

МОДЕЛЬНЫЕ МЕМБРАННЫЕ ОБЪЕКТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЕЙСТВИЯ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

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

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

² Институт биофизики клетки РАН, ФБГУН «ФИЦ «Пушкинский
научный центр биологических исследований РАН»
г. Пущино, РФ

Поступила в редакцию: 21.07.2019

Аннотация. Для оценки воздействия биологически активных веществ (БАВ) использовали последовательный ряд экспериментальных объектов: модельные – мультиламеллярные фосфолипидные липосомы (ФМЛ), сформированные из синтетического индивидуального фосфолипида димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), и из смеси природных фосфолипидов яичного лецитина; органеллы – фрагментированный саркоплазматический ретикулум (ФСР) и тени эритроцитов (плазматическая мембрана с цитоскелетом); клетки – эритроциты и клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). В качестве БАВ применяли экзогенные вещества: мелафен, кофеин и его аналоги и антагонисты, фенозан и его производные, и эндогенные вещества – свободные жирные кислоты (СЖК), сывороточный альбумин, АТФ и соли магния и кальция. Регистрацию ответов экспериментальных объектов при воздействии БАВ проводили методами ДСК, малоуглового рентгеновского светорассеяния (МУРР), первичного светорассеяния под прямым углом в видимой области, методами потенциометрии. Определили методом ДСК концентрационные границы применения феноксана (10^{-5} М) и ИХФАНов (10^{-6} М) без деструкции микродоменной организации бислоев ФМЛ, сформированных из ДМФХ. Мелафен в широком диапазоне концентраций не нарушает структуру таких ФМЛ, но вызывает изменения термодинамических параметров плавления. ИХФАН-10 и феноксан изменяют параметры термоиндуцированной денатурации белковых микродоменов теней эритроцитов, мелафен не влияет. Методом МУРР показали отсутствие влияния мелафена в широком диапазоне концентраций на толщины бислоев и порядок упаковки в ФМЛ из природных фосфолипидов. Методом потенциометрии определили концентрационно-зависимое воздействие Mg^{2+} на активность Ca^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} -канала в зависимости от присутствия СЖК в мембранах ФСР. СЖК и Mg^{2+} усиливают эффект активатора Ca^{2+} -канала – кофеина. Экстракция СЖК из ФСР сывороточным альбумином снижает эффект кофеина. Методом первичного светорассеяния показали угнетение мелафеном и феноксаном пуриновой зависимости Ca^{2+} -сигнализации в клетках АКЭ. Сделан вывод о возможности использования примененных методов и объектов для тестирования веществ с целью выявления биологической активности.

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

Список сокращений: биологически активные вещества – БАВ; димиристоилфосфатидилхолин – ДМФХ; дифференциальная сканирующая микрокалориметрия – ДСК; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; фосфолипидные мультиламеллярные липосомы – ФМЛ; свободные жирные кислоты – СЖК; сывороточный альбумин человека – САЧ; клетки асцитной карциномы Эрлиха – АКЭ; саркоплазматический ретикулум – СР; фрагменты саркоплазматического ретикулума – ФСР.

Экспериментальными объектами в настоящей работе были мембранные объекты разного организационного уровня. Это позволило получить зависимости воздействия экзогенных биологически активных веществ как от их концентрации в водных растворах и в мицеллярных суспензиях, так и от участия эндогенных факторов в условиях экспериментов. Водные растворы мелафена (регулятора роста растений), феноксана – калиевой соли антиоксиданта фенозана, водные суспензии кофеина и его аналогов, водно-этанольные суспензии гидрофобизованных производных фенозана – гибридных антиоксидантов ИХФАНов (потенциальных нейрорепротекторов), применяли в широком диапазоне концентраций, как больших, так и малых и сверхмалых. На рисунке 1 представлены структурные формулы примененных экзогенных веществ. Мелафен, фенозан, феноксан, ИХФАНы – синтетические вещества, созданные в ИОФХ им Арбузова РАН (Казань) и в ИБХФ РАН (Москва) [1-3]. Природные вещества: кофеин и его аналоги теофиллин и теобромин – метилксантины из группы органических соединений - метильных производных ксантина (3,7-дигидропури-2,6-диона). Эти алкалоиды, широко распространенные в растениях, являются известными пищевыми и фармакологическими регуляторами физиологически важных процессов. Помимо перечисленных экзогенных веществ в условиях экспериментов применялись эндогенные вещества, характерные для объектов животного происхождения: свободные жирные кислоты (СЖК), сывороточный альбумин человека (САЧ), неорганические соли Mg^{2+} и Ca^{2+} .

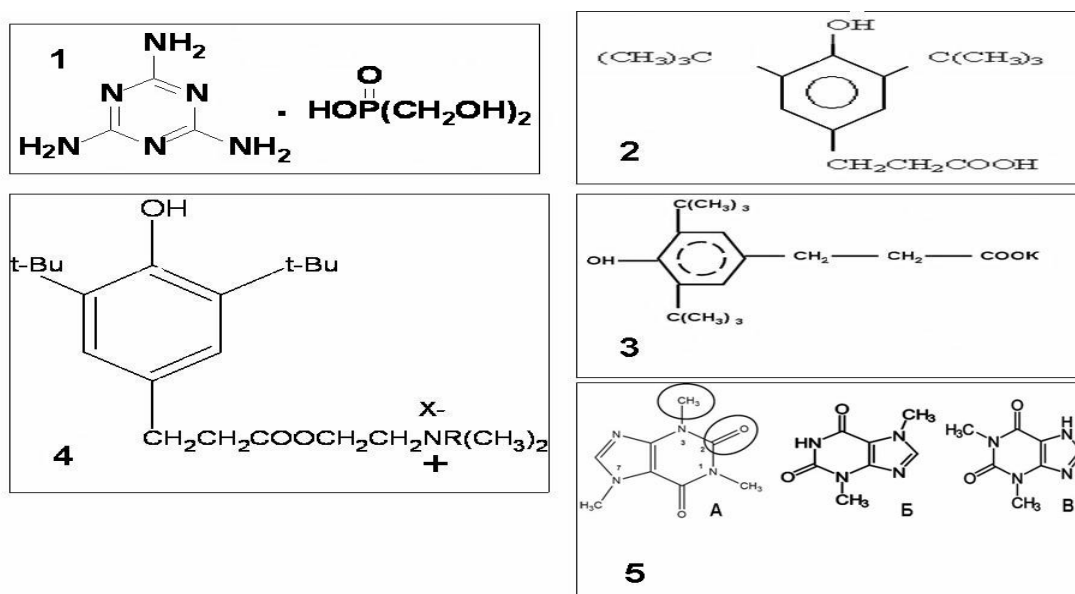


Рисунок 1. Структурные формулы примененных биологически активных веществ. **1.** Мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил)-фосфиновой кислоты); **2.** Фенозан (β -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионовая кислота); **3.** Феноксан (β -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил) пропионат калия); **4.** ИХФАНЫ сложноэфирные производные (метилокса) (3,5 дитрет бутил -4-гидроксифенилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов. Где (C8) R = C₈H₁₇; (C10) R = C₁₀H₂₁; (C12) R = C₁₂H₂₅; (C16) R = C₁₆H₃₃; X = Br-; **5.** Метилксантины (А) – кофеин (1,3,7-триметилксантин); (Б) – теобромин (3,7-диметилксантин); (В) – теофиллин (1,3-диметилксантин)

Выбор последовательного ряда мембранных объектов животного происхождения обусловлен необходимостью уточнения основных мишеней для воздействия БАВ. Исследования на объектах разного организационного уровня позволяют увидеть эффект при действии БАВ на структуру и функции компонентов мембран. На рисунке 2 представлены схемы экспериментальных объектов: 1 – фосфолипидные мультиламеллярные липосомы (ФМЛ) с окружающими гидрофобными и гидрофильными веществами; 2 – тень эритроцита с указанными белковыми компонентами плазматической мембраны – оболочки эритроцита, и внутриклеточного цитоскелета; 3 – электронная микроскопия везикул трех фракций ФСР, полученных при дифференциальном центрифугировании; 4 – схема сократительного аппарата и саркоплазматического ретикулума в скелетно-мышечном волокне.

Необходимо отметить, что ФМЛ имеют многослойную структуру, состоящую из замкнутых бислоев липосом, убывающих по размеру и вложенных друг в друга. Такая структура характерна для ФМЛ, сформированных, как из синтетического индивидуального фосфолипида ДМФХ, так и из смеси природных фосфолипидов – яичного лецитина [4, 5]. ДМФХ – нейтральный фосфолипид. Его молекулы имеют цилиндрическую форму. Смесь природных фосфолипидов яичного лецитина в основном представлена фосфодитилхолином, фосфатидилэтаноломином, и в малых количествах фосфатидилинозитолом и сфингохолином. Липиды имеют разные заряды и форму молекул, поэтому образуют устойчивый бислой, выровненный по зарядам и пространственно подходящим друг к другу молекулам. В состав молекул фосфолипидов входят полярные группы: холин, этаноламин, инозит, и жирнокислотные остатки разной величины и степени насыщенности. Эти фосфолипиды содержатся во всех мембранах клеток животного происхождения, составляя основу структурного обеспечения целостности мембран, а также и функционального обеспечения деятельности мембранных компонентов. Функционирование мембранных белков: рецепторов, каналов, ионных обменников, насосов и ферментов, регулируется составом липидного окружения. Белки преимущественно взаимодействуют с цвиттерионным фосфатидилхолином – электронейтральной молекулой, имеющей и положительный и отрицательный заряды. Жидкость липидной фазы определяет конформационные флуктуации белков, необходимые для функционирования. Толщина мембраны, определяющаяся длиной жирнокислотных цепей и величиной фосфолипидных головок в молекулах фосфолипидов, контролирует работу встроенных в мембрану белков. Ca²⁺-АТФазы из семьи SERCA меняют сродство к лигандам в зависимости от толщины мембраны. Заглубление или выход на поверхность мембранных петель с лиганд-связывающими центрами регулируют активность работы этого Ca²⁺-насоса. Ca²⁺-АТРаза саркоплазматического ретикулума (основного Ca²⁺-депо в мышечной клетке) окружена фосфатидилэтаноломином с конической формой молекулы. Это позволяет липиду образовывать гексагональную фазу, что важно при фрагментации мембран. Также фосфатидилэтаноломином окружены и внедряющиеся ассоциированные G-белки [6], участвующие в метаботропных сигнальных путях – проводящие сигналы от рецепторов с внешней поверхности плазмалеммы к цитоплазматическим ферментам.

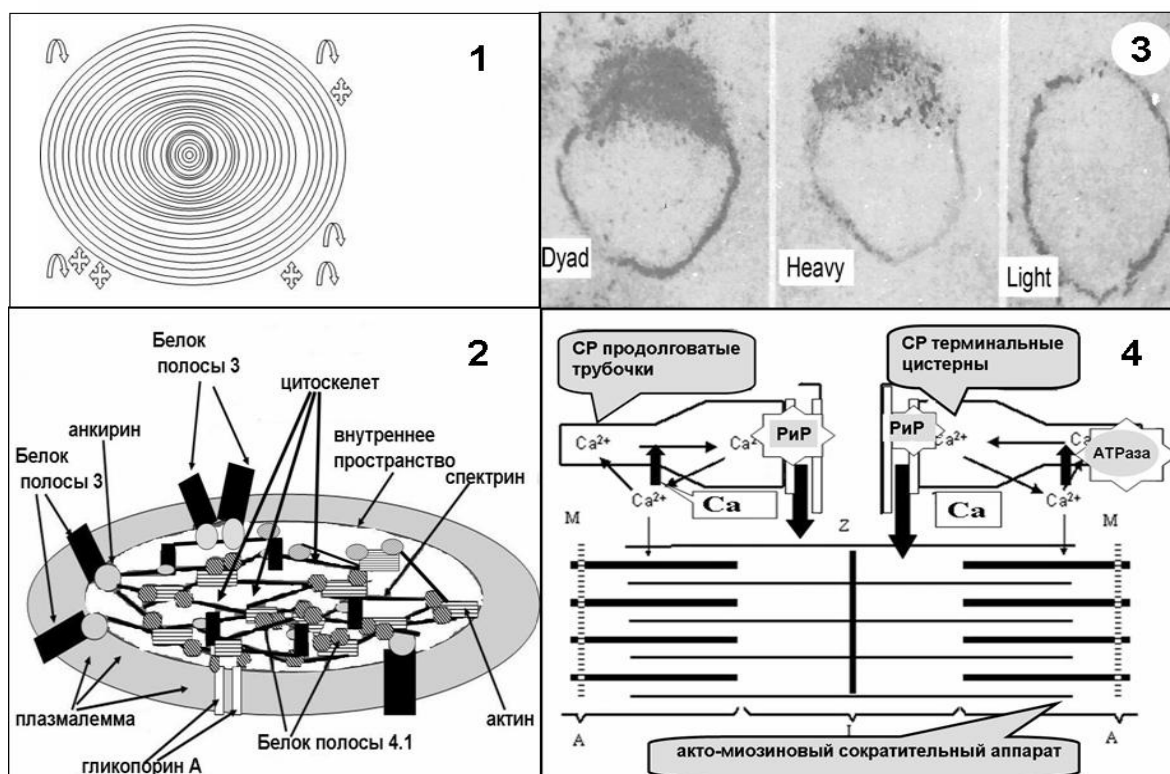


Рисунок 2. Объекты для исследования воздействия БАВ. 1. Схематическое изображение ФМЛ; 2. Тень эритроцита; 3. Электронная микроскопия везикул трех фракций ФСР, полученных при дифференциальном центрифугировании. (Dyad) – ФСРтц, полученные из терминальных цистерн, приближенных к Т-трубочкам, со значительными остатками материала Т-трубочек; (Heavy) – ФСРтц, полученные из терминальных цистерн; (Light) – ФСРпт, полученные из продолговатых трубочек [10]; 4. Схема расположения акто-миозинового сократительного аппарата с окружающими его отделами СР – продолговатыми трубочками и терминальными цистернами, указаны РнР и АТРаза, встроенные в мембраны СР и регулирующие потоки Ca^{2+}

ФМЛ, сформированные из индивидуального ДМФХ, использовались для экспериментов, проводимых методом ДСК, ФМЛ из яичного лецитина – только для измерений методом МУРР. Получали ФМЛ из ДМФХ или из яичного лецитина следующим образом. При гидратации тонких высушенных под аргоном пленок фосфолипида, растворенного в хлороформе, при интенсивном встряхивании в водной среде фосфатного буфера (рН 7,2), при температуре выше фазового перехода образуются ФМЛ. Концентрированная взвесь ФМЛ хранится при температуре 4-10 град. С°, перед ДСК измерениями разводится фосфатным буфером. К образцам 0,9 мл разбавленной суспензии ФМЛ добавляется 0,1 мл тестируемого вещества. Перед МУРР измерениями, напротив образцы концентрировались при центрифугировании. Водные растворы гидрофильных мелафена и феноксана и суспензии гидрофобного ИХФАНов готовились из концентрированных водных или этанольных растворов путем последовательного разбавления при интенсивном перемешивании с помощью «Vortex».

Отметим также, что проникновение гидрофобного вещества во всю структуру многослойных ФМЛ происходит по механизмам, характерным для мембранотропных веществ. Но гидрофильные вещества также проникали во всю толщу ФМЛ из-за образования при изменении температуры короткоживущих наноразмерных пор [7].

При ДСК плавлении ДМФХ в структуре ФМЛ виден только 1 ярко выраженный пик основного термоиндуцированного перехода при всех добавках фенозана или мелафена. И в зависимости от концентрации добавленного вещества изменяются параметры перехода. Однако кардинально большого уширения пика основного перехода не происходит. Это указывает на то, что плавление всей толщи ФМЛ происходит по механизму кооперативного изменения фазового состояния бислоя.

Следующий модельный объект, представленный на рисунке 2, – это тень эритроцита. Суспензию теней эритроцитов получали при осмотическом шоке изолированных из крови эритроцитов и последующем отмывании теней от высвободившегося гемоглобина при дифференциальном центрифугировании. Поддерживали холодовой режим 4°C [8, 9]. При ДСК тестировании действия гидрофобного ИХФАН-10, это вещество добавляли в процессе получения теней эритроцитов, мелафен и феноксан добавляли непосредственно перед ДСК измерениями.

Фрагменты органелл скелетно мышечных клеток также представлены на рисунке 2, На фотографиях электронной микроскопии везикулы трех фракций ФСР, полученные из разных отделов ретикулума при дифференциальном центрифугировании. Видны 2 типа фрагментов терминальных цистерн – везикулы ФСР с

электронно-плотным материалом ассоциированных фрагментов Т-трубочек и с ассоциированными фрагментами плазматической мембраны, и ФСР свободные от остатков других мембран - фрагменты продолговатых трубочек [10]. Взаимное расположение этих компонентов скелетно мышечного волокна отражено на схеме сократительного аппарата и саркоплазматического ретикулума. Указаны Ca^{2+} -АТРаза и рианодинновый рецептор (РиР). РиР освобождает из ретикулума ионы Ca^{2+} в цитоплазму клетки, Ca^{2+} -АТРаза выполняет функцию Ca^{2+} -насоса, закачивающего ионы Ca^{2+} во внутреннее пространство ретикулума. При этом происходит цикл сокращения-расслабления акто-миозинового комплекса. Радиографическим методом показано, что ионы Ca^{2+} закаченные Ca^{2+} -насосом продолговатых трубочек СР проходят в терминальные цистерны, где сохраняются до освобождения через Ca^{2+} -каналы [11]. На препаратах ФСР изучали влияние БАВ на функционирование Ca^{2+} -АТРаза и РиР. Методом рН-метрии измеряли закисление экспериментальной среды при гидролизе АТФ, сопряженном с закачиванием ионов Ca^{2+} в люменальное пространство ретикулума. Основным действующим веществом для исследования функционирования ФСР был метилксантин кофеин. Для кофеина издавна на мышечных препаратах было показано, что он вызывает контрактуру, подобную естественной контрактуре [12]. Известно, что основной мишенью является РиР, также определены центры взаимодействия с кофеином [13]. Показано, что ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} в значительной степени регулируют работу, как Ca^{2+} -АТРаза, так и РиР [14, 15]. Взаимодействие Ca^{2+} -АТРаза и РиР регулируется градиентом и перемещениями ионов Ca^{2+} в отделах ретикулума [16].

На рисунке 2 не показаны последующие экспериментальные объекты – изолированные клетки: эритроциты и клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). На этих объектах было протестировано влияние феноксана, мелафена и ИХФАН-10 на каналные функции мембран.

Наиболее простыми и удобными в приготовлении и хранении экспериментальными объектами являются фосфолипидные липосомы. Методом ДСК были определены термоиндуцированные параметры плавления ДМФХ в присутствии мелафена, феноксана в широком диапазоне концентраций и ИХФАН-10 в средних концентрациях. Также методом ДСК были определены изменения в организации белковых микродоменов в телях эритроцитов при действии феноксана, мелафена и ИХФАН-10. Было обнаружено, что мелафен не меняет организацию белковых микродоменов в телях эритроцитов, ИХФАН и феноксан в зависимости от концентрации значительно меняли, как температуру максимума основного термоиндуцированного перехода, так и состав микродоменов. ИХФАН-10 вызывал слияние пиков переходов микродоменов. Напротив, ДСК измерения, проведенные на менее устойчивых экспериментальных объектах – ФМЛ, показали, что мелафен в широком диапазоне концентраций значительно менял организацию фосфолипидных микродоменов в условиях различных скоростей плавления. Феноксан и ИХФАН-10 в больших концентрациях вызывали исчезновение пика основного перехода. Данные представлены на рисунке 3.

Методом малоуглового рентгеновского светорассеяния (МУРР) показали отсутствие влияния мелафена в широком диапазоне концентраций (10^{-21} М, 10^{-18} М, 10^{-12} М, 10^{-6} М) на структурные параметры ФМЛ,

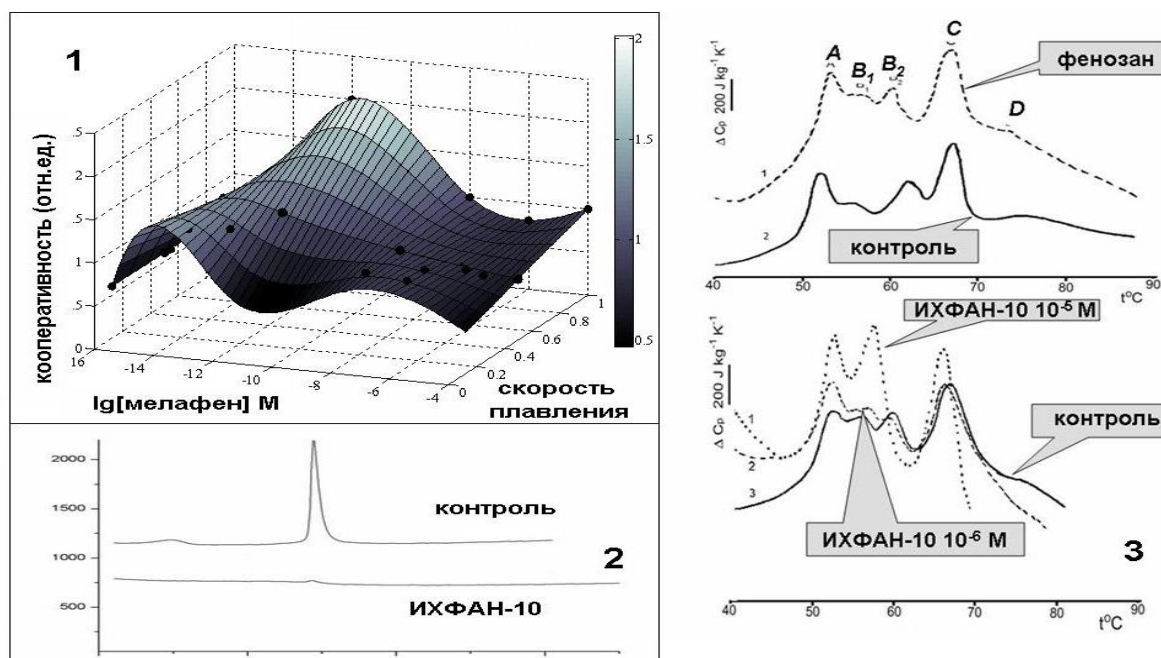


Рисунок 3. Влияние мелафена, феноксана и ИХФАН-10 на термодинамические параметры ФМЛ, сформированных из ДМФХ, и телей эритроцитов. **1.** График зависимости кооперативности основного термоиндуцированного перехода ДМФХ от концентрации мелафена и скоростей плавления. **2.** ДСК термограммы плавления ДМФХ в контроле и в присутствии ИХФАН-10 (10^{-6} М). **3.** Кинетические кривые термоденатурации белковых микродоменов телей эритроцитов в присутствии феноксана и ИХФАН-10

сформированных из природных фосфолипидов яичного лецитина. Все полученные дифрактограммы были подобны контрольным. Присутствие растворов мелафена не оказало воздействия на порядок упаковки бислоев и толщины бислоев в ФМЛ, сформированных из смеси природных фосфолипидов (данные на рисунке не представлены). Были получены данные о толщине бислоев и порядке их упаковки в составе ФМЛ с расстояниями между бислоями, равными, соответственно, 4 нм и 6,9 нм.

Следующим экспериментальным объектом были внутриклеточные органеллы - саркоплазматический ретикулум (СР), являющийся основным Ca^{2+} -депо в смешанных скелетных мышцах теплокровных животных. Фракции фрагментированного СР (ФСР), представляющие собой фрагменты продолговатых трубочек и терминальных цистерн, сохраняют все характерные свойства этих отделов СР. Поэтому являются простыми в получении и хранении объектами. Основным эффектом воздействия на ФСР в нашей работе был метилксантин кофеин. Аналоги кофеина – теобромин, теofilлин, вызывают освобождение ионов Ca^{2+} по такому же механизму, как и кофеин. Они обладают такими же действующими группами, как и кофеин. Поэтому встраиваются в молекулу рианодинного рецептора (РиР), вызывая открывание Ca^{2+} -канала.

На рисунке 4 представлены данные о влиянии кофеина и блокаторов эффекта кофеина: прокаина, тетракаина и рутениевого красного на эффективность аккумуляции ионов Ca^{2+} фрагментами СР – двумя фракциями ретикулума.

Видно, что кофеин значительно снижает эффективность аккумуляции ионов Ca^{2+} . Кривая закисления среды не выходит на плато, так как АТФ-аза продолжает закачивать ионы Ca^{2+} во внутренне пространство ретикулума, а кофеин в то же время постоянно открывает Ca^{2+} -канал рианодинного рецептора, и Ca^{2+} выходит из ретикулума. АТФ-аза, работа, которой регулируется концентрацией Ca^{2+} внутри ретикулума и снаружи, не блокируется низкими концентрациями ионов Ca^{2+} внутри ФСР. Однако, при добавлении блокаторов освобождения ионов Ca^{2+} , инициированного кофеином, кинетические кривые гидролиза АТФ (закисления среды измерения) приобретают вид контрольных. Так было показано сопрягающее действие мидокалма, это фармакологически активное вещество также останавливало проявление эффекта кофеина.

Однако, помимо выяснения роли экзогенных БАВ в процессах функционирования Ca^{2+} -депо СР, необходимо было исследовать роль эндогенных факторов. Для этого провели, как насыщение мембран ФСР свободной жирной кислотой (СЖК), так и удаление СЖК, имеющихся в мембранах ретикулума. Это удаление проводили в результате инкубации ФСР с сывороточным альбумином человека (САЧ), освобожденным от лигандов. Было

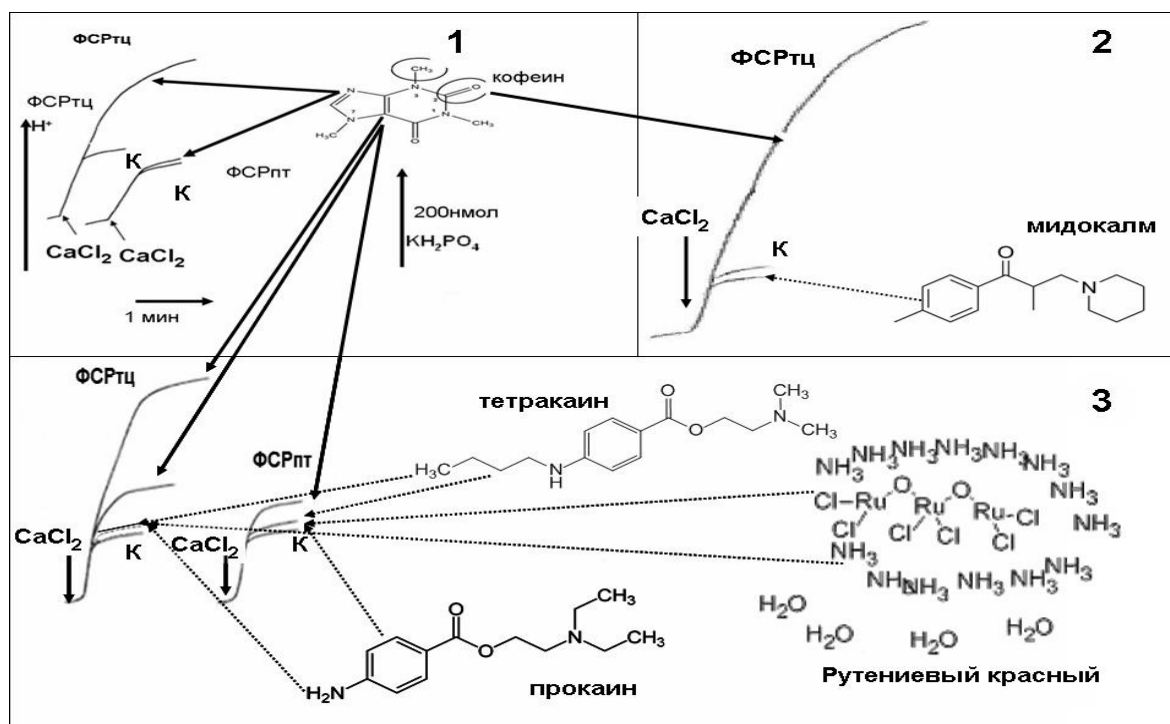


Рисунок 4. Кинетические кривые закисления экспериментальной среды при гидролизе АТФ фрагментами СР. 1. Влияние 5 мМ кофеина на ФСРтц и ФСРпт. Отмечены значимые для проявления эффекта кофеина и его аналогов на освобождение Ca^{2+} из ФСРтц боковые группы –карбонильная в положении 2 и метильная в положении 3. 2. Влияние на ФСРтц 5 мМ кофеина; 5 мМ кофеина + 10 мМ мидокалма. 3. Влияние на ФСРтц и ФСРпт 10 мМ кофеина; 5 мМ кофеина + 0,2 мМ тетракаина; -5 мМ кофеина + 3мкМ рутениевого красного; -5 мМ кофеина + 10 мМ прокаина. Обозначения: воздействие кофеина указано сплошными стрелками; воздействие блокаторов эффекта кофеина – пунктирными стрелками; контрольные кинетики – буквой К; инициирование АТФ-азной реакции расщепления АТФ и закачивания ионов Ca^{2+} – стрелками и CaCl_2

обнаружено, что значительно повышается пассивная проницаемость мембран ФСР для ионов Ca^{2+} , поддержание градиента Ca^{2+} через мембрану ФСР снижается, что увеличивает эффект кофеина на ФСР и снижает эффективность транспорта ионов Ca^{2+} . Напротив, экстракция СЖК приводила к улучшению эффективности аккумуляции Ca^{2+} . Эффекты контролировались изменениями концентрации ионов Mg^{2+} . При концентрации 2мМ наблюдали экстремум.

Изучение воздействий БАВ на РиР и АТФазу в ФСР позволяет получить информацию о возможности регуляции функционирования Са депо. В работе Кудряшова М. с соавтором [17] показано, что активация РиР изменяет кривизну и толщину мембраны ФСР, что может быть фактором регуляции активности АТФ-азы. Для АТФ-азы семьи SERCA важны толщина окружающей их мембраны и ее липидный состав, так как это регулирует доступность центров, связывающих лиганды.

С применением спектральных методов было показано влияние тестируемых веществ на каналные функции клеток – эритроцитов, изолированных из крови теплокровных животных, и клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). В клетках были задействованы Ca^{2+} -зависимые каналы. В эритроцитах ИХФАН-10 увеличивал проницаемость мембраны для гемоглобина и утечку ионов K^+ через Ca^{2+} -зависимые каналы. В клетках АКЭ происходило изменение клеточного объема при активации Ca^{2+} -зависимых K^+ и Cl^- -каналов.

Асцитная карцинома Эрлиха перевивалась мышам и через 7-8 суток клетки изолировались из асцитной жидкости, отмывались и проводилось измерение влияния БАВ на Ca^{2+} -сигнальную систему. Активировали пуриновую метаболитную систему. Все звенья проведения сигнала от поверхности клетки до ответов были ранее идентифицированы ингибиторным анализом [18, 19]. На рисунке 5 представлены схема метаболитной передачи сигнала с поверхности клетки до внутриклеточного эндоплазматического ретикулума и кинетическая кривая светорассеяния суспензии клеток АКЭ при активации пуриновой метаболитной системы.

Методом первичного светорассеяния под прямым углом в видимой области показано, что на клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мелафен и феноксан, примененные в широком диапазоне концентраций, действуют через угнетение Ca^{2+} -сигнальных путей, как метаболитного, так, вероятно, и неметаболитного, опосредованного активацией канала SOC (store operated channel), регулируемого опустошением Ca^{2+} -депо эндоплазматического ретикулума.

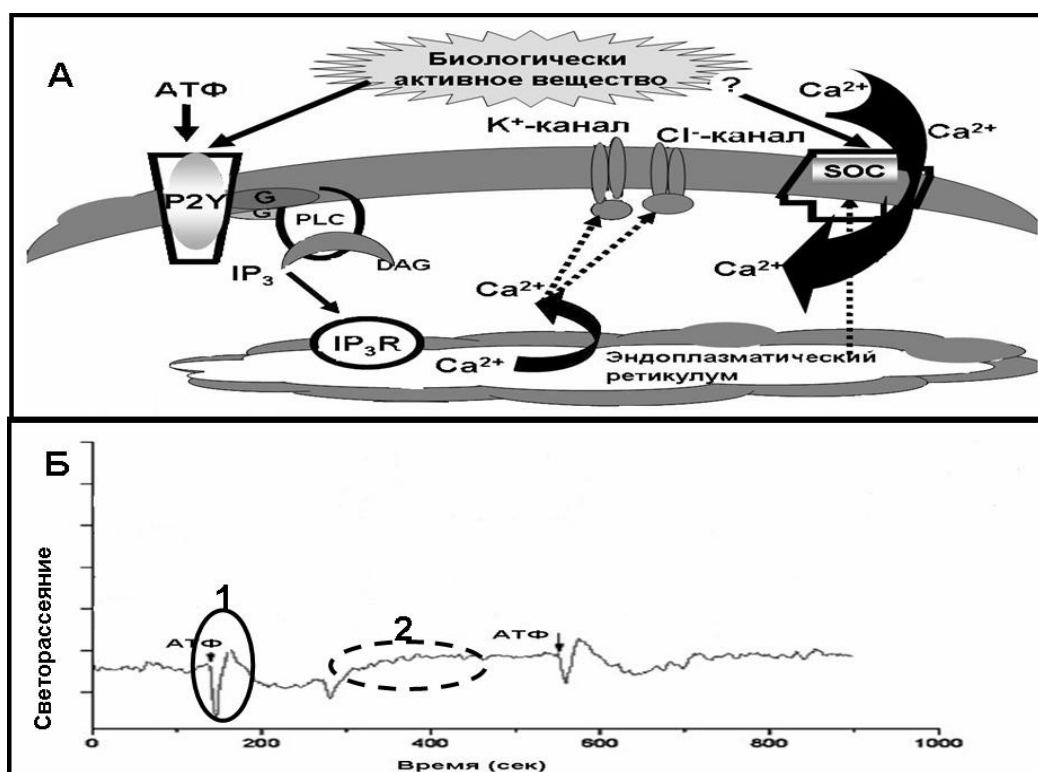


Рисунок 5. Действие БАВ на Ca^{2+} -сигнализацию в изолированных клетках АКЭ. А – Схема метаболитной передачи сигнала с поверхности клетки до внутриклеточного эндоплазматического ретикулума. Указаны: P2Y-метаболитные пуриновые рецепторы; G – белки; PLC – фосфолипаза C; DAG – диацилглицерол; IP₃ – инозитолтрифосфат; IP₃R-инозитолтрифосфатный рецептор; K⁺-канал; Cl⁻-канал; SOC – store operated channel – канал регулируемый опустошением Ca^{2+} -депо эндоплазматического ретикулума; Ca^{2+} -поток. Б – Кинетическая кривая светорассеяния суспензии клеток АКЭ при активации пуриновой метаболитной системы. Указаны: добавки АТФ; овалами отмечены пики увеличения светорассеяния суспензии клеток АКЭ. 1 – сплошной линией отмечен 1-й клеточный ответ, 2 – прерывистой линией отмечен второй клеточный ответ

На основании данных, полученных с представленными экспериментальными объектами, методами их исследования был сделан вывод о возможности использования примененных методов и экспериментальных объектов для тестирования веществ с целью выявления их биологической активности.

Список литературы / References:

1. Фаттахов С.-Г.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. Меламиновая соль бис гидроксиметил фосфиновой кислоты (Мелафен), как новый сильный регулятор роста растений. *13 Международная конференция химии фосфорных соединений*. С.-Петербург, 2002, с. 80. [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*, 2002, St. Petersburg, p. 80. (In Russ.)].
2. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. *Пространственно- затруднённые фенолы*. М.: Химия, 1972, 352 с. [Ershov V.V., Nikiforov G.A., Volodkin A.A. *Spatially obstructed phenols*. Moscow: Khimia, 1972, 325 p. (In Russ.)]
3. Никифоров Г.А., Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Горбунов Д.Б. Биоантиоксиданты "поплавоквого" типа на основе производных 2,6 дитретбутил-фенола. *Биоантиоксидант. Научный вестник мед. акад.*, 2003, с. 50-51. [Nikiforov G.A., Belostotskaya I.S., Vol'eva V.B., Komissarova N.L., Gorbunov D.B. Bioantioxidants "float types" at base of derivatives 2,6 ditret butyl fenyl. *Scientific Bulletin of the Tyumen Academy of Medicine: «Bioantioxidants»*, 2003, vol. 1, pp. 50-51. (In Russ.)]
4. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким Ю.А. Взаимодействие таксифолина (дигидрокверцитинга) с мультиламеллярными липосомами из димиристоилфосфатидилхолина. *Биофизика*, 2008, т. 53, № 1, с. 78-84. [Tharachovsky Yu.S., Kuznetsova S.M., Vasil'eva N.A., Egorochkin M.A., Kim I.A. Interaction of taxifolin (dihydroquercetin) with dimyristoylphosphatidylcholine multilamellar liposomes. *Biophysika*, 2008, vol. 53, no. 1, pp. 78-84. (In Russ.)]
5. Тараховский Ю.С. *Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ*. М.: Издательство ЛКИ, 2011, 280 с. [Tharachovsky Yu.S. *Intellectual lipid nanocontainers in targeted drug delivery*. LKI, Moscow, 2011, 280 p. (In Russ.)]
6. Escriba P.V., Ozaita A., Ribas C., Miralles A., Fodor E., Farkas T., Garcia-sevilla J.A. Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar – prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A*, 1997, vol. 94, pp. 11375-11380.
7. Антонов В.Ф., Смирнова Е.Ю., Шевченко Е.В. *Липидные мембраны при фазовых превращениях*. М.: Наука, 1992, 125 с. [Antonov V.F., Smirnova E.Yu., Shevchenko E.V. *Lipid Membrane in Phase Transformations*. Moscow, Nauka Publ., 1992, 125 p. (In Russ.)]
8. Sato Y., Yamakose H. Suzuki Ya. Mechanism of hypotonic hemolysis of human erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, 1993, vol. 16, no. 5, pp. 506-512.
9. Akoev V.R., Matveev A.V., Belyaeva T.V., Kim Y.A. The effect of oxidative stress on structural transitions of human erythrocyte ghost membranes. *Biochim Biophys Acta.*, 1998, vol. 1371, no. 2, pp. 284-294.
10. Алексеева О.М., Кременцова А.В., Голощачов А.Н., Ким Ю.А. Ингибиторы рианодиновых рецепторов в саркоплазматическом ретикулуме. *Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»* Пущино 2019, с. 203-208. [Alekseeva O.M., Krementsova A.V. Goloshchapov A.N., Kim Yu.A. Inhibitors of Ryanodine receptors at sarcoplasmic reticulum. *Proceedings of International Conference «Receptia I vnutriketochnaya signalizacia»*. Puschino, Moscow region, 2009, pp. 203-208. (In Russ.)]
11. Winegrad S. Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 1965, vol. 48, pp. 455-479.
12. Gebert G. Caffeine contracture of frog skeletal muscle and of single muscle fibres. *American J. of Physiol.*, 1968, vol. 215, no. 3, pp. 296-298.
13. Murayama T., Ogawa H., Kurebayashi N., Ohno S., Horie M., Sakurai T. A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates Ca²⁺sensitivity. *Communications Biology*, 2018, vol. 1, pp. 98.
14. Zafar S., Hussain A., Liu Y., Lewis D., Inesi G. Specificity of ligand binding to transport sites: Ca²⁺ binding to the Ca²⁺ transport ATPase and its dependence on H⁺ and Mg²⁺. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, vol. 476, no. 1, pp. 87-94.
15. Laver D.R. Regulation of the RyR channel gating by Ca²⁺ and Mg²⁺. *Biophys. Rev.*, 2018, no. 4, pp. 1087-1095.
16. Ikemoto N., Yamamoto T. The luminal Ca²⁺ transient controls Ca²⁺ release/re-uptake of sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, vol. 279, pp. 858-863.
17. Chen W., Kudryashev M. Structure of RyR1 in native membrane. *Second Russian international conference "Cryo-electron microscopy. 2019: achievements and prospects"* Lomonosov Moscow State University (MSU) June 2-5, 2019, pp. 36-37.
18. Arslan P., Di Virgilio F., Betzame M., Tsien R.I., Pozzan T. Cytosolic Ca²⁺ homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca²⁺. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, no. 5, pp. 2719-2727;
19. Замай А.С., Замай Т.Н. Влияние АТФ на асцитные клетки в разные фазы опухолевого роста. *Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация»*. Пущино. 2005, с. 48-51. [Zamai A.C.,

Zamai T.N. ATP influences to the ascetic cells at different phases of its development. *Proceedings of the International Conference on "Reception and intracellular signalling"* Pushchino, 2005, pp. 48-51. (In Russ.)

20. Зинченко В.П., Касымов В.А., Ли В.В., Каймачников Н.П. Ингибитор кальмодулина R24571 индуцирует кратковременный вход Ca^{2+} и импульсную секрецию АТФ в клетках асцитной карциномы Эрлиха. *Биофизика*. 2005, т. 50, вып. 5, с. 1055-1069. [Zinchenko V.P., Kasimov V.A., Li V.V., Kaimachnikov N.P. Inhibitor of kalmodulin R24571 induces the transition entering of Ca^{2+} and impulse secretion of ATP at the cells of Erlich ascetic carcinoma. *Biophysika*, 2005, vol. 50 (5), pp. 1055-1069. (In Russ.)]

MODEL MEMBRANE'S OBJECTS FOR INVESTIGATIONS OF THE ENDOGENOUS AND EKZOGENOUS FACTORS ACTIONS.

Alekseeva O.M.¹, Krementsova A.V.¹, Krivandin A.V.¹, Shatalova O.V.¹, Golochshapov A.N.¹, Kim Yu.A.²

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences

Kosygina st., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: olgavek@yandex.ru

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

Pushchino, Russia

Abstract. For investigation of biologically active substance (BAS) effects the consistent number of experimental objects was used: model – multilamellar phospholipid liposomes (MPL), formed from synthetic individual phospholipid dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), and from mix of natural phospholipids of egg lecithin; organelles – fragmented sarcoplasmic reticulum (FSR) and erythrocyte's ghost (plasma membrane with cytoskeleton); cells-insulated erythrocytes and cells of Ehrlich ascetic carcinoma (EAC). The biologically active substances, which were used: at first - the exogenous substances: melafen, caffeine and its analogs and antagonists, phenosan and its derivatives; at second – endogenic substances: free fatty acids (FFA), serum albumin, ATP and inorganic salts, containing magnesium and calcium. The registration of experimental objects reactions to the actions of BAS was held by the methods: DSC, small-angle x-ray light scattering (SAXS), primary light scattering at a right angle in the visible range, potentiometric methods. The concentration regions of BAS have been determined by DSC under the application of phenoksan (10^{-5} M) and IHFANs (10^{-6} M). These regions were without the destruction of microdomain organization at bilayers of MPL, formed from DMPC. Melafen over a wide range of concentrations didn't disrupt the structure of such MPL, but caused the changes of thermodynamic parameters. IHFAN-10 and phenoksan changed the parameters of thermo-induced denaturation of protein microdomains of erythrocyte ghosts, melafen hadn't effect. SAXS didn't show of melafen influence at wide range of concentrations on the bilayers thickness and packing at natural MPL. The concentration-dependent actions of Mg^{2+} to the activities of Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -channel have been showed by potentiometric method, also with the presence of FFA in FSR membranes. FFA and Mg^{2+} influenced to the effect of Ca^{2+} -channel activator - caffeine. The extraction of FFA from FSR by the treatment with serum albumin reduced the effect of caffeine. Primary light diffusion showed the inhibition of purine-depended Ca^{2+} -signalling at EAC cells by the melafen and phenoksan. It has been concluded that the approach based on the using of these experimental methods and objects could be applied to the substances test with the aim of revealing of their biological activity.

Key words: *phospholipids, multilamellar liposomes, biology active substances, erythrocyte's ghost, erythrocyte, DSC, small-angle X-ray scattering.*