МУРР, из которых следует, что ИХФАН-10 значительно меняет толщины бислоев и порядок их упаковки

Таблица 1

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

Концентрация феноксана (М)	Энтальпия ДМФХ (отн. ед.)	Температура максимума перехода ДМФХ (°С)	Кооперативность (отн. ед.) $n \frac{1}{2}$ ДМФХ
$10^{-3}$	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





**Рис. 4.** Термограммы плавления ДМФХ мультиламеллярных липосом в присутствии гидрофобных БАВ – ИХФАНов с разной длиной гидрофобной части молекул от C8 до C12. ИХФАН-16 формирует собственную фазу доменов в бислое при концентрациях  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  М (отмечено овалом). Большие концентрации C10 и C12 максимально меняют бислоем, C8 и C16 влияют меньше. Оптимальная длина проникающих в бислой алкильных остатков C10, C12. Все измерения проведены в фосфатном буфере при скорости прогрева 1 град/мин.

в мультиламеллярных липосомах, сформированных из природных фосфолипидов.

Исследование воздействия БАВ – мелафена, на мембраны с использованием второй модели – мультиламеллярных 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 бислоем в таких мультиламеллярных 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, трапецевидная). Поэтому такие бислои оказываются более устойчивыми к воздействию БАВ.

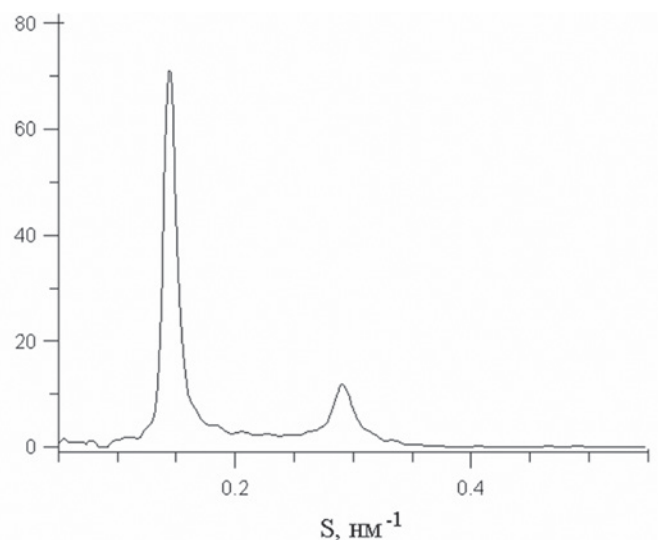
В настоящей работе с применением метода МУРР было выяснено, что на структурные характеристики: толщины бислоев и упорядоченность их упаковки мультиламеллярных липосомах, мелафен в широком концентрационном диапазоне ( $10^{-18}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-6}$  М) не влияет. Дифрактограмма исследованных дисперсий 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 пер-

вым и вторым порядками отражения от упорядоченных мультислоев липидных мембран в мультиламеллярных липосомах.

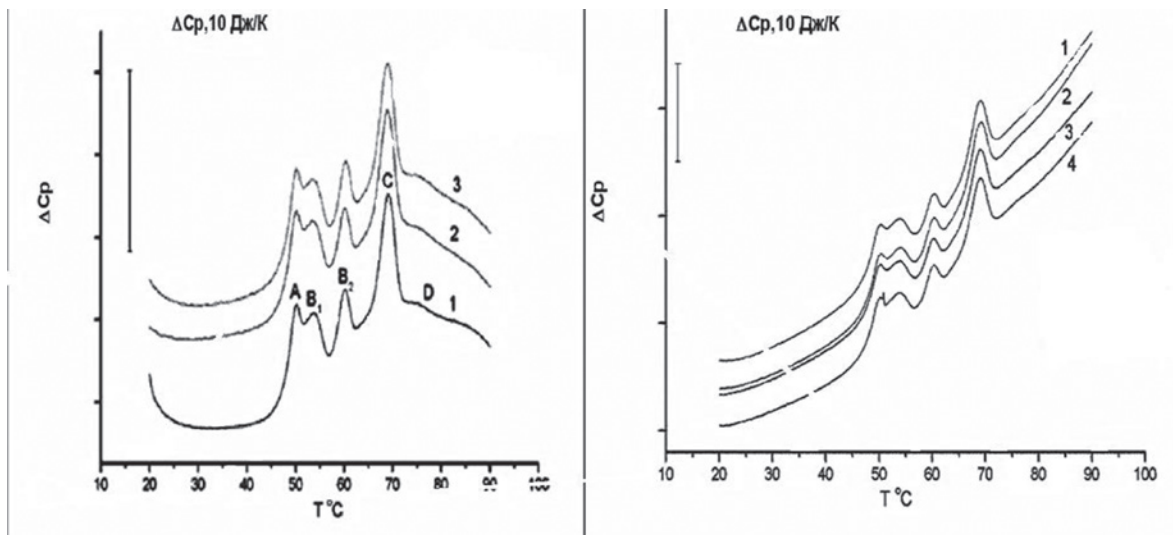
Дифрактограммы всех исследованных дисперсий липосом с добавлением растворов мелафена в широком диапазоне концентраций – от ультра малых до больших, абсолютно одинаковы. Дифрактограммы всех исследованных дисперсий липосом с БАВ и контрольных совпадают. Следовательно, структура мембран в этих липосомах 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 мультиламеллярных липосомах.

Фенозан, феноксан и ИХФАН-10, примененные в больших концентрациях, при встраивании в липосомы значительно изменяли структуру бислоев и упаковку в мультиламеллярных липосомах.

Исследование воздействия БАВ – мелафена и производных фенозана, на мембраны с использованием третьей модели – теней эритроцитов. Методом ДСК тестировали влияние БАВ на структуру теней 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



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



**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, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, С, D – пики термоденатурационных переходов белковых микродоменов теней эритроцитов.

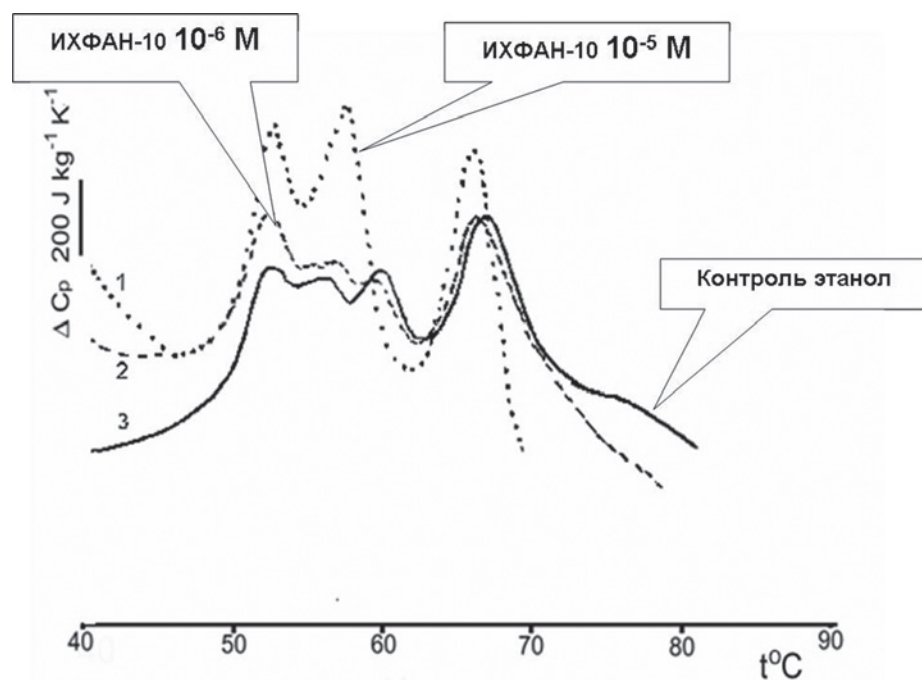
и образуют мембранные домены, денатурация которых формирует структурные тепловые переходы [13,14]. Это 5 идентифицированных структурных денатурационных переходов (А-, В<sub>1</sub>-, В<sub>2</sub>-, С- и D- переходы). А-пик соответствует денатурации белков цитоскелета – спектрина и актина, которые обеспечивают способность эритроцитов к деформации, что является важнейшей характеристикой. В<sub>1</sub>-пик соответствует денатурации белков цитоскелета – анкирина и демантина и белков электрофоретических полос 4,1 и 4,2, которые являются мембранными фрагментами ионных каналов. В<sub>2</sub>-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 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 разрушение 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 термоиндуциро-

ванной 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 контрольная термограмма проявляет все 5 термоденатурационных пика. Добавление во время процедуры получения теней из эритроцитов ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-5}$  М вызывает слияние пиков В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub>, 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



**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.

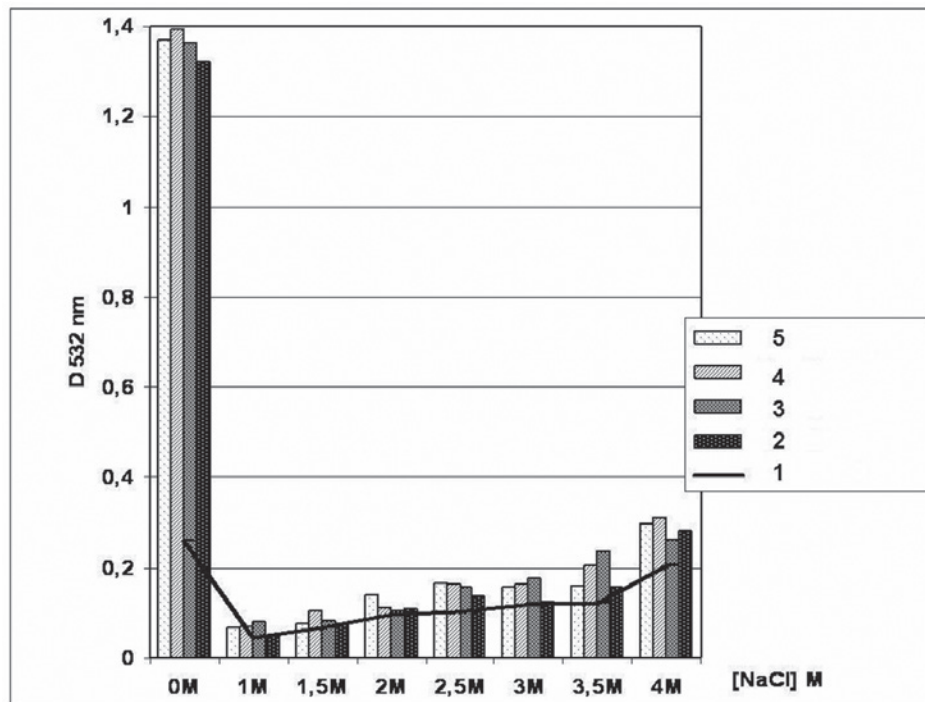
производных фенозана, чем чисто липидные. ИХФАН-10 и феноксан смещают *A*-переход в область более высоких температур, *B*<sub>2</sub>, *C* и *D*-переходы смещаются в область более низких температур. На термограммах видно, что цитоскелетные белки теней эритроцитов: 5 структурных переходов на термограммах, 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-10 в концентрации  $10^{-5}$  М вызывает слияние *B1* и *B2* переходов) и происходит смещение температуры максимумов переходов. 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 фенозана, 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 фенозана 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 мелафена 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



**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.

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 фенозана. 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: тении эритроцитов, и целые клетки – эритроциты, Эффекты веществ на строение более сложные объектов носили не просто структурное воздействие, но влияли и на функционирование оргanelл и клеток.

Необходимо отметить, что представленные в настоящей работе данные являются лишь небольшим фрагментом в огромном массиве исследований, посвященных воздействию биологически активных веществ – регулятора роста

растений мелафена, и антиоксидантов: фенозана и его производных, в структурных и функциональных процессах, происходящих в организмах животного или растительного происхождения.

Для оценки клинической значимости полученных данных представим сведения о феноменах, полученных в фундаментальных исследованиях воздействия фенозана и его производных и мелафена на объекты более высоких уровней биологической организации – на организменном уровне. Однако данных клинических исследований в настоящий момент нет возможности предоставить.

Необходимо также отметить, что для понимания взаимодействия тестируемых БАВ с клеткой, представленные модели экспериментальных объектов достаточно адекватны. Но при действии БАВ на уровне организма, исходная молекула БАВ может значительно подвергнуться метаболизму, катаболизму, и возникнут новые вещества с новыми свойствами и мишенями и эффектами воздействия. Такой пример указан в работах Прокопова А.А. [18].

Под руководством Е.Б. Бурлаковой в ИБХФ РАН были проведены многочисленные фундаментальные исследования действия фенозана и его производных. Во-первых – на уровне организма теплокровных животных, как здоровых, так и имеющих генетические особенности. Выявлялось действие на поведенческие особенности животных. Были сделаны попытки кор-

реляции с воздействием на рецепторы. Проводились эксперименты с сочетанным влиянием фенозана с фармакологическим воздействием. Во-вторых – на уровне тканей проводились опыты с влиянием на контрактуру фрагментов кишки. В третьих, во многих работах из организма животных, подвергнутых стрессовым факторам различной природы, выделялись клетки (эритроциты) или органеллы – митохондрии, эндоплазматический ретикулум, синапсомы, плазматические мембраны. На этих объектах контролировалась проницаемость мембран, которая коррелировала с изменениями вязкости, уровнем перекисного окисления. Для выяснения мишеней действия фенозана проводилось сравнение методами атомно-силовой микроскопии и ДСК эффектов воздействия на плазматическую мембрану, на липосомы, сформированные из смеси фосфолипидов, полученных из этих плазматических мембран. Действие фенозана тестировалось в широком диапазоне концентраций в связи с тем, что были выявлены особенности действия БАВ в сверхмалых дозах: полимодальность кривых зависимости эффектов от дозы БАВ. Выяснялась природа полимодальности. Были предложены объяснения эффектов формированием супрамолекулярных комплексов БАВ-вода, которые вступают во взаимодействие с объектом иными способами, нарушая гидратные оболочки. Вопрос остался достаточно дискуссионным.

Для обсуждения эффектов, вызываемых применением мелафена, укажем, что тестированию действия мелафена на экспериментальных объектах посвящена монография «Мелафен: механизм действия и области применения». Под руководством создателя этого стимулятора роста растений Фаттахова С.Г. были выполнены многочисленные исследования на разных уровнях организации [28].

В качестве экспериментальных объектов были представлены как объекты животного происхождения, что представляет интерес в настоящей работе, так и растения сельскохозяйственного назначения, водоросли, микроорганизмы. Тестирование выполнялось также на разных уровнях организации экспериментальных объектов – от свойств водной среды до функционирования организмов в норме, патологии, при воздействии стрессовых факторов. В некоторых работах проводились одновременные исследования и сравнение эффектов фенозана, его производных и мелафена.

Изучению влияния мелафена на уровне организма теплокровного животного посвящена работа Алексеевой О.М. и Ерохина В.Н. с соавторами [29]. Было показано, что повторные инъекции растворов мелафена в широком диапазоне

разведений мышам с перевитой солидной опухолью Льюис затормаживали рост опухоли, но не влияли на продолжительность жизни животных. Этой работе предшествовали данные, полученные в работе Алексеевой О.М. [30] по влиянию растворов мелафена в широком диапазоне разведений на изолированные клетки асцитной карциномы Эрлиха, перевитой мышам. Было показано угнетение пуриновой-зависимой кальциевой сигнализации, проходящей по метаболитному пути. [30]. Однако эти работы не получили продолжения в клинических исследованиях. Также ингибирующее влияние мелафена было показано для пуриновой-зависимой кальциевой сигнализации, проходящей по неметаболитному пути в тимоцитах и лимфоцитах [30].

Действие фенозана на уровне организма было показано в работе Ерохина В.Н. и Кременцовой А.В., с соавторами [31] на мышах линии АКР со спонтанно развивающимся лейкозом. Проявилось противоопухолевое действие при четырехкратном введении сверх малых ( $10^{-14}$  моль/кг) и терапевтических дозах ( $10^{-4}$  моль/кг) растворов фенозана. Продолжительность жизни животных увеличилась. Большая доза продлила жизнь короткоживущей субпопуляции, малая – долгоживущей. Авторы предположили, что фенозан может быть перспективным противоопухолевым препаратом.

На уровне организма были проведены опыты по сочетанному влиянию радиации и БАВ. При действии радиации применение фенозана усиливает процессы репарации, как показано в работах Миль Е.М. и Бурлаковой Е.Б. с соавторами [32,33]. Низкоинтенсивное  $\gamma$ -облучение дозой 1,2 сГр (0,6 сГр в сутки) мышей линии АКР приводило к снижению р53 и ускорению лейкозного процесса. Фенозан при концентрации  $10^{-14}$  моль/кг и  $10^{-4}$  моль/кг увеличивал содержание регуляторных белков в сыворотке крови мышей низкоразовой линии F1(CBAC<sub>57</sub>/Bl) и мышей лейкозной линии АКР. Увеличение содержания белка контроллера апоптоза р53 и антиапоптозного белка bcl-2 указывает на преобладание процессов репарации над процессами апоптоза. Авторы считают, что к активации белка р53, вызванной фенозаном или действием облучения в малой дозе, приводят различные сигнальные пути. И указывают на корреляцию с данными по снижению содержания дуплетных разрывов ДНК в клетках мышей линии АКР и F1 после воздействия фенозана, полученными в работах Жижиной Г.П. и Милль Е.М. с соавторами [34]. Было показано, что при введении животным антиоксиданта фенозана в дозах  $10^{-14}$  моль/кг и  $10^{-4}$  моль/кг и воздействию  $\gamma$ -излучения в малой дозе 1,2 сГр снижается количество дуплетных разрывов ДНК. Авторы считают, что введение фенозана оказы-

вает защитное действие на структуру ДНК. При сочетанном воздействии облучения и введения фенозана в широком диапазоне концентраций ( $10^{-17}$  М –  $10^{-5}$  М) также обнаружено влияние и на структуры мозга. В работе Трещенковой Ю.А. с соавторами [35] показаны изменения активности фермента лактатдегидрогеназы, коррелирующее с изменением микровязкости микросом, выделенных из разных областей мозга. Авторы полагают, что структурные изменения микросом влияют на связывание фермента с мембранами.

При действии стрессов на уровне целого организма мелафен может оказывать антистрессовое действие, снижая уровень образования продуктов перекисного окисления липидов, что было прослежено по уровням флуоресценции продуктов ПОЛ. Так были показаны антирадикальные свойства мелафена. В результате изменялась микровязкость митохондрий, выделенных из печени животных, подвергнутых холодовому стрессу. Мелафен оказывал влияние и на ферменты дыхательной цепи митохондрий. Отметим, что в этой работе Жигачевой И.В. и Фаткуллиной Л.Д. с соавторами [36] такие изменения были показаны и для растительных объектов.

Роль не только мелафена, но и феноксана, как адаптогена, была также доказана в работе Жигачевой И.В. и Бурлаковой Е.Б. с соавторами [37] на митохондриях растения или печени животного после действия стресса. Было показано снижение ПОЛ до контрольного уровня, имеющее значение для сохранения функциональной активности митохондрий. Авторы делают вывод о том, что таким образом можно повысить устойчивость организмов растений или животных к воздействию стрессовых факторов. В качестве стрессовых факторов использовали гипоксию крыс, алкогольное отравление мышей. Подобные исследования провели и для митохондрий гороха после холодового стресса и засухи. Такому же антистрессовому действию мелафена посвящена работа Жигачевой И.В. и Фаткуллиной Л.Д. с соавторами [38]. Было показано, что мелафен является антиоксидантом. При применении растворов мелафена малых концентраций предотвращалось изменение в жирно-кислотном составе митохондрий, изменялись микровязкость и уровень ПОЛ, активировался перенос электронов при окислении НАД-зависимых субстратов. Было показано влияние мелафена в широкой области концентраций (от  $10^{-22}$  М до  $10^{-7}$  М) на уровень перекисного окисления липидов, скорость транспорта электронов в митохондриях печени. В эритроцитах, в микросомах и в митохондриях печени мелафен изменяет микровязкость аннулярных липидов, снижает уровень флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов.

Сочетанное исследование влияния БАВ в сверхмалых дозах на поведенческие реакции животных с попыткой отслеживания влияния на ткани организма и рецепторные активности представляет большой интерес. Такая работа по изучению эффектов сверхмалых доз феноксана на уровне организма и на уровне рецепторов гладких мышц была проведена Горбатовой Е.Н. и соавторами [39]. Было обнаружено влияние феноксана на краткосрочную образную память и сон животных. Угнетение памяти, вызванное транквилизатором амизилом, введение феноксана снижало. Срок нарушения краткосрочной образной памяти у собак сокращался. Изменение сна барбитуратом гексаналом предотвращалось – введение феноксана вызывало пробуждающее действие. Влияние сверхмалых доз феноксана на функционирование рецепторов исследовали по контрактуре препаратов изолированных мышц – отрезках тонкой кишки. Не наблюдалось ни расслабления, ни сокращения тест-объектов. При этом функционирование холинорецепторов, адренорецепторов, дофаминовых рецепторов не изменялось. Авторы пришли к выводу, что феноксан в сверхмалых концентрациях оказывает влияние на процессы высшей нервной деятельности. Он проявляет антиамнезирующее действие и изменяет чувствительность животных к действию барбитуратов.

Продуктивные исследования ферментативной активности, проведенные одновременно в опытах по изучению влияния на ферменты *in vitro* и *in vivo* были представлены в работах Молочкиной Е.М. с соавторами [40]. Действие феноксана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу и систему липидной перекисидации в мембранах клеток головного мозга. Авторы указывают, что феноксан и эндогенный медиатор ацетилхолин действуют в сверхмалых дозах, проявляя характерные для эффектов сверхмалых доз закономерности. Действуют на кристаллический фермент ацетилхолинэстеразу и на сложную надмолекулярную структуру – мембраны клеток головного мозга мышей *in vitro* и *in vivo*. Феноксан влияет на систему перекисидного окисления липидов в биологических мембранах.

На культуре клеток в работах Пальминой Н.П. с соавторами [41]. было изучено действие феноксана на активность протеинкиназы С в нормальных и опухолевых клетках, растущих в культуре в условиях, приближенных к *in vivo*. В качестве биологических моделей были выбраны гладкомышечные клетки аорты крыс. Было обнаружено, что феноксан действует как активатор протеинкиназы С.

Тестирование эффектов феноксана на выделенных органеллах – эндоплазматическом

ретикулуме было проведено в работе Пальминой Н.П., и Кледовой Л.В с соавторами [42]. В сравнении с действием природного антиоксиданта –  $\alpha$ -токоферола, было показано влияние феноксана в широком диапазоне концентраций на перекисное окисление липидов и коррелирующее с ним изменение структуры эндоплазматического ретикулума. При тестировании эффектов феноксана на выделенных плазматических мембранах в работах Пальминой Н.П. и Часовской Т.Е. с соавторами [43,44] было установлено, что основной мишенью в клетке для воздействия феноксана являются липиды. Методом ЭПР было показано, что феноксан полимодально в двух диапазонах концентраций:  $10^{-6}$  М,  $10^{-7}$  М и  $10^{-13}$  М,  $10^{-15}$  М, увеличивает упорядоченность липидов плазматических мембран клеток печени. В липосомах, сформированных из липидов, выделенных из плазматических мембран в большей степени увеличивает упорядоченность структуры. Методом ДСК выявили дополнительный термоиндуцированный переход в липидном бислое и сдвиги и уширения переходов в плазматической мембране и в липосомах при действии феноксана в концентрациях  $10^{-14}$  М,  $10^{-15}$  М. Методами АСМ и ДСР было показано изменение формы и размеров липосом (увеличение среднего диаметра; отношение длина/ширина; превращение шарообразной формы в палочкообразную), коррелирующее с изменением степени упорядоченности областей липидов. Авторами выдвинуто предположение, что при низких концентрациях феноксана в воде образуются наноассоциатные комплексы феноксана с водой. Эффекты таких растворов феноксана обусловлены их физико-химическими свойствами (электропроводностью). На уровне воздействия на клетки при тестировании эффектов ИХФАНов на выделенных эритроцитах в работах Паршиной Е.Ю. и Генделя Л.Я., с соавторами [45,46] методом ЭПР было определено изменение микровязкости на разных глубинах локализации парамагнитных зондов в мембране. С помощью электронной микроскопии описали изменения морфологии эритроцитов. И спектральными методами определили влияние на целостность мембраны по уровню освобождения гемоглобина. Было обнаружено, что влияние ИХФАНов на структурные свойства, затрагивает и функциональные свойства эритроцитов. Так, встраиваясь преимущественно в липидные локусы эритроцитарной мембраны, ИХФАНЫ уменьшали микровязкость внутримембранного пространства на различной глубине, изменяли морфологию эритроцитов и вызывали гемолиз.

Интересные данные получены при исследованиях физико-химических особенностей водных растворов и эмульсий исследуемых нами веществ в работах Коновалова А.И. и Рыжкиной

И.С. с соавторами [47]. Необходимо указать, что многие исследования были выполнены на широком диапазоне концентрации БАВ. Уменьшающиеся концентрации БАВ готовили из концентрированного водного или водно-этанольного раствора БАВ последовательным разведением. Количество БАВ, контактирующего с экспериментальным объектом, при этом не контролировалось. Еще раз напомним, что в объекте велика вероятность концентрирования и, соответственно, значительное повышение количества БАВ.

По мере усложнения экспериментального био-объекта усиливается его защищенность от деструктивного воздействия протестированных БАВ. Однако, влияние на функционирование клеток, тканей, организма со стороны экзогенных БАВ остается существенным и зависит от концентрационных диапазонов и от присутствия других физико-химических факторов: состава и ионной силы окружающей среды, радиационного облучения, фармакологически активных веществ. Также в значительной мере эффекты указанных в данной работе БАВ зависят от исходного состояния организма животного и от воздействия стрессовых факторов.

Как ранее было показано в работах Бурлаковой Е.Б с соавторами [19] эффекты БАВ, протестированных в широких диапазонах концентраций, четко демонстрируют полимодальность на кривых зависимостей доза-эффект. Обычно выявляются экстремумы в областях сверх низких и сверх высоких концентраций БАВ с «молчащей зоной» между ними. Интерпретация подобных феноменов остается дискуссионной. Однако это можно объяснить, например, для гидрофобных экзогенных веществ тем, что в больших концентрациях они просто «пробивают» клеточную оболочку, либо встраиваются в оболочку, либо проходят внутрь клетки. При этом происходит нарушение всего структурного и функционального баланса клетки. На уровне организма огромные дозы экзогенного БАВ улавливаются первыми мишенями, а далее уже идут либо малые дозы, либо происходит изменение химической структуры БАВ в результате катаболизма, метаболизма. Первые мишени получают значительное поражение структуры и функции и элиминируются из организма. Включаются также процессы репарации. Эффект «молчащей зоны» – это, по-видимому эффект отложенной реакции. Эффект сверхмалых доз – это воздействие на точечные мишени, вызывающие изменение функционирования биообъекта без деструкции. Процесс репарации в случае малых доз, вероятно, не активируется. Однако отложенный эффект малых доз в силу накопления воздействия может быть значительным. Исследование феноменов малых и больших доз БАВ нуждаются в дальнейшем исследовании

и подробном рассмотрении отложенного во времени последствия.

В работах Рыжкиной И.С., и Пальминой Н.П. с соавторами [48,49] были предприняты попытки объяснения действия сверхмалых концентраций БАВ (мелафена, феноксана, ИХФАН-10) с точки зрения взаимодействия указанных БАВ с водной средой, окружающей биообъект. Авторы утверждают, что при значительных разведениях в водных растворах образуются супрамолекулярные структуры вода-БАВ.

И именно эти супрамолекулярные комплексы и оказывают влияние на структурные и функциональные свойства экспериментальных объектов. Описаны физико-химические характеристики растворов и эмульсий, указывающие, по мнению авторов, на формирование супрамолекулярных комплексов биологически активных веществ – вода. Показано изменение светорассеяния, размеров наноассоциатов, удельной электропроводности,  $\zeta$ -потенциала в зависимости от разведения БАВ. Кривые зависимостей физико-химических характеристик от концентрации БАВ коррелируют с кривые зависимостей для био-эффектов. Феномен наличия супрамолекулярных комплексов обсуждался. И остался в значительной степени не выясненным. Как указывали в своих работах Сиротюк М.Г. [50] и Гаврилов Л.Р. [51] в водных растворах существуют некавитирующие газовые пузырьки, которые могут обуславливать эффекты светорассеяния и электропроводимости в таких растворах. Было показано, что поверхность таких газовых пузырьков гидрофобна и может адсорбировать и ионы, и вещества. Так, добавление БАВ будет менять растворимость газов, кавитацию и, следовательно, физико-химические свойства тако-

го раствора. И это также может служить фактором для воздействия на биологические объекты. Вопрос остается дискуссионным и в настоящее время.

**Закключение.** В результате представленной нами работы было показано, что экзогенные синтетические вещества: мелафен и производные фенозана при применении в определенных концентрациях не разрушают чисто липидные мембраны и белок – липидный цитоскелет тень 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 гелиевое 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.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меланиновая соль бис гидроксиметил) фосфиновой кислоты (Мелафен), как новый сильный регулятор роста растений. В кн. Материалы 13 международной конференции химии фосфорных соединений. С-Пб. 2002. S. 80-2.
2. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затруднённые фенолы. М. Химия. 1972.
3. Никифоров, Г.А. Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Горбунов Д.Б. Биоантиоксиданты "поплавокного" типа на основе производных 2,6 дитретибутил-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 (дигидронверцитина) с мультиламеллярными липосомами из димиристоилфосфатидилолина. Биофизика. 2008; 53:78-84.
5. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. Липидные мембраны при фазовых превращениях. М: Наука. 1992.
6. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. М.: Издательство ЛКИ. 2011.
7. Хараноз Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твердое» в биологических мембранах. Успехи Биологических Наук. 2001. 41. 264-333.
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 2006.
9. Lindblom G., Oradd G., Flipov 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. 1986.
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: 199-230.
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. Биолетень Экспериментальной Биологии и Медицины. 1997; 123: 279-284.
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: 284-294.
15. Гендель Л.Я., Ким Л.В., Лунёва О.Г., Федин В.А., Круглякова К.Е. Изменения поверхностной архитектоники эритроцитов под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана-1. Известия РАН. Серия Биология. 1996; 4: 508-512.
16. Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н., Трещенкова Ю.А. Действие малых доз фенозана на биохимические свойства лактадегидрогеназы и микровязкость мембран микросом мозга мышей. Радиационная биология. Радиоэкология. 2003; 3: 320-323.
17. Ким Ю.А., Елемесов П.Е., Акоев В.Р. Гиперосмотический гемолиз эритроцитов и антигемолитическая активность фракции сапонинов и триглицеридов гликозидов из *Rapax Ginseng* С.А. Meyer. Биологические мембраны. 2000; 17: 15-26.
18. Прокопов А.А., Шукиль Л.В., Берлянд А.С. Изучение метаболизма фенозан-кислоты в организме кроликов. Химико-фармацевтический журнал. 2006; 40: 3-4.
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., Mc Elhaney R.N. Differential scanning calorimetry study of the effect of cholesterol on the thermo tropic 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 фенозана на структуру фосфолипидных мембран. *Нейрохимия.* 1996; 13:128-132.

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: 9-14.

25. Кривандин А.В., Фаткуллина Л.Д., Шаталова О.В., Голощачов А.Н., Бурлакова Е.Б. Исследование встраивания антиоксиданта ИХФАН в липосомы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Химическая физика.* 2013; 32: 91-96.

26. Fatkullina L.D., Vekshina O.M. (Aleksseeva 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 13. 115-123.

27. Ким Ю.А., Елемесов Р.Е., Акоев В.Р. Гиперосмотический гемолиз эритроцитов и антигемолитическая активность фракции сапонинов и тритерпеновых гликозидов из *Panax Ginseng* С.А. Meyer. *Биологические мембраны.* 2000; 17: 15-26.

28. Фаттахов С.Г. Мелафен – перспективный препарат для сельского хозяйства, биотехнологий и экобиотехнологии. Мелафен: механизм действия и области применения. 2014; Печать – Сервис XXI век Казань (под редакцией Фаттахова С.Г., Кузнецова В.В., Загоскиной Н.В. 408 с. 9-14.

29. Алексеева О.М., Ерохин В.Н., Кременцова А.В., Миль Е.М., Бинюков В.И., Фаттахов С.Г., Ким Ю.А., Семёнов В.А., Голощачов А.Н., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. Изучение влияния малых доз мелафена на клетки злокачественных новообразований животных in vivo и in

vitro. Доклады Академии наук. 2010; 431: (3). 408-410.

30. Aleksseeva O.M. Chapter 9: «The Influence of Melafen-Plant Growth Regulator to some Metabolic pathways of animal cells». Book «Nanopolymers and Modern Materials Processing, Production and Applications» Editors: O.V. Stoyanov, A. K. Naghi, G. E. Zaikov Apple Academic Press, Toronto New Jersey 2013; 147-161.

31. Ерохин В.Н., Кременцова А.В., Семенов В.А., Бурлакова Е.Б. Влияние антиоксиданта - (гидрокси-3,5-дитретибутилфенил) пропиононовой кислоты (фенозана) на развитие злокачественных новообразований. *Известия РАН. Сер. биол.* 2007; 5: 583-590.

32. Миль Е.М., Албантова А.А., Бурлакова Е.Б. Влияние антиоксиданта фенозана и облучения в малой дозе на содержание белков P53 и BCL-2 у мышей разных линий. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2010; 50: (1). 58-64.

33. Миль Е.М., Мышлякова О.В., Бурлакова Е.Б. p53 при низкоинтенсивных воздействиях физической и химической природы (ионизирующее излучение и антиоксидант). *Биофизика.* 2005; 50: (1). 75-79.

34. Жижина Г.П., Заварыкина Т.М., Миль Е.М., Бурлакова Е.Б. Изменение структурных характеристик ДНК селезенки у мышей после введения фенозана и общего воздействия у-радиации в малой дозе с малой мощностью. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2007; 47: (4). 414-422.

35. Трещенкова Ю. А., Голощачов А.Н., Шишкина Л.Н., Бурлакова Е. Б. Действие малых доз антиоксиданта фенозана и облучения на гликолитические ферменты субклеточных структур клеток мозга. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2003; 43: (3). 320-323.

36. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Русина И.Ф., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И. Антистрессовые свойства препарата мелафен. Доклады Академии Наук. 2007; 414: (2). 263-265.

37. Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б.,

Генерозова И.П., Шугаев А.Г. Роль адаптаций в регуляции биоэнергетических функций митохондрий в условиях стресса. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии.* 2013; 30: (4). 313-321.

38. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.Г. Сверхмалые концентрации препарата «Мелафен» изменяют структурно-функциональные характеристики биологических мембран растительного и животного происхождения. «Мелафен: механизм действия и области применения». Под ред. С.Г. Фаттахова, В.В. Кузнецова, Н.В. Загоскиной. — Казань: «Печать-Сервис XXI век».2014;136-147.

39. Горбатова Е.Н., Духович Ф.С., Курочкин В.К. Изучение эффектов сверхмалых доз фенозана. *Российский Химический журнал* 1999; 43: (5). 80-81.

40. Молочнича Е.М., Озерова И.Б., Бурлакова Е.Б. Действие фенозана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу и систему перекисидации в мембранах клеток головного мозга, *Российский Химический журнал* 1999; 43: 63-71.

41. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Пынзарь Е.И., Бурлакова Е.Б. Модификация активности протеинкиназы С лигандами в сверхмалых концентрациях. Роль протеникиназы С и ее эффекторов в процессах перекисидного окисления. *Российский Химический журнал* 1999; 43: 55-63.

42. Пальмина Н.П., Кледова Л.В., Панкова Т.В. Гаинцева В.Д. К вопросу о "рецепторном" механизме действия биологически активных веществ в сверхнизких концентрациях. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2003; 43: (3). 310-314.

43. Часовская Т.Е., Мальцева Е.Л., Пальмина Н.П. Действие фенозана калия на структуру плазматических мембран клеток печени мышей in vitro. *Биофизика.* 2013; 58: (1). 97-105.

44. Пальмина Н.П., Часовская Т.Е., Бинюков В.И., Плащина И.Г. Механизм действия синтетического антиоксиданта фенозана калия в сверхнизких

концентрациях на поверхностные области липидов плазматических мембран. Труды VI международного конгресса «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». 2012; 84-97.

45. Паршина Е.Ю., Гендель Л.Я., Рубин А.Б. Влияние новых гибридных антиоксидантов - ихфанов - на морфологию эритроцитов. *Биофизика.* 2004; 49. (6): 676-679.

46. Паршина Е.Ю., Гендель Л.Я., Рубин А.Б. Влияние новых гибридных антиоксидантов - ихфанов - на кинетику аскорбат-индуцированного восстановления радикальных центров спиновых зондов в липосомах. *Биофизика.* 2005; 50. (4): 676-679.

47. Коновалов А.И., Рыжжина И.С., Муртазина Л.И., Тимошева А.П., Шагидуллин Р.Р., Чернова А.И., Аввакумова Л.В., Фаттахов С.Г. Супрамолекулярные системы на основе дигдрата меламиновой соли бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафена) и поверхностно-активных веществ. Сообщение 1. Строение и самоассоциация мелафена в воде и хлороформе. *Известия Академии наук. Серия химическая.* 2008; 6: 1207-1214.

48. Рыжжина И.С., Муртазина Л.И., Киселева Ю.В., Манжукова Д.Н., Тимошева А.П., Пальмина Н.П., Коновалов А.И. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ. Доклады Академии наук. 2009; 428: (4). 487-491.

49. Пальмина Н.П., Часовская Т.Е., Рыжжина И.С., Муртазина Л.И., Коновалов А.И. Водные растворы фенозана калия: влияние на структуру биологических мембран и электропроводность. Доклады Академии наук. 2009; 429: (1). 128-131.

50. Сироток М.Г. Влияние температуры и газосодержания на кавитационный процесс. *Акустич. Журнал.* 1966; 12: (1). 87-92.

51. Гаврилов Л.Р. «Физические основы процессов ультразвуковой технологии» под ред. Л.Д. Розенберга. М. Наука. 1970; 395-426.

## REFERENCES:

1. Fattakhov S.G., Reznik V.S., Kononov 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. 2002. 80. 2 (in Russian).

2. Ershov V.V., Nikiforov G.A., Volodkin A.A. Spatially hampered phenols. M. Khimia. 1972. (in Russian).

3. N. Nikiforov G.A., Belostotskaya I.S., Vo'eva V.B., Komissarova N.L., Gorbunov D.B. Bioantioxidants "float types" at base of derivatives 2,6 ditret butyl feny. *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 dimyristoilphosphatidylcholine. *Biophys. 2008; 5: 279-84* (in Russian).

5. Antonov V.F., Smimova E.Yu., Shevchenko E.V. Lipid membranes under the phase transitions M. Nauka. 1992. (in Russian).

6. Tarachovsky Yu.S. Intellectual lipid's nana containers at address transport of medical substances. M. LKI. 2011. (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., Gimatdinov 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. 2006. (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. 1986. (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. Aкоев V.R., Sherbinina S.P., Matveev A.V., Tarachovsky Yu.S., Deev A.A., Shirov V.L. Investigations of structural transitions at erythrocytes' membrane when hereditary hemochromatosis. *Bulletin Experimental biology and medicine.* 1997; 123: 279-84 (in Russian).

14. Aкоев 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 A.V., Kruglakova K.E. Changes of cursory architectonics of erythrocytes under the impact of synthetic antioxidant Fenosan-1. Reports of Russian Academy of Science. Series. Biol. 1996; 4: 508-512 (in Russian).

16. Burlakova E.B., Goloshchapov A.N., Treshchenkova Yu.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., Eлемесов R.E., Акоев V.R. *Hyper osmotic hemolysis of erythrocytes and antihemolytic activity of saponins faction and triterpents 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. Melaфen- perspective preparation for agricultural, biotechnology and ecobiotechnology. At Book: Melaфen: 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. Shatalova O.V., Goloshchapov A.N., Burlakova E.B. Investigation of antioxidant IHFAN incorporation to liposomes by method small angle Rentgen scattering. *Chemical Physics.* 2013; 32: 91-96. (in Russian).

26. Fatkullina L.D., Vekshina O.M. (Aleksseeva 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 13. 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).
28. Fattahov S.G. Melafen – perspective substance for agriculture, biotechnology and ekobiotechnology. Book “Melafen: mechanism of action and aerials of using” (Editors Fattahov S.G., Kuznetsov V.V., Zagoskina N.V.) Kazan “Pechat-Servis. XXI senture”. 2014; 9-14. (in Russian).
29. Alekseeva O.M., Erokhin V.N., Kremntsova A.V., Mill E.M., Binukov V.I., Fattahov S.G., Kim Yu. A., Semenov V.A., Golochshapov A.N., Burlakova E.B., Konovalov A.I. The investigation of melafen super low doses influences to the tumor of animals in vivo and in vitro. *Reports of Academy of science* 2010; 431: (3). 408-410. (in Russian).
30. Alekseeva O.M. Chapter 9: «The Influence of Melafen-Plant Growth Regulator to some Metabolic pathways of animal cells». Book «Nanopolymers and Modern Materials Processing, Production and Applications» Editors: O.V. Stoyanov, A. K. Haghi, G. E. Zaikov Apple Academic Press, Toronto New Jersey 2013; 147-161.
31. Erokhin V.N., Kremntsova A.V., Semenov V.A., Burlakova E.B. The influences of antioxidant – (hydroxyl-3,5-diterbutylphenil) propionic acid (phenozan) to the development of tumor. *Reports of Academy of science* 2007; 5: 583-590. (in Russian).
32. Mill E.M., Albantova A.A., Burlakova E.B. The influence of antioxidant phenozan and radiation at low doses to the contain of P53 and BCL-2 proteins at mouse of different lines. *Radiation biology. Radioecology*. 2010; 50: (1). 58-64. (in Russian).
33. Mill E.M., Mishliakova O.V., Burlakova E.B. P53 under the low intensity actions of physical and chemical natures (ionization's emissions and antioxidant). *Biophysic*. 50: (1). 75-79. (in Russian).
34. Zhizhina G.P., Zavarikina T.M., Mill E.M., Burlakova E.B. The changes of structural characteristics of DNA of mouse spleen after the injection of phenozan and mutual actions of  $\gamma$ -radiation at low dose with small power. *Radiation's biology. Radiation ecology*. 2007; 47: (4). 414-422. (in Russian).
35. Treuschenkova Yu.A., Golochshapov A.N., Shishkina L.N., Burlakova E.B. The actions of low doses of antioxidant phenosan and radiation to the glycolic enzymes of sub cellular structures of cells of brain. *Radiation's biology. Radiation ecology*. 2003; 43: (3). 320-323. (in Russian).
36. Zhigacheva I. V., Fatkulina L.D., Rusina I.F., Shugaev A.I., Generosova I.P., Fattahov S.G., Konovalov A.I. Antistress properties Influence of substance melafen. *Reports of Russian Academy of Sciences* 2007; 414: (2). 263-265. (in Russian).
37. Zhigacheva I.V., Burlakova E.B., Generosova I.P., Shugaev A.I. Role of adaptogens at regulation of bioenergetics' functions of mitochondrial at stress conditions. *Biology membranes*. 2013; 30: (4). 313-321.
38. Zhigacheva I. V., Fatkulina L. D., Shugaev A. I., Super Low concentrations of melafen change the structural-and functional properties of biological membranes of plant and animal's origin. Book “Melafen: mechanism of action and aerials of using” (Editors Fattahov S. G., Kuznetsov V.V., Zagoskina N.V.) Kazan “Pechat-Servis XXI senture”. 2014; 136-147. (in Russian).
39. Gorbatova E.N., Duchovitch F.C., Kurochkin V.K. Investigation of effects of super low doses of phenozan. *Russian Chemical Journal*. 1999; 43: (5). 80-81. (in Russian).
40. Molochkina E.M., Ozerova I.B., Burlakova E.B. The phenozan action to the acetylcholinesterase and system of lipid's peroxidation at membranes of brain cells. *Russian Chemical Journal*. 1999; 43: 63-71. (in Russian).
41. Palmina N.P., Maltseva E.L., Pinzar E.I., Burlakova E.B. Modification of proteinkinase C activity by ligands at superlow concentrations. The role of proteinkinase C and its effectors at processes of peroxide oxidation. *Russian Chemical Journal*. 1999; 43: 55-63. (in Russian).
42. Palmina N.P., Cledova L.V., Pankova T.V., Gaintseva V.D. To the question of the “receptors” mechanism of biological substances actions at super low concentrations. *Radiation's biology. Radiation ecology*. 2003; 43: (3). 310-314. (in Russian).
43. Chasovskaya T.E., Maltseva E.L., Palmina N.P. The phenozan action to the plasmatic membrane structure of mice liver cell's in vitro. *Biophysics*. 2013; 58: (1). 97-105. (in Russian).
44. Palmina N.P., Chasovskaya T.E., Binukov V.I., Plaschina I.G. Mechanism of antioxidant action under super low concentrations at the surface areas of plasmatic membrane areas. VI International congress “Weak and ultra weak fields and radiations in biology and medicine” 2012; 84-97. (in Russian).
45. Parshina E.Yu., Gendel L.Ya., Rubin A.B. The influence of new hybrid antioxidants – IHFANs, to the erythrocyte's morphology. *Biophysics*. 2004; 49: (6): 1094-1098. (in Russian).
46. Parshina E.Yu., Gendel L.Ya., Rubin A.B. The influence of new hybrid antioxidants – IHFANs, to the kinetics of the ascorbat-dependent reestablishment of radical centers of spin zondes at liposomes. *Biophysics*. 2005; 50: (4): 676-679. (in Russian).
47. Konovalov A.I., Rizkina I.S., Murtazina L.I., Timosheva A.P., Shagidullin R.R., Chernova A.I., Awakumova L.V., Fattakhov S.G. Supramolecular systems at the base of dihydro melamine salt bis (oximethyl) phosphinic acid (melafen) and of the surface-active substances. Speech 1. Structure and self-association of melafen in water and chloroform. *Reports of Academy of science. Chemical series*. 2008; 6: 1207-1214. (in Russian).
48. Rizkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Yu.V., Mangukova D.N., Tomosheva A.P., Konovalov A.I. Properties of supramolecular nanoassociates, formed at water solutions under low and super low concentrations of biological active substances. 2009; 428: (4). 487-491. (in Russian).
49. Palmina N.P., Chasovskaya T.E., Rizkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Yu. V. Konovalov A.I. Water solutions of potassium phenozan: influence to the structure of biological membranes and electro conductivity. *Reports of Academy of science*. 2009; 429: (1). 128-131. (in Russian).
50. Sirotk M.G. The temperature and gases containing influence to the cavitations processes/ *Acoustic Journal* 1966 1966; 12: (1). 87-92. (in Russian).
51. Gavrillov L.R. Physical bases of ultrasonic technology processes. Ed. Rosenberg L.D. M. Nauka. 1970; 395-426. (in Russian).

O.M. Alekseeva<sup>1</sup>, A.V. Kremntsova<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 DETERMINING THE CONCENTRATION RANGE OF CHEMICALS WITHOUT DESTROYING THE BIOLOGICAL OBJECTS

<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, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moscow region, Russian Federation

The paper presents data on changes in model biomembranes (liposomes, erythrocyte shadows, erythrocytes) used as test objects for determining those areas of concentrations of biologically active substances in which there is no violation of the structure or function of experimental objects. As biologically active substances synthetic ones were selected: plant growth regulator-melafen used in small doses in pre-sowing seed treatment and antioxidant derivatives -phenosan, phenoxan and Ihfans. It was shown by DSC method that phenosan derivatives in concentrations equal to  $10^{-5}$  M and more destroy microdomain organization in bilayers of phospholipid multilamellar liposomes and reform protein microdomains in the shadows of erythrocytes. Melafen in small and large concentrations changes polymodally the microdomain organization in the bilayers of phospholipid multilamellar liposomes without destroying the structure and does not affect the protein microdomains in the shadows. Spectral analysis revealed an increase in membrane permeability in isolated whole erythrocytes under the action of melafen in large and small concentrations. The method of small-angle diffraction scattering showed the absence of melafen influence in a wide range of concentrations on the thickness of phospholipid bilayers and the order of their packing in multilamellar liposomes.

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

Переработанный материал поступил в редакцию 19.07.2019 г.