

ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЖИВЫХ ОБЪЕКТОВ

Алексеева О.М.¹, Кременцова А.В.¹, Кривандин А.В.¹, Шаталова О.В.¹, Ким Ю.А.²

¹Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля
ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, РФ; e-mail: olgavek@yandex.ru

²Институт биофизики клетки РАН
ул. Институтская, 3, Пущино, Московская обл., 142290, РФ

Поступила в редакцию: 05.06.2018

Аннотация. В статье сделана попытка на основании данных, полученных при исследовании действия биологически активных веществ (БАВ) с привлечением современных экспериментальных модельных и биообъектов переосмыслить вероятностные возможности формирования пребиотических и биотических процессов, приводящих к возникновению, дальнейшему усовершенствованию и приспособлению к окружающей среде предшественников живых существ. Экспериментальные объекты использовали последовательно по мере усложнения их структурных свойств и соответственно появлению функциональных свойств. В качестве экспериментальных объектов для структурных исследований липид-липидных взаимодействий использовали липосомы, сформированные, как из искусственного индивидуального фосфолипида, так и из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина. Для выявления структурных перестроек при участии белок-липидных взаимодействий использовали тени эритроцитов и изолированные эритроциты. Влияние БАВ на функционирование клеток изучали, как на трансформированных с неконтролируемым ростом клетках асцитной карциномы Эрлиха, так и на нормальных клетках – тимоцитах и лимфоцитах. Для изучения действия БАВ в роли модификаторов структуры и функций модельных и биообъектов, применяли уже известные гидрофильные вещества – регулятор роста растений мелафен, антиоксидант феноксан и гидрофобные антиоксиданты – ИХФАНЫ. Так удалось проследить влияние БАВ, как вероятных факторов естественного отбора различной природы, на все более усложняющиеся по своей организации объекты, имитирующие этапы развития на ранних стадиях истории жизни. БАВ могут выступать, как фактор эволюции для элиминации неустойчивых структур, а также как фактор для появления новых образований или модифицирования уже существующих в результате встраивания БАВ. Полученные данные могли бы помочь также анализу функционирования предшественников современных клеточных структур.

Ключевые слова: мембраны; эритроциты; биологически активные вещества, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия, гемолиз.

Рассмотрим некоторые компоненты как первичных пребиотических, так и современных организмов. Это мембраны. Они отделяют и защищают от окружающей среды, внутри формируют компартменты, способствуя созданию локальных концентраций веществ, локальных зарядов. Таким образом, возникают градиенты, во многих случаях являющиеся движущей силой биологических процессов. Мембраны также предоставляют твердую подложку для концентрирования или создания определенного порядка молекул, обеспечивают стереоспецифическое расположение молекул, необходимое для химического взаимодействия, переноса электронов. Внутри мембран возможно формирование и модификации интегральных белков, которые впоследствии осуществляют функции ионных насосов, рецепторов, ферментов.

На конференции «Проблема происхождения жизни» в докладе Четверина А.Б. [1] был отмечен пример возможной роли мембран. Обсуждались экспериментальные модели «мира РНК». По предположению автора многослойные липосомы обеспечивают концентрирование РНК, для которого необходимы, как минимум, 2 параллельные близкорасположенные мембраны [1]. Но формирование упорядоченных структур многослойных липидных мембран будет затруднено в присутствии молекул другого типа. Возникает вопрос, возможно ли молекулам РНК проникнуть в уже сформированные липосомы в поры диаметром от 1 до 3 нм. Это размер короткоживущих нанопор и дефектов в фосфолипидных мембранах, возникающие при фазовых переходах, происходящих при изменениях температуры, как показано в работах Антонова В.Ф. [2]. Прохождение молекул микроРНК (miR122a) через нанопоры в мембранах из нитрида кремния было продемонстрировано в работах Dmđić M. [3]. Следовательно, многослойные липосомы могли бы служить «подложкой» для локализации РНК. В связи с этим, подчеркнем актуальность в русле первой темы конференции «Проблема происхождения жизни» наших исследований, проводимых на экспериментальных моделях - многослойных липосомах.

Липосомальные мембраны в водных средах образуются из молекул, содержащих гидрофобные и гидрофильные части. Формирование происходит в результате процесса кристаллизации путем самосборки. Кристаллизация широко распространена в «неживой - минеральной» природе. Объединение единообразных молекул в конгломерат (мембрану) из раствора или суспензии происходит в результате гидрофобных и гидрофильных взаимодействий между молекулами. Кристаллизация мембран во многих случаях происходит на

границе раздела фаз. В случае «первичных мембран» такой раздел фаз могли предоставлять - минералы с ячеистой структурой, образующиеся в результате вулканической деятельности, или пористые глины в приливно-отливной зоне первичного океана, где также могло происходить перемешивание и концентрирование веществ. В таких порах и ячейках могли накапливаться предшественники клеток - коацерваты. Возможно, молекулы, имеющие неполярные и полярные части, выстилали поверхности в ячейках минералов, которые в свою очередь могли быть нейтральными или заряженными. Заполнение же полостей химически активным содержимым, как жидким, так и газообразным могло дать начало появлению коацерватов и постепенному формированию пребиотических организмов.

Переходя к нашему времени, когда биогенные процессы преимущественно происходят в водной среде, мы можем промоделировать некоторые виды формирования мембран в присутствии границ раздела фаз: вода - воздух, вода - твердое вещество. Первой моделью, предоставляющей большие возможности для исследований, были выбраны липосомы. Липосомы являются достаточно интересным экспериментальным объектом для изучения формирования первичных био-подобных структур и влиянию на их организацию различных веществ, называемых биологически-активными веществами (БАВ). В качестве БАВ могут выступать, как ионы, так и вещества простые и комплексные - неорганические и органические.

Липосомы образуются в результате спонтанного процесса самосборки амфифильных липидных молекул. В зависимости от способа обработки липидов и степени гидратации гидрофобные и гидрофильные взаимодействия обуславливают формирование различных видов мицелл и липосом. Липиды являются структурной основой всех биологических мембран. В наших исследованиях для формирования модельных экспериментальных объектов использовались липиды одного из 8 важнейших классов липидов живых организмов - глицерофосфолипиды (фосфолипиды) [4]. Молекулы фосфолипидов состоят из гидрофильной полярной головки с заряженными фосфатными группами, и гидрофобной неполярной части. Суммарно молекула может быть нейтральной или заряженной отрицательно. Гидрофобная часть состоит из жирнокислотных остатков. Такое строение молекулы позволяет фосфолипидам в зависимости от стереоспецифических параметров - соотношения размеров полярной головки и неполярных жирнокислотных остатков, формировать в водных средах бислоиные или гексагональные образования, которые и встречаются в клетках живых организмов.

Структурные особенности клеточных органелл в нашей работе промоделированы с помощью мультислойных - мультиламеллярных липосом. С применением таких липосом исследовалось влияние БАВ на липид-липидные взаимодействия в структуре мембран. Мультиламеллярные липосомы представляют собой множество вложенных друг в друга концентрических бислоиных липосом, убывающих по размеру (рис. 1).

Строение таких структур было подтверждено их электронно-микроскопическое изображением, полученным методом замораживания-скальвания [5]. Расстояние между полярными областями (фосфолипидными головками) двух соседних бислоиных липосом в таком мультислойе, рассчитанные с помощью метода малоуглового дифракционного рассеяния составляют около 3 нм [6], что достаточно хорошо имитирует расстояния во внутренних пространствах между мембранами в клетке. Так взаимно расположены терминальные цистерны саркоплазматического ретикулума и саркоlemma – внешняя плазматическая мембрана, в клетках поперечнополосатых мышц. Хорошими примерами многослойного расположения мембран в клетках могут также служить органеллы: митохондрии, аппарат Гольджи и ретикулум.

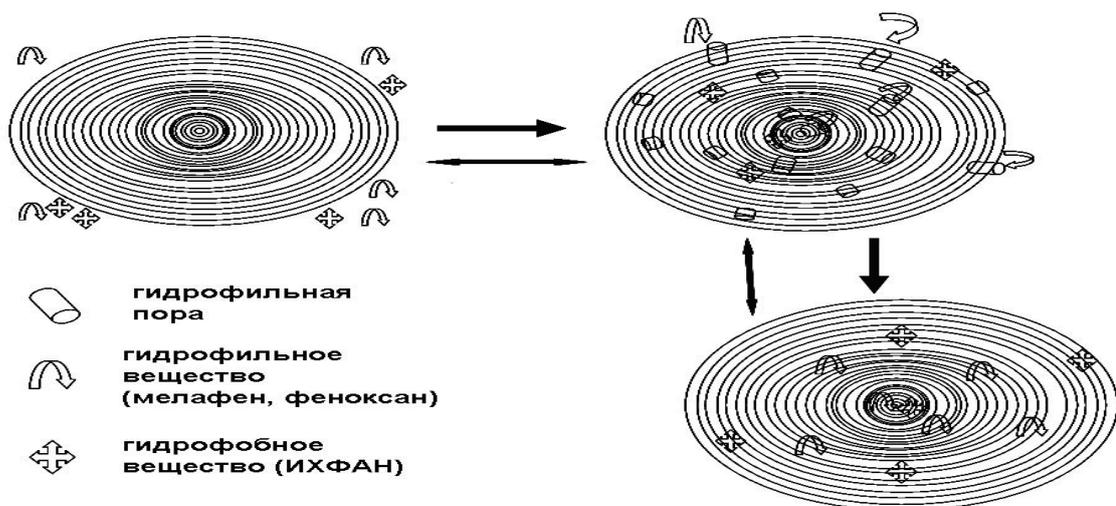


Рисунок 1. Схема мультиламеллярных липосом и проникновение БАВ

Переформирование клеточных компартментов моделируется с помощью фосфолипидных мицелл, формирующих гексагональные, а также стопкообразные структуры. Влияние БАВ на такие образования может быть предметом дальнейших исследований. Гексагональные структуры появляются в моменты слияния или образования пор и расхождения бислоев. Формирование стопкообразных структур характерно для веществ, имеющих в составе своих молекул кольца, например, широко распространенный в растительном мире метилксантин кофеин. Отметим, что для кофеина в клетках животного происхождения имеются риадиноновые рецепторы кальциевых каналов, обладающие чувствительностью к кофеину. Это яркий пример влияния растительных БАВ на активацию функций животного организма. В случае «первичных мембран» такое влияние могли осуществлять окружающие химические вещества.

Строение молекулы димристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), в нашей работе выбранного в качестве вещества для получения липосом, позволяет сформировать бислоиные липосомы с небольшой кривизной мембраны [5]. Молекулы ДМФХ имеют форму цилиндра, с фосфатной головкой небольшого размера и двумя углеводородными цепями - остатками насыщенной миристиновой кислоты. Процесс приготовления мультиламелярных липосом представляет собой гидратирование тонких пленок фосфолипида, высушенных на твердой поверхности. Гидратирование происходит при интенсивном встряхивании в фосфатном буфере нейтрального pH при температуре выше фазового перехода фосфолипида из твердой гелевой фазы в фазу жидкого кристалла, т.е. бислои формируются в фазе жидкого кристалла. Образуются мультиламелярные липосомы диаметром около 1000 нм [5]. Подобные пребиотические кристаллические процессы могли происходить и при сольватации молекул, расположенных на твердой подложке в порах глин и минеральных отложений.

БАВ могут оказывать существенное влияние на липидный бислой, т.к. проникают ко всем бислоиным липосомам, формирующим мультислоиную большую липосому. Мембранотропные гидрофобные БАВ легко насытят первый бислой и через дефекты и перемычки между бислоями проникнут к следующим бислоям. Для гидрофильных БАВ возможность проникновения ко всем слоям в мультиламелярной липосоме возникает в риппл-фазе (рис. 1). При переходах твердой гелевой фазы в фазу жидкого кристалла одновременно сосуществуют микродомены гелевые и жидкие, поэтому образуются дефекты и короткоживущие гидрофильные нанопоры [2]. В случае «первичных мембран» такой путь воздействия химических факторов через дефекты и поры также мог осуществляться.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) в нашей работе определялась зависимость теплоемкости микродоменов липидов в суспензии мембран от температуры при постоянном давлении в зависимости от присутствия БАВ. Изменения параметров фазовых переходов липидов дают информацию о месте локализации вещества в бислой. Сдвиг температуры фазового перехода, свидетельствует о преимущественном взаимодействии БАВ с твердым или жидким состоянием мембраны. Понижение температуры главного фазового перехода в мембранах указывает на связывание БАВ в поверхностном слое мембраны, преимущественно с жидкой фазой. БАВ, сдвигающие температуру фазового перехода, увеличивают и ширину перехода, меняя кооперативность плавления микродоменов. В жидкой фазе легко происходят все конформационные перестройки белков, формирование олигомеров, флип-флоп липидов, латеральные перемещения. В твердой фазе все эти виды биологической подвижности затруднены, соответственно, и все структурные и функциональные активности заторможены. В состоянии жидкого кристалла и структура мембраны сохранена, и торможение всех конформационных процессов отсутствует. Поэтому исследование действия БАВ на термоиндуцированные переходы липидной фазы - важнейшее звено в цепи тестирования биологических эффектов. В нашем исследовании мы применяли БАВ, как гидрофильные, так и гидрофобные: мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил)фосфиновой кислоты) - гидрофильный предпосевной стимулятор роста растений [7], антиоксидант фенозан (-β-(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота) [8] и его производные: калиевая соль - гидрофильный феноксан, и гидрофобизованные - ИХФАНЫ. ИХФАНЫ - это сложноэфирные производные (метилокса) (3,5 дитрет бутил-4-гидроксибензилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов [9]. В случае «первичных мембран» присутствие заряженных и незаряженных химических веществ во внешней среде могло осуществлять разные пути воздействия на формирование или разрушение первичных структур.

Для того чтобы подробнее изучить действие растворов мелафена на структуру фосфолипидной мембраны ДМФХ методом ДСК, применили разную скорость подачи тепла (1 град. в мин.; 0,5 град. в мин.; 0,25 град. в мин.; 0,125 град. в мин.) к ячейкам с контрольным и опытным образцами. Такой подход используют для того, чтобы выявить возможные перестройки аддитивных кооперативных единиц в микродоменах мембраны. Кроме того, это способ моделирования сочетанного влияния химического вещества и температурных условий среды. По данным зарегистрированных термограмм при различных скоростях плавления мембран, были построены концентрационные зависимости максимальной температуры плавления, энтальпии и кооперативности перехода в широком диапазоне концентраций мелафена. Ярко выраженные экстремумы наблюдались в области концентраций мелафена 10^{-14} - 10^{-10} М при всех исследованных скоростях плавления. Водные растворы мелафена оказывают значительное действие на структуру липидного бислоя со сложной дозовой зависимостью. В больших концентрациях (10^{-4} - 10^{-6} М), в малых (10^{-13} - 10^{-14} М) и сверхмалых дозах (10^{-16} М) мелафен вызывает полимодальные изменения микродоменной структуры бислоев синтетического фосфолипида. Воздействия гидрофильного мелафена могут происходить только на поверхности каждого бислоя. По-видимому, мелафен

либо действует на свойства воды у поверхности бислоя, либо непосредственно оказывает влияние на фосфолипидные головки ДМФХ.

Второе гидрофильное примененное БАВ - феноксан (калиевая соль антиоксиданта фенозана). Фенозан и феноксан – адаптогены, но они не имеют определенной мишени в мембране, действуют во всей области поверхностных слоев биомембраны, как во внешнем, так и во внутреннем листке бислоя, по-видимому, проходя через дефекты биомембраны к внутренней поверхности бислоевой плазматической мембраны на примере эритроцитов [10]. На рисунке 2 (слева) показаны пути распределения БАВ в клетке. Гидрофильные БАВ, примененные в нашей работе, воздействовали по механизму А (рис. 2).

Влияние гидрофобных БАВ на структуру мультислойных липосом моделировали с применением гибридных антиоксидантов ИХФАНов. Они усиливают устойчивость биомембран к различным воздействиям, структурно укрепляя их в результате антиоксидантного воздействия, а также закрепляясь в области фосфолипидных головок с помощью заряда на четвертичном азоте и встраиваясь алкильных заместителей в бислой. В зависимости от концентраций (10^{-13} - 10^{-3} М) ИХФАНы могут укреплять структуру или вносить хаотропность в бислой. Было показано, что большие концентрации полностью разрушали микродоменную организацию ДМФХ бислоев - исчезал пик основного перехода, а малые - напротив укрепляли, повышая температуру плавления. ИХФАН-С16, обладающий самым длинным жирно-кислотным остатком, встраиваясь в средних концентрациях (10^{-5} - 10^{-6} М) в бислой, формировал собственную фазу с более высокой температурой фазового перехода и снижал кооперативность собственной фазы ДМФХ (рис. 2 справа).

Роль липидных микродоменов очень важна физиологически. Их структура может влиять на окружение интегральных и ассоциированных в клеточных мембранах рецепторов и ферментов, регулируя их функции. Обнаруженное формирование собственной фазы в мембранах указывает на вероятность встраивания и модификации мембран веществами, в молекулах которых имеются гидрофобные компоненты. При применении в малых и сверхмалых концентрациях водных эмульсий гидрофобных веществ, возможно накопление их в мембранах. Таким образом, на мембрану уже оказывает влияние не сверхмалое или малое количество вещества, а гораздо большее – увеличенное на несколько порядков. При накоплении, как мы видели в случае применения ИХФАНа С-16, вполне вероятно, также и формирование собственного домена БАВ. В этом случае существенное влияние будет оказано на функционирование встроенных в мембрану белковых молекул-каналов, ферментов, ионных насосов и обменников. И соответственно будет изменяться судьба клетки по механизму Б (рис. 2 справа).

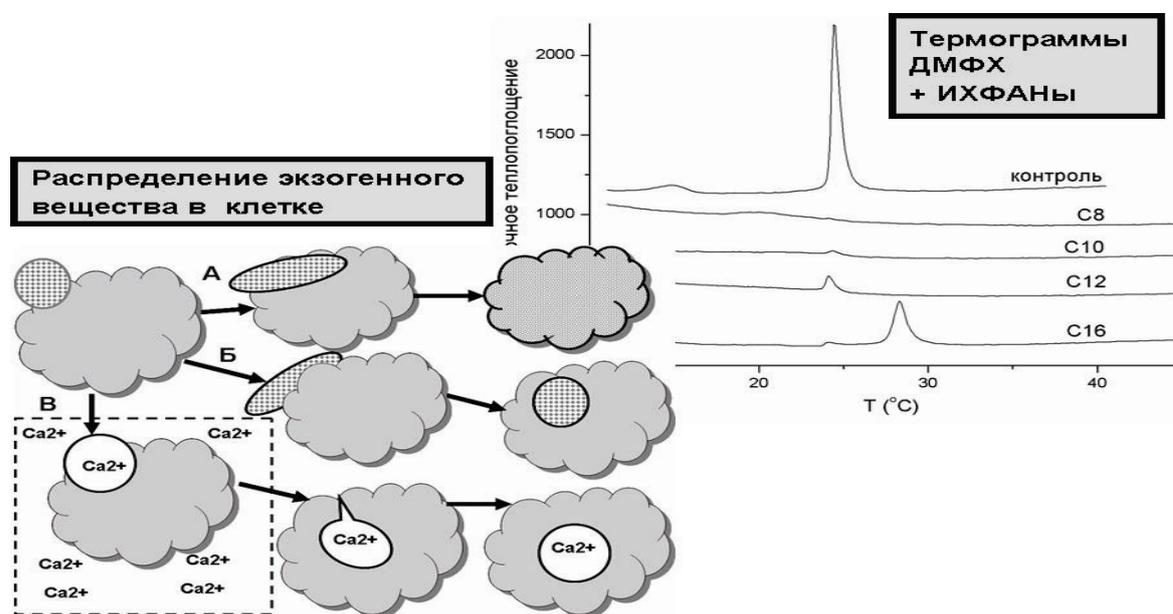


Рисунок 2. Справа: ДСК термограммы ДМФХ в присутствии ИХФАНов. Слева: три вида предполагаемых путей действия веществ из внешней среды (экзогенных веществ) на пред-биотическую «клетку». А – встраивание экзогенного вещества в клеточную оболочку и распределение во всей клеточной поверхности или внедрение во внутрь клетки и распределение во всем клеточном объеме; Б - встраивание экзогенного вещества в клеточную оболочку и локальное концентрирование в клеточной поверхности, или внедрение во внутрь клетки и локальное концентрирование в клеточном объеме; В - внедрение экзогенного вещества путем впячивания клеточной оболочки во внутрь клетки, образования вакуоли на ножке. Затем ножка прерывается и образуется отдельная вакуоль в клеточном объеме с локально сконцентрированным экзогенным веществом

В клетке в результате ее жизнедеятельности расположение мембран меняется, мембраны сближаются, удаляются, структура самой мембраны упорядочивается или становится разупорядоченной. Действие БАВ может не иметь определенной мишени и, тем не менее, значительно затрагивать все процессы, влияя на упорядоченность структуры на разных организационных уровнях от степени регулярности мембран и толщины бислоя до взаимного расположения бислоев. Как было показано методом рентгенодифракционного анализа – малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) [6] водные растворы мелафена в широком диапазоне концентраций не меняют размеры бислоевых мембран и их взаимное расположение (укладку) в мультислойных липосомах, состоящих из смеси природных липидов яичного лецитина. Однако фенозан и ИХФАН-10 значительно меняли значения среднего периода укладки мембран и толщины бислоев [11,12].

Итак, водные растворы мелафена доза-зависимо изменяют организацию микродоменов в единообразном бислое, не разрушая его. Феноксан и ИХФАНЫ перестраивают микродомены, а при больших концентрациях разрушают микродоменную организацию и даже могут сформировать собственную фазу. На следующем уровне организации структуры – порядке мультислоев в мультислойных природных липосомах, гидрофильный мелафен не подействовал. Феноксан и ИХФАН-10 разрыхлили структуру и увеличили расстояние между отдельными липосомами в мультислой. Следующим шагом в усложнении био-структур могло бы быть встраивание гидрофобных пептидных молекул в мембраны липосом, или же захватывание гидрофильных молекул во внутреннее пространство (рис. 2А, Б, В). Могут встраиваться и целые липосомы. При слиянии разных объектов модифицируется структура или формируется новая. Также могло происходить локальное искривление внешней мембраны с образованием впячивания во внутреннее пространство в виде капли на ножке. В результате прерывания ножки такие части внешней мембраны могли отсоединиться и образовать малые внутренние липосомы. Так внутри большой оболочки могли возникать и малые мембранные пузырьки, и вакуоли смешанного состава, как предшественники клеточных компартментов и органелл (рис. 2В). Изменения толщины бислоев и порядка их укладки может способствовать образованию впячивания клеточной оболочки во внутрь клетки и образованию вакуоли. В результате с помощью ДСК и МУРР рассмотрены все указанные пути судьбы клетки при воздействии экзогенных веществ. Отдельные вакуоли или сеть вакуолей в клеточном объеме с локально сконцентрированным экзогенным веществом могли быть предшественниками клеточных органелл и компартментов. Образование клеточных компартментов приводило к формированию ионных и электростатических градиентов, что могло уже способствовать появлению некоторых функций. В качестве примера можно привести вероятное образование саркоплазматического ретикулума. В составе мембран ретикулума есть компоненты, подобные таковым в плазматической мембране. Внутри, в люменальном пространстве, ретикулума содержится основной внутриклеточный запас ионов кальция. Причем значения концентрации ионов кальция внутри ретикулума и вне клетки совпадают (10^{-3} М). Вероятно, люмен ретикулума является продолжением внешней среды, замкнутой во внутреннем компартменте в результате локального впячивания внешней мембраны и отрезания этого локуса (рис. 2В).

При изучении действия БАВ на более сложных моделях было показано, что с появлением белковых компонентов в составе мембраны меняются как структурные свойства, так и появляются возможности для возникновения функций. Также появляются новые мишени для воздействия БАВ. В качестве экспериментального объекта со смешанным липид-белковым составом - для исследования влияния БАВ на белок-липидные взаимодействия в структуре мембран использовали тени эритроцитов и целые изолированные эритроциты. Конформационные перестройки белковых микродоменов в мембранах теней эритроцитов выявляли методом ДСК. Структурную организацию мембраны целого эритроцита с учетом и липидной, и белковой фазы исследовали, измеряя микровязкость мембраны.

Тени эритроцитов получают при осмотическом шоке изолированных эритроцитов. В гипосмотической среде мембраны эритроцитов повышают проницаемость для гемоглобина, и гемоглобин выходит из клетки. И далее, поддерживая холодовой температурный режим (4°C), без замерзания, с помощью центрифугирования получают бесцветный осадок мембран теней, легко суспендирующийся в фосфатном буфере [13]. Необходимо отметить, что тени эритроцитов являются адекватной моделью для изучения белок-липидных взаимодействий в клеточной мембране и в цитоскелете. Основные компоненты характерны для большинства клеток животного организма. Микрокалориметрическое исследование в изотонических условиях выявляет пять термоденатурационных структурных переходов белковых микродоменов в мембранах теней (рис. 3): $A-$, B_1- , B_2- , $C-$ и $D-$ переходы [14].

$A-$ переход обусловлен денатурацией домена цитоскелета, образованного комплексом $\alpha-$ и $\beta-$ спектрина и актина. Денатурация спектрин-актинового комплекса, приводящая к исчезновению $A-$ перехода, сопровождается полной потерей деформируемости эритроцитов и мембран теней. B_1- переход связан с денатурацией мембранного домена, образованного анкирином и белками полос 4.1, 4.2 и дематином. B_2- переход - с денатурацией цитоплазматического фрагмента белка полосы-3, $C-$ переход - с денатурацией мембранного фрагмента 55 кДа белка полосы-3, представляющего собой ионные каналы. $D-$ переход связан с неидентифицированными белками и везикуляцией мембраны. Как видно на термограммах (рис. 3) микродоменная структура теней значительно изменяется под действием ИХФАН-10 и несущественно под действием феноксана. При хранении теней – меняются термоденатурационные характеристики белковых микродоменов цитоскелета теней. ДСК теней в присутствии мелафена не выявило изменений амплитуды и температурного сдвига пиков переходов. Т.е. мелафен не оказывает значительного воздействия

непосредственно на белковые компоненты мембраны как в свежесыворотных телят, так и в состаренных. Необходимо отметить, что при патологии поврежденные (например, окисленные) эритроциты в кровотоке отсутствуют, так как фагоцитируются макрофагами. Поэтому все перестройки можно увидеть только в опытах *in vitro* (в пробирке). Метод ДСК совместно с полиакриламидным электрофорезом белков позволяет определить возникающие при патологиях изменения в клеточной оболочке и цитоскелете эритроцитов.

Вышеуказанные данные показали, как влияют гидрофильные и гидрофобные БАВ на компоненты клеточных мембран. Но мембраны модельные и изолированные биомембраны отличаются по своим свойствам от мембран, находящихся в составе целых клеток. Поэтому следующим исследованием влияния БАВ было тестирование их действия на свойства мембран (микровязкость) целых эритроцитов и клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) помощью ЭПР во времени вращательной корреляции включенных в мембрану спиновых зондов. Зонды: 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоил-оксиперидин-1-оксила и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксила, различаются по своим гидрофобным свойствам. 1-й локализуется в поверхностных областях липидной мембраны в области bulk-липидов на расстоянии 2-4 Å, а 2-й – в зоне приповерхностных анулярных липидов на глубине 6-8 Å от поверхности [15]. Микровязкость мембран клеток изменялась в присутствии, как гидрофильного мелафена, так и гидрофобного ИХФАН-10 [16,17]. Было показано, что водные растворы мелафена в очень высоких концентрациях существенно (до 25 %) действуют на липид-липидные взаимодействия в поверхностных областях мембран, а на липид-белковые взаимодействия в более глубоких областях мембран целых эритроцитов незначительно влияют (до 10 %) как очень большие, так и малые концентрации мелафена. ИХФАН в больших и сверх малых концентрациях увеличивал микровязкость мембран по всей толщине мембран и в эритроцитах, и в клетках АКЭ, встраиваясь жирнокислотными хвостами в бислои и закрепляясь положительным зарядом на четвертичном азоте среди фосфолипидных головок. Однако, средние концентрации резко снижали вязкость бислоя, что указывает на то, что такое БАВ, как ИХФАН может и укреплять клеточную оболочку, и разрыхлять ее. Таким образом, БАВ может влиять на функционирование мембраны и ее компонентов, встраиваясь в разных количествах и на разную глубину в бислой.

Выше указанные воздействия примененных БАВ на структурные параметры должны находить отражение и на жизнедеятельности клетки. Поэтому далее было прослежено влияние на некоторые функции целых клеток. Так функциональные изменения под действием водных растворов мелафена и эмульсий ИХФАН-10 регистрировали по гемолизу эритроцитов, спонтанному и индуцированному. Для тестирования применили модель гемолиза эритроцитов в гиперосмотической среде по сравнению со спонтанным гемолизом [18]. Такая модель отражает влияние мелафена на степень устойчивости мембраны к повреждающим факторам окружающей среды. Гемолиз при непосредственном добавлении к суспензии эритроцитов малых количеств водных растворов мелафена разных концентраций характеризует меру повреждения плазмолеммы исследуемым препаратом. Мелафен во всем диапазоне концентраций (10^{-13} - 10^{-3} М) не вызывает дополнительного гемолиза и не защищает от спонтанного гемолиза. Добавление ИХФАН-10 при концентрации 10^{-4} М вызывает полный гемолиз эритроцитов, что вызывает еще и выход ионов K^+ . При более низких концентрациях ИХФАН-10 мембрана, напротив укрепляется, и существенных потоков ионов калия не наблюдается. Т.е происходит нарушение целостности мембраны эритроцитов при высоких концентрациях ИХФАН-10 (10^{-5} - 10^{-4} М) при низких дозах (10^{-17} - 10^{-6} М) повреждающего действия нет. На этом примере хорошо прослеживается роль концентрационных флуктуаций БАВ в судьбе клетки.

Исследовали также сочетанное влияние БАВ и изменения условий окружающей среды. На примере гемолиза эритроцитов в гипо и гиперосмотической среде, что достигалось добавлением NaCl от 1 М до 4 М, мелафен ускорял разрушение мембраны при локальных неблагоприятных факторах среды [18]. Такая модель отражает влияние БАВ на степень устойчивости мембраны к повреждающим факторам окружающей среды. Как видно из данных (рис. 4), общая тенденция увеличения степени гемолиза эритроцитов при увеличении осмолярности среды усиливается в присутствии мелафена в диапазоне концентраций (10^{-7} - 10^{-5} М). Добавление мелафена в малых концентрациях 10^{-12} М и 10^{-11} М не меняло общей картины гемолиза эритроцитов спонтанного и индуцированного изменением ионной силы среды.

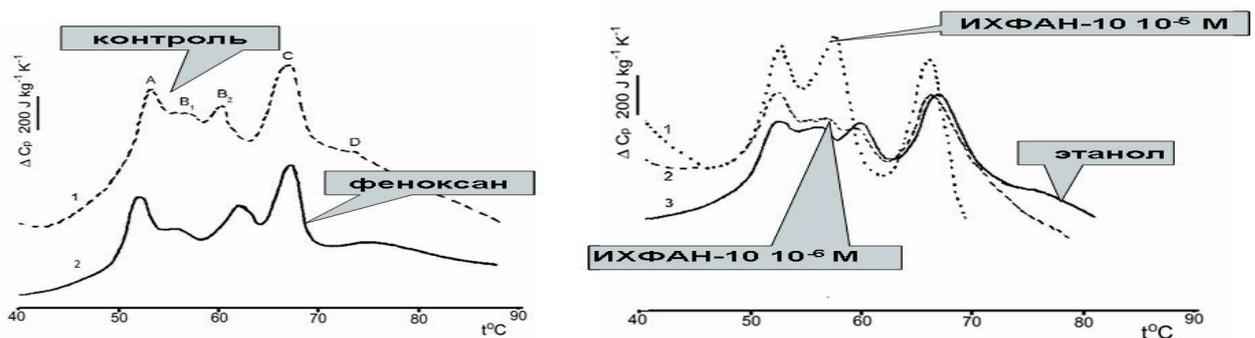


Рисунок 3. Влияние ИХФАН-10 и феноксана на термоиндуцированную денатурацию белковых доменов суспензии мембран телей эритроцитов

степень гемолиза сочетанное влияние мелафена и NaCl на гемолиз эритроцитов

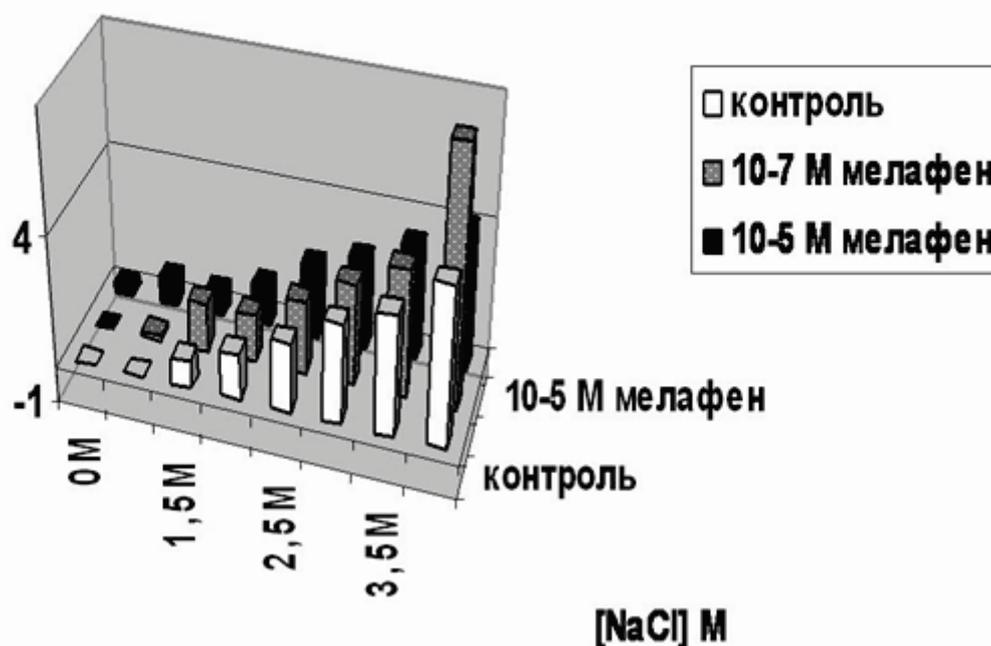


Рисунок 4. Влияние мелафена (10^{-5} М и 10^{-7} М) в зависимости от ионной силы (добавление NaCl 0 М; 1 М; 1,5 М; 2 М; 2,5 М; 3 М; 3,5 М; 4 М) среды на гемолиз эритроцитов

Полученные данные указывают на то, что БАВ одновременно с изменением окружающей среды, в данном случае – проявление осмотического стресса, может дополнительно воздействовать на такой важный параметр, как проницаемость клеточной оболочки.

Необходимо отметить, что фенозан и его производные - гидрофобные ИХФАНЫ, оказывают значительное действие, как на структуру мембран, сформированных из искусственного и природных фосфолипидов [9, 12], так и на природные белок-липидные мембраны - тени эритроцитов и эритроциты [16].

Мелафен влияет только на организацию лабильных структур – липосом, сформированных из индивидуального нейтрального фосфолипида ДМФХ [6] и на конформационные изменения бычьего сывороточного альбумина [19]. На более устойчивые структуры, такие, как липосомы, сформированные из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина [6], или же на тени эритроцитов мелафен не оказывает влияния [17]. Однако, структуры, которые уже сопряжены с функционированием клетки, меняются, что было показано для морфологии целых эритроцитов с помощью атомно-силовой микроскопии [20]. Это указывает на то, что, как био-подобные мембраны (мультиламеллярные липосомы, сформированные из ДМФХ или из яичного лецитина), так и био-мембраны подвержены воздействию активных веществ в зависимости от степени усложнения структуры. Так простейшие мембраны, состоящие из одинаковых молекул, оказались очень уязвимы для всех примененных БАВ. По мере усложнения структуры степень защищенности возрастала. Однако на функционирующие клетки все вещества уже оказывали влияние, как на структуру, так и на функцию. Это влияние в значительной степени зависело от концентрации действующего вещества. Можно предположить, что экзогенные БАВ могли действовать, как фактор эволюции для элиминации неустойчивых структур, или в результате встраивания, как фактор, укрепляющий существующие структуры, для появления новых образований.

Последним звеном было исследование влияния примененных БАВ на функционирование клеток. Было протестировано влияние на клеточные системы передачи сигнала. Так как эритроциты лишены полной системы передачи сигнала до внутриклеточных органелл, то были проведены исследования на клетках АКЭ [21]. Это адекватная модель – 7-8 сутки развития карциномы на поверхности клеток демаскированы метаболитные пуринорецепторы и работает вся система кальций-зависимой передачи сигнала. Так при активации Ca^{2+} -сигнальной системы добавками АТФ происходит набухание клеток и пропорционально изменяется интенсивность светорассеяния в суспензии клеток. Взаимодействие АТФ с пуринорецепторами на поверхности клетки приводит к повышению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} , активации Са-зависимых К каналов и Са-зависимых Сl каналов, изменяющих объем клеток. Общий клеточный ответ отражался в двухфазном изменении объема клетки, в первой фазе происходит освобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула, во второй – компенсаторный вход внеклеточного Ca^{2+} . Оказалось, что все примененные вещества изменяли

объем клеток. Зависимость величины первого ответа от концентрации ИХФАНов имеет доза-зависимый характер, а второго - бимодальный вид характерный для эффекта веществ, действующих в сверхмалых дозах. Ca^{2+} -сигнальная система клеток АКЭ подвергается угнетению ИХФАНами и фенозаном 10^{-7} - 10^{-5} М.

Мелафен в малых концентрациях 10^{-10} М начинает оказывать угнетающее действие на один из Ca^{2+} -сигнализацию при активации поверхностных пуринорецепторов. С увеличением концентрации эффект усиливается, и при 10^{-4} М ингибирование достигает 80 %, 10^{-3} М вызывает 100% - полное ингибирование всех фаз прохождения сигнала. Обнаруженное в присутствии мелафена угнетение Ca^{2+} -сигнализации в клетках АКЭ, являющихся клетками, трансформированными с неконтролируемым ростом, явилось дополнительным интересным фактом для дальнейших исследований. Трансформированные клетки ведут себя как одноклеточные, поэтому могли служить хорошей моделью первичных клеток с уже развитой системой передачи сигналов с поверхности клеток через рецепторы внутрь для регуляции метаболических путей. Таким образом, БАВ могут, влияя на сигнализацию в клетках (в нашем случае на кальциевую сигнализацию), менять жизнеспособность клеток в окружающей среде. Выступая, как эволюционный фактор или как фактор предбиологической эволюции, БАВ способствуют элиминированию неустойчивых структур. И могут вызывать модификации пре биотических структур при взаимодействии с внешним миром - миром окружающих химических веществ.

В заключении отметим, на моделях возможно проследить «эволюцию» воздействия внешней среды (активных веществ) на структуру и функции в био-подобных и биообъектах, что могло бы помочь анализу действия естественного отбора на ранних стадиях истории жизни. По мере усложнения био-подобного объекта усиливается и защищенность его структур от внешней среды. Но функции биообъекта остаются достаточно уязвимыми для БАВ, действующими из внешней среды. Концентрационные зависимости воздействия гидрофильного БАВ – мелафена, на термодинамические параметры липосом или микровязкость эритроцитов - полимодальные. Причины появления на кривых концентрационных зависимостей доза-эффект трех или двух экстремумов с молчачими зонами между ними неясны. Вероятно, водные растворы или водные эмульсии БАВ структурно варьируют в разных концентрационных диапазонах. Воздействие на экспериментальный объект зависит как от природы, так и от концентрации БАВ. В литературе описаны физико-химические характеристики растворов и эмульсий, указывающие, по мнению авторов, на формирование супрамолекулярных комплексов БАВ - вода [22, 23]. Предполагается, что эти комплексы воздействуют на биообъекты в растворах и эмульсиях БАВ в сверхнизких концентрациях. Однако существование супрамолекулярных комплексов «БАВ-вода» - дискуссионно, так как подобные физико-химические характеристики растворов могут отражать присутствие в растворах и эмульсиях газовых пузырьков [24, 25], свойства которых и меняют мицеллярные или растворенные БАВ и ионы, освобождающиеся при их диссоциации. Вероятно, механизм влияния БАВ на биообъекты можно объяснить, как непосредственным электростатическим или гидрофобным взаимодействием, так и тем, что воздействие БАВ может быть опосредовано водной средой, на свойства которой тем или иным образом влияет присутствие БАВ. Возможно, изменяется растворимость газов в окружающей водной среде, что действует на свойства мембраны. Таким образом, можно прийти к выводу, что БАВ не только саму клетку или ее компоненты могут изменять, но и окружающую среду: насыщение газами, образование газовых пузырьков, концентрирование ионов на их поверхности, формирование гидратных оболочек вокруг молекул, двойного электрического слоя около мембраны и т.п. И это также может служить фактором для естественного отбора.

Список литературы / References:

1. Chetverin A.V. Molecular colonies: a plausible form of compartmentalization in the RNA world. *Сборник тезисов Международной конференции «Проблема происхождения жизни» и ассоциированной с ней Молодежная научная школа «Молекулярные и клеточные основы ранней эволюции жизни», 22-26 сентября 2014, Москва, с. 8-9.* [Chetverin A.V. Molecular colonies: a plausible form of compartmentalization in the RNA world. Proceedings of the International conference «Problems of life origination» September 22-26 2014, Moscow, pp. 8-9]
2. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. *Липидные мембраны при фазовых превращениях.* Москва: Наука, 1992, 125 с. [Antonov V.F., Smirnova E.Yu., Shevchenko E.V. *Lipids membranes when phase transitions.* Moscow: Nauka, 1992, 125 p. (In Russ.)]
3. Wanunu M., Bhattacharya S., Xie Y., Tor Y., Aksimentiev A., Drndic M. Nanopore analysis of individual RNA/antibiotic complexes. *ACS Nano*, 2011, vol. 5, no. 12, pp. 9345-53.
4. Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill A.H., Jr., Murphy R.C., Raetz C.R., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spener F., van Meer G., VanNieuwenhze M.S., White S., Witztum J.L., Dennis E.A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.*, 2005, vol. 46, pp. 839-861.
5. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидрокверцитина) с мультламеллярными липосомами из димиристоилфосфатидилхолина. *Биофизика*, 2008, т. 53, № 1, с. 78-84. [Tarachovsky Yu.S., Vasilieva N.A., Egorochkin M.A., Kim Yu.A. Interrelationship of taxipholine (digidrokvercitine) with multilammellar liposomes formed from dimyristoilphosphatidylcholine. *Biophysics*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 78-84. (In Russ.)]
6. Алексеева О.М., Кривандин А.В., Шаталова О.В., Рыков В.А., Фаттахов С.Г., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. Исследование взаимодействия мелафена с фосфолипидными мембранами. *Доклады академии наук*, 2009, т. 427, № 6, с. 837-839. [Alekseeva O.M., Krivandin A.V., Shatalova O.V., Rykov V.A., Fattakhov S.G.,

- Burlakova E.B., Konovalov A.I. The Melafen-Lipid- interaction Determination in phospholipid membranes. *Reports of Russian Academy of Sciences*, 2009, vol. 427, no. 6, pp. 837-839. (In Russ.)]
7. Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафен) как регулятор роста и развития растений нового поколения. *Сборник докладов 13-ой Международной конференции по химии соединений фосфора*, Санкт-Петербург, 2002, с. 80. [Fattachov S.G., Reznik V.S., Konovalov A.I. Melamine salt of bis (hydroxymethyl) phosphinic acid (melaphene) as a new generation regulator of plant growth. *Proceedings of 13 International conference on chemistry of phosphorus compounds*, St. Petersburg, 2002, p. 80. (In Russ.)]
8. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. *Пространственно-затруднённые фенолы*. М.: Химия, 1972, 352 с. [Ershov V.V., Nikiforov G.A., Volod'kin A.A. *Space hampered phenols*. Moscow: Chemistry, 1972, 352 p. (in Russ.)]
9. 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. Сер. Биол.*, 1996, № 4, с. 508-512. [Gendel L.J., Kim L.V., Luneva O.G., Fedin V.A., 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, vol. 4, pp. 508-512. (In Russ.)]
10. Burlakova E.B., Molochkina E.M., Nikiforov G.A. Hybrid antioxidants. *Chemistry and Chemical Technology*, 2008, vol. 2, no. 3, pp. 163-171.
11. Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б., Кривандин А.В., Погорецкая И.Л. Влияние фенозана на структуру фосфолипидных мембран. *Нейрохимия*, 1996, т. 13, с. 128-132. [Archipova G.V., Burlakova, E.B., Krivandin, A.V., Pogoretskaya I.L. Phenosan-acid influence to phospholipid membrane. *Neurochemistry*, 1996, vol. 13, pp. 128-132. (In Russ.)]
12. Кривандин А.В., Фаткуллина Л.Д. Исследование встраивания антиоксиданта ИХФАН в липосомы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Химическая физика*, 2013, т. 32, № 5, с. 91-96. [Krivandin A.V., Fatkullina L.D. Investigation of antioxidant IHFAN incorporation to liposomes by method of small angle roentgen scattering. *Chemical physics*, 2013, vol. 32, no. 5, pp. 91-96. (In Russ.)]
13. Sato Y., Yamakose H., Suzuki Ya. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, vol. 16, no. 5, pp. 506-512.
14. Jackson W.M., Kostyla J., Nordin J.H., Brandts J.F. Calorimetric study of protein transitions in human erythrocyte ghosts. *Biochemistry*, 1973, vol. 12, pp. 3662-3667.
15. Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Исследования микровязкости и структурных переходов в липидах и белках клеточных мембран методом спиновых зондов. *Биофизика*, 1975, т. 20, № 5, с. 816-821. [Goloshchapov A.N., Burlakova E.B. Microviscosity definition and structural transitions into lipids and proteins of cell membranes by the method of spin probes. *Biophysics*, 1975, vol. 20, no. 5, pp. 816-821. (in Russ.)]
16. Векшина (Алексеева) О.М., Фаткуллина Л.Д., Ким Ю.А., Бурлакова Е.Б. Изменения структуры и функций мембран эритроцитов и клеток асцитной карциномы Эрлиха при действии гибридного антиоксиданта нового поколения ИХФАН-10. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2007, № 4, с. 402-406. [Vekshina (Alekseeva) O.M., Fatkullina L.D., Kim Yu.A., Burlakova E.B. Structural and functional changes of erythrocytes and cells of Erlich ascetic carcinoma under the actions of hybrid antioxidants of new generation IHFAN-10. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2007, no. 4, pp. 402-406. (In Russ.)]
17. Alekseeva O.M., Fatkullina L.D., Kim Yu.A., Zaikov G.E. The melafen influence to the erythrocyte's proteins and lipids. *Вестник Казанского технологического Университета*, 2014, т. 17, вып. 9, с. 176-181. [Alekseeva O.M., Fatkullina L.D., Kim Yu.A., Zaikov G.E. The melafen influence to the erythrocyte's proteins and lipids. *Digest of Kazan Technology University*, vol. 17, iss. 9, pp. 176-181. (In Russ.)]
18. Ким Ю.А., Елемесов Р.Е., Акоев В.Р. Гиперосмотический гемолитический эритроцитов и антигемолитическая активность фракции сапонинов и тритерпеновых гликозидов из Panax Ginseng С.А. Мейер. *Биологические мембраны*, 2000, т. 17, № 2, с. 15-26. [Kim Yu.A., Elemesov R.E., Akoev V.R. Hyper osmotic hemolysis of erythrocytes and antihemolytic activity of saponins faction and triterpens glycosides from Panax Ginseng С.А. Meyer. *Biological Membrane*, 2000, vol. 17, no. 2, pp. 15-26. (In Russ.)]
19. Alekseeva O.M., Kim Yu.A., Zaikov G.E. The interactions melafen and ihfans with animal's soluble protein. *Вестник Казанского технологического Университета*, 2014, т. 17, вып. 7, с. 167-170. [Alekseeva O.M., Kim Yu.A., Zaikov G.E. The interactions melafen and ihfans with animal's soluble protein. *Digest of Kazan Technology University*, vol. 17, iss. 7, pp. 167-170. (In Russ.)]
20. Бинюков В.И., Алексеева О.М., Миль Е.М., Албантова А.А., Фаттахов С.Г., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. Изучение влияния фенозана, ИХФАН-10 и мелафена на эритроциты in vivo методом АСМ. *ДАН. Сер. Биол.*, 2011, т. 441, № 1, с. 114-117. [Binukov V.I., Alekseeva O.M., Mill. E.M., Albantova A.A., Fattachov S.G., Konovalov A.I. Investigation of phenosan, IHFAN-10 and melafen influences to erythrocytes in vivo by AFM method. *Reports of Russian Academy of Science. Series. Biol.*, 2011, vol. 441, no. 1, pp. 114-117. (In Russ.)]
21. Alekseeva O.M. Melafen - Plant Growth Regulator and Pathways of cells. *Polymers Research Journal*, 2013, vol. 7, no. 1, pp. 117-128.
22. Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Тимошева А.П., Шагидуллин Р.Р., Чернова А.В., Аввакумова Ж.Б., Фаттахов С.Г., Коновалов А.И. Супрамолекулярные структуры на базе гидрофильного производного меламина

и бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафен) и поверхностно активные вещества. Структура и самоассоциация Мелафена в воде и хлороформе. *Известия академии наук. Сер. Биол.*, 2008, № 6, с. 1207-1214. [Ryshkina I.S., Murtasina L.I., Timosheva A.P., Shagidullin R.R., Chernova A.V., Avvakumova G.B., Fattakhov S.G., Kononov A.I. Supramolecular structures at bases of hydrophilic derivatives of melamine and bis(oximethyl)phosphinic acid (Melafen) and detergents. Structure and selfassociation of Melafen in water and chloroform. *News of Russian Academy of Science. Series. Biol.*, 2008, no. 6, pp. 1207-1214. (In Russ.)]

23. Рыжкина 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. *ДАН. Сер. Биол.*, 2009, т. 428, № 4, с. 487-491. [Ryshkina I.S., Murtasina L.I., Kiseleva Yu.V., Mangukova D.P., Timosheva A.P., Palmina N.P., Kononov A.I. Properties of supramolecular associates, formed at water solutions at low and super low concentrations of biological active substances. *Reports of Russian Academy of Science. Series. Biol.*, 2009, vol. 428, no. 4, pp. 487-491. (in Russ.)]

24. Гаврилов Л.Р. *Физические основы процессов ультразвуковой технологии*. М.: Наука, ред. Л.Д. Розенберг, 1970, с. 395-426. [Gavrilov L.R. *Physical bases of ultrasonic technology*. Moscow: Nauka, ed. L.D. Rosenberg, 1970, pp. 395-426. (In Russ.)]

25. Сиротюк М.Г. Влияние температуры и газосодержания жидкости на кавитационные процессы. *Акустич. Журнал*, 1966, т. 12, № 1, с. 87-92. [Sirotuk M.G. Influence of liquids temperature and gas composition on cavitation process. *Acoustic Journal*, 1966, vol. 12, no. 1, pp. 87-92. (In Russ.)]

THE ACTIONS OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES TO EXPERIMENTAL MODELS OF FIRST LIVING OBJECTS

Alekseeva O.M.¹, Kremetsova A.V.¹, Krivandin A.V.¹, Shatalova O.V.¹, Kim Yu.A.²

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: olgavek@yandex.ru

²Institute of Cell Biophysics, RAS

Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, Russia.

Abstract. The re-understand of the probabilistic possibilities of creating pre-biotic and biotic processes, resulting in initiation, further development and adaptation to environment of predecessors of living subjects are presented at this work. For these purposes the certain data were obtained, when studying the actions of biologically active substance (BAS) with engagement of modern experimental models and bio-objects. The experimental objects used consistently as of complicating of their structural properties and respectively of emergence of functional properties. The liposomes, which are formed, from artificial individual phospholipid, and from mixture of nature phospholipids, were used as the experimental objects for structural studies of lipid-lipid interactions. To identify of structural rearrangements, which involved of the protein-lipid interactions, the erythrocyte ghost and the insulated erythrocytes were used. The investigations of BAS influences on cells functioning were provided with study of calcium signalizations ways of the transformed with uncontrolled growth cells of ascetic Ehrlich carcinoma, and of the normal cells - thymocytes and lymphocytes. For inspection of actions of BAS as the modifiers of structures and functions of model and bio-objects, we used hydrophilic substances: the plant growth regulator melafen, the antioxidant phenoksan, and the hydrophobe antioxidants - IHFANs. So has managed to trace influence BAS, as probable factors of natural selection of different nature on increasingly becoming complicated on its organization the objects, simulating the development stages at an earlier stages of life-history. BAS may be regarded, as the factors of evolution. BAS may be factors for elimination of instable structures. And BAS may be also as strong factors for emergence of new subjects or updating of existence subjects due to BAS incorporating to its structures. The obtained data could help also to performance analysis of predecessors of modern cellular structures.

Key words: *membranes; erythrocyte; biologically active substances; differential scanning microcalorimetry; hemolysis.*