

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. Н.М.
ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

АЛБАНТОВА АНАСТАСИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ С АНТИОКСИДАНТНОЙ И
РОСТРЕГУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ
НА КЛЕТОЧНЫЕ И СУБКЛЕТОЧНЫЕ СТРУКТУРЫ**

03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Миль Елена Михайловна

Москва – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Антиоксиданты. Защитная, регуляторная и сигнальная функция. Защита от апоптоза	13
1.2. Синтетические антиоксиданты на основе пространственно затрудненных фенолов: фенозан К и ИХФАН-10	15
1.3. Эритроциты - клеточная модель для изучения действия биологически активных соединений и АО	21
1.4. Влияние стрессовых факторов и АО на растения	24
1.5. Мелафен - синтетический антиоксидант и регулятор роста растений нового поколения	27
1.6. Действие АТФ, фитогормонов и мелафена на растительные организмы	30
1.7. Влияние биологически активных препаратов на сигнальные системы и регуляторные пути апоптоза клеток	35
ГЛАВА 2. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА	43
2.1 Модель совместного действия недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения на субклеточные структуры растений.....	43
2.2. Выделение митохондрий.....	43
2.3. Приготовление образцов для АСМ	44
2.4. Действие препаратов на эритроциты <i>in vivo</i>	45
2.5. Выделение эритроцитов	45
2.6. Приготовление образцов эритроцитов для АСМ исследования	46
2.7. Метод АСМ (атомно - силовая микроскопия)	46
2.8. Анализ АСМ имиджей митохондрий	48
2.9. Количественный анализ АСМ имиджей эритроцитов.....	49
2.10. Метод иммуноблоттинга	49
2.10.1. Электрофорез	49
2.10.2. Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану	51
2.10.3. Блокирование неспецифических связываний	51
2.10.4. Детекция белков.....	51
2.11. Опухолевые и низкораковые линии мышей	53

2.12. Определение перекисного окисления липидов флуоресцентным методом	54
ГЛАВА 3. Исследование действия рострегулятора мелафена на структурные характеристики растительных органелл и животных клеток, и на индукцию белков пути апоптоза в клетках мышей линии АКЭ.....	56
3.1. Влияние мелафена на морфологию митохондрий проростков гороха при стрессовых воздействиях	56
3.2. Сигнальные свойства мелафена	63
3.3. Исследование морфологических изменений эритроцитов в присутствии и отсутствии глюкозы с помощью метода АСМ	66
3.4. Изменение морфологии эритроцитов мышей при действии препарата мелафен	72
3.5. Влияние мелафена в концентрации 10^{-10} М на трансдукцию апоптоза. Определение содержания белка- регулятора p53 и антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках АКЭ.....	77
ГЛАВА 4. Исследование действия фенозана К и ИХФАН-10 на структурные характеристики эритроцитов и на трансдукцию белков пути апоптоза животных клеток.	82
4.1. Изменение морфологии эритроцитов под действием фенозана К и ИХФАН-10 в системах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	82
4.2. Влияние фенозана К и ИХФАН-10 на содержание антиапоптозного белка Bcl-2 в различных клетках.....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ.....	107
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	108

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АО – антиоксидант

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БАВ – биологически активное вещество

ПК-С – протеинкиназа С

ПМ – плазматические мембраны

ПОЛ – пероксидное окисление липидов

СМД – сверхмалая доза

ТРГ – тиреотропин-релизинг-гормон, тиролиберин

ФК – фенозан калия, 3-3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил пропионат калия

АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха

РРР – регулятор роста растений

СЖК – свободные жирные кислоты

АФК, ROS – активные формы кислорода

ДДС – Na – додецилсульфат натрия

МФ – мелафен

НУ – недостаточное увлажнение

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Биологически активные соединения находят применение во многих областях медицины, биологии и в сельском хозяйстве (с/х). Создание подобных синтетических соединений и выяснение их биологических свойств открывают новые возможности их применения.

Действие различных стрессовых ситуаций, таких как неблагоприятные факторы внешней среды, воздействие химических препаратов на растительные и животные организмы, может привести к изменению метаболизма клеток и даже к гибели клетки и всего организма. Для предотвращения окислительного стресса и снижения последствий его воздействия довольно широко используются антиоксиданты (АО), которые в ряде случаев сочетают эти свойства с биологической активностью. Синтетические АО и биологически активные соединения (БАВ), применяются в с/х для стимулирования роста растений, защите от неблагоприятных факторов внешней среды. При попадании по пищевой цепочке и при длительном воздействии, они могут оказывать влияние на организм животных и человека, поэтому представляется важным провести сравнительное изучение действия АО как на растительные, так и на животные клетки и субклеточные структуры.

Эти соединения при введении в организм могут претерпевать различные метаболические изменения, их концентрация в месте воздействия на определенные мишени изменяется. В связи с этим представляется крайне важным более детальное исследование воздействия АО, являющихся биологически активными веществами (БАВ), *in vitro* и *in vivo* на различные клеточные структуры, в том числе эритроциты, которые могут транспортировать БАВ по организму. При определенных условиях АО могут проявлять не только антиоксидантные свойства – стимулировать репарационные и противовоспалительные процессы, но и инициировать

апоптотические явления. В связи с этим важно было оценить влияние АО на содержание белков апоптозного ряда, для ответа на вопрос приводит ли введение данных препаратов к усилению репарации и угнетению апоптоза, или к его индукции.

В последние десятилетия широко обсуждается эффект действия биологически активных веществ в низких концентрациях на биологические системы. Эффекты сверхмалых доз (СМД) АО (мелафена, фенозана К и ИХФАН-10) были зарегистрированы в экспериментах с данными веществами при воздействии на различные биологические системы. Одной из мишеней действия БАВ могут выступать плазматические мембраны клеток, мембраны митохондрий, эритроциты. В этой связи одним из методов регистрации морфологических изменений под действием БАВ является метод атомно - силовой микроскопии (АСМ).

Среди работ, объединяющих изучение воздействия антиоксидантов (АО) на растительные и животные клеточные системы физическими и биохимическими методами, чаще всего исследования проводятся в системе *in vitro*. Вследствие этого дискуссионным также остается вопрос, насколько результаты экспериментов, которые получены *in vitro*, соответствуют реальным процессам, которые происходят в клетках живого организма - *in vivo*.

Сравнительное исследование БАВ, которые находят свое применение в с/х и медицине, позволяет выявить степень их воздействия на клетки и получить новые данные по механизму действия данных веществ. Поэтому для лучшего понимания механизма действия БАВ такое многоплановое структурно-функциональное исследование является важной и актуальной задачей.

Для ответа на вопрос о том, насколько общими или различными являются механизмы действия указанных антиоксидантов, обладающих разной биологической активностью, целесообразно проведение исследований влияния этих антиоксидантов на структурно-функциональные свойства ряда

биологических объектов на молекулярном, клеточном и субклеточном уровне в сходных условиях с применением современных методов исследования.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось выяснение действия синтетических АО из класса пространственно затрудненных фенолов и регулятора роста растений мелафен на клеточные и субклеточные структуры и индукцию белков апоптоза.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать методические основы АСМ метода для выявления тонких изменений в субклеточных структурах (митохондриях) и целых клетках (эритроцитов) при действии антиоксидантов фенозана К, ИХФАН-10 и мелафена.

2. Изучить защитное действие мелафена при низких концентрациях (2×10^{-12} М) на морфологию митохондрий проростков гороха в условиях недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения семян гороха (*Pisum sativum L*) методом АСМ.

3. Провести сравнение структурно модифицирующего действия ряда биологически активных соединений: мелафена и синтетических фенольных АО: фенозана К и ИХФАН-10 на эритроциты животных в диапазоне концентраций 10^{-5} - 10^{-11} М в системах *in vivo* и *in vitro* методом АСМ.

4. Оценить влияние антиоксидантов фенозана К и ИХФАН-10 и мелафена на трансдукцию сигналов апоптоза по изменению содержания регуляторных белков (p53 и Bcl-2) в нормальных и опухолевых животных клетках методом иммуноблоттинга.

Научная новизна

В диссертационной работе при исследовании воздействия малых концентраций биологически активных препаратов на биологические системы *in vitro* и *in vivo* применяли новые подходы в использовании метода АСМ и

количественного анализа геометрических параметров АСМ имиджей клеточных и субклеточных структур с использованием методов математической статистики.

Впервые визуально продемонстрированы двумерные и трехмерные АСМ имиджи митохондрий гороха: нормальных, набухших после стрессового воздействия и делящихся растительных митохондрий, а также митохондрий при воздействии РРР (регулятора роста растений) мелафена.

С помощью предложенного подхода определены изменения средних параметров объема и площади митохондрий проростков гороха (*Pisum sativum* L) при стрессовых воздействиях (набухание митохондрий), и, впервые показано, что мелафен, в концентрации 2×10^{-12} М, при предварительной обработке семян гороха до воздействия НУ+14⁰, предотвращает набухание митохондрий и увеличивает число делящихся митохондрий. При этом средние параметры митохондрий из опытной группы не отличались от контрольной группы.

На основе количественного анализа АСМ имиджей было обнаружено изменение параметров эритроцитов при гликолитическом голодании *in vitro*, – что демонстрирует возможности использования метода АСМ для анализа изменений функционального состояния эритроцитов в норме и при различных воздействиях. В частности, были получены новые данные по действию малых концентраций мелафена, фенозана К и ИХФАН-10 как *in vitro*, так и в системе *in vivo*. При исследовании эритроцитов в системе *in vitro*, т.е. при инкубации с АО в течение часа, обнаружено, что АО по-разному влияли на осмотическое состояние и размеры эритроцитов, так мелафен снижает, фенозан К не влияет, а ИХФАН-10 увеличивает объем эритроцитов.

Однако, было обнаружено, что изменение формы эритроцитов при введении фенозана К и ИХФАН-10 *in vivo* отличается от воздействия препаратов в системе *in vitro*. При этом для обоих АО *in vivo* наблюдается уменьшение объема эритроцитов.

В работе методом иммуноферментного анализа впервые показано, что при действии данных АО происходит изменение содержания регуляторных белков p53 и Bcl-2 в различных клеточных системах. Показано, что антиоксиданты, обладая биологической активностью, могут по-разному влиять на молекулярные мишени апоптоза. Мелафен *in vitro* в опухолевых клетках мышей АКЭ вызывал увеличение содержания белка p53 и снижение содержания антиапоптозного белка Bcl-2. Также было обнаружено на модельной системе, что антиоксидант ИХФАН-10 вызывал снижение содержания белка Bcl-2 в клетках крови, что может приводить к инициации апоптотических сигналов в этих клетках. Однако фенозан К (в концентрации 1×10^{-14} и 1×10^{-4} М) в системе *in vivo* вызывал индукцию антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках селезенки мышей F1 (СВА×С₅₇В1).

Практическое значение работы

Полученные в работе данные имеют важное практическое значение. В ходе выполнения работы разработаны методические основы использования метода атомно-силовой микроскопии для выявления тонких изменений морфологии клеточных и субклеточных структур под влиянием экзогенных факторов, включая действие биологически активных соединений.

Обнаружено, что предварительная обработка семян гороха регулятором роста растений мелафеном, устраняет структурные изменения митохондрий проростков при их проращивании в модели, отражающей стрессовые погодные условия весеннего периода, сочетающей эффект недостаточного увлажнения при пониженной температуре.

При воздействии мелафена на эритроциты животных наблюдается снижение среднего объема эритроцитов, что может влиять на реологические свойства крови. Это следует учитывать при разработке токсикологического регламента для работы с мелафеном.

Обнаружено, что мелафен *in vitro* приводит к снижению объема эритроцитов, фенозан К не влияет на архитектуру эритроцитов, а ИХФАН-10 приводит к увеличению площади, высоты и объема эритроцитов, однако в

системе *in vivo* действие АО приводит к снижению размерных параметров эритроцитов, что свидетельствует о многоплановом воздействии этих АО на мишени в живом организме.

Важнейшим результатом работы является обнаруженная способность АО вызывать индукцию как проапоптозных (ИХФАН-10), так и антиапоптозных белков (фенозан К). Эти данные также необходимо учитывать при возможном фармакологическом использовании этих препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Доказывается, что одним из свойств мелафена является предотвращение морфологических изменений митохондрий при стрессовых воздействиях.
2. Метод АСМ, с применением статистических подходов для определения изменения геометрических параметров АСМ имиджей эритроцитов, позволяет наблюдать морфологические изменения в клетках эритроцитов под действием очень низких концентраций АО (ИХФАН-10, фенозан К, мелафен), при воздействии в системе *in vivo* и *in vitro*.
3. Воздействие АО на животные клетки могут приводить к изменению содержания регуляторных белков путей апоптоза, что способно инициировать как апоптотические, так и репарационные эффекты.

Апробация работы

Результаты работы докладывались на международных и российских конференциях, в частности на ежегодных Международных молодежных конференциях VII, VIII, X, XI и XIV ИБХФ РАН - ВУЗЫ «Биохимическая физика» (г. Москва, 2007, 2008, 2010, 2011, 2014 гг.); XX Всероссийском симпозиуме "Современная химическая физика", (г. Туапсе, 2008г.). Был присужден приз и награда на VIII международной специализированной выставке "МИР БИОТЕХНОЛОГИИ - 2010" в рамках Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы

развития". Результаты, полученные в диссертационной работе, неоднократно докладывались на научных семинарах ИБХФ РАН; XVI Симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформациям молекул, школа "Конформационный анализ: проблемы и достижения" 17 – 22 июня 2012 года, Иваново; "Ежегодный международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии г. Судак, Крым, Украина (2010, 2012, 2014 гг); VI Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии медицине», 02 июля – 06 июля 2012 Санкт-Петербург; Российская научная конференция «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии» Санкт-Петербург, 19 – 20 мая 2011 г; IV Съезд биофизиков России, Нижний Новгород 20 – 26 августа 2012; Научно-практическая конференция “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения” Новый Свет, Крым, Украина 2011; Международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация” 24 – 26 мая 2011г, г. Пущино; Международная научно-практическая конференция «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» и X Международной специализированной выставке «Мир биотехнологии – 2012», 20 – 22 марта 2012 г; VI th International Symposium “Design and Synthesis of Supramolecular Architectures” September 18–23, 2011 Kazan; Ежегодная Международная молодежная школа-конференция по физической химии краун-соединений, порфиринов и фталоцианинов, 17 – 21 сентября 2012 г Туапсе; Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова 28 сентября – 1 октября 2009г. г. Пущино; 2-й Международный Конгресс-Партнеринг и Выставка по биотехнологии и биоэнергетике «ЕвразияБио-2010» Центр Международной Торговли, Москва, Россия.

Публикации

По материалам диссертации опубликована 41 работа: 11 работ в ведущих научных рецензируемых журналах, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 7 статей в международных сборниках научных трудов и 30 публикаций в сборниках и трудах конференций.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоял в подготовке образцов, проведении биофизических экспериментов, обработке и анализе полученных данных, формулировании положений и выводов, подготовке статей к опубликованию и участию в конференциях. Все изложенные в диссертации новые результаты получены автором лично или при ее непосредственном участии. Анализ данных литературы и написание диссертации проведено автором лично.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 128 страницах печатного текста, содержит 46 рисунков и 1 таблицу. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 156 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Антиоксиданты. Защитная, регуляторная и сигнальная функция.

Защита от апоптоза

В процессе жизнедеятельности живых систем в результате естественных процессов метаболизма могут возникать свободные радикалы (перекисные, алкоксильные, алкильные), а также активные формы кислорода (АФК), такие как супероксид, которые могут запускать дальнейшие цепные реакции и вызывать повреждающие эффекты на биоструктуры (белки, нуклеиновые кислоты, липиды мембран и др.). В тоже время в живых системах существуют и естественные антиоксиданты (α -токоферол, убихиноны, коэнзимы, белки: каталаза, супероксиддисмутаза, а также мелатонин, аминокислоты, глутатион, некоторые витамины и др.), которые являются ингибиторами этих процессов. В нормальных условиях существует баланс сил многоуровневых систем прооксидантов и антиоксидантов, который может быть нарушен, например, в результате действия экзогенных факторов окружающей среды, в том числе экологических или иных эндогенных факторов, например, связанных со старением.

Исследования академика Н.М. Эмануэля и его сотрудников Института химической физики РАН внесли большой вклад в развитие теории цепных процессов и роли прооксидантов и антиоксидантов в живых системах, в поиске и создании новых препаратов, применимых в биологических системах, в создании новой фармакологической группы лекарственных соединений - антиоксидантов [1]. Школой академика Н.М. Эмануэля в ИБХФ РАН разработаны и введены в практику целый ряд АО широкого спектра биологического действия, синтезированных на основе пространственно затрудненных фенолов, это - ионол, фенозан, а также гибридные АО - ИХФАНЫ. Были созданы также уникальные препараты, такие как эмоксипин

и мексидол, нашедшие применение в медицинской практике. Перспективными в настоящее время являются синтезированные в ИБХФ РАН гибридные антиоксиданты - ИХФАНЫ, которые сочетают антиоксидантную активность и способность избирательно взаимодействовать с биосистемой.

В настоящее время диапазон применяемых антиоксидантов очень широк и включает в себя пространственно-затрудненные фенолы, фосфорсодержащие соединения фосфониты и фосфиты, а также вторичные ароматические амины и тиозефиреы и другие.

Экзогенные синтетические антиоксиданты и природные антиоксиданты в большей части растительного происхождения, в настоящее время приобрели большую значимость и распространение в медицинской практике, пищевой промышленности и в косметологии.

Для оценки АО активности и выбора наиболее подходящего антиоксиданта, часто используются различные модели, в том числе МО (метилолеатная модель). Данные МО указывают на то, что механизм действия исследуемых АО во многом обусловлен антирадикальной активностью в отношении пероксидных радикалов, ведущих процесс окисления. При этом значение константы скорости реакции со свободными радикалами K_7 для ИХФАНов значительно ниже, чем у α -токоферола ($K_7 = 3,6 \times 10^{-6} \text{M}^{-1} \times \text{C}^{-1}$), и сравнима с константой скорости реакции с дибунолом ($K_7 = 1,4 \times 10^4 \text{M}^{-1} \times \text{C}^{-1}$) [2]. По мнению авторов, ингибирующее действие АО зависит не только от их антипероксидной активности, но и от их активности в реакции с субстратом окисления, а также со скоростью регенерации АО.

Как известно, флавоноиды растительного происхождения являются активными антиоксидантами, механизм действия которых в последнее время очень широко изучается. Оказалось, что флавоноиды при введении в организм оказывают воздействие на многие сигнальные системы животных клеток. Сигнальная система клетки участвует в передаче сигналов с

поверхности клеток в цитоплазму и далее в ядро, способна многократно усиливать или амплифицировать сигналы, благодаря чему клетка способна реагировать на изменение окружающей среды или вызывать процессы апоптоза. В эксперименте на животных было выявлено действие растительных полифенолов на молекулярные мишени путей апоптоза. Обнаружено, что различные теафлавины инициировали повышение экспрессии белка p53 (супрессор опухолей) и белка апоптоза Bax. К снижению экспрессии Bcl-XL, например, приводили кемпферол, ресвератрол, а к экспрессии Bcl-2 – мирицетин [3].

Активность растительных полифенолов, таких как катехины, которые оказывают антиканцерогенное действие, в ряде работ связывают с тем, что флавоноиды являются миметиками адениловой части молекулы АТФ и способны блокировать АТФ-связывающие центры рецепторов протеинкиназ. Кроме того, они могут влиять на латеральную диффузию липидов плазматической мембраны и образование липидных рафтов, что в свою очередь будет влиять на функционирование рецепторов мембран клеток [3].

Т.о, в настоящее время установлено, что синтетические и природные антиоксиданты не только защищают клетку от нежелательного возрастания уровня активных радикалов, но способны оказывать регуляторное воздействие на многие сигнальные системы клеток, в том числе влиять на экспрессию белков сигнальной системы пути апоптоза.

1.2. Синтетические антиоксиданты на основе пространственно затрудненных фенолов: фенозан К и ИХФАН-10

В работе были изучены синтетические антиоксиданты фенозанового ряда, пространственно затрудненные фенолы: фенозан К и ИХФАН-10. Эти соединения многопланово исследуются в Институте биохимической физики РАН им. Н.М. Эмануэля и показали ряд очень интересных и важных свойств (антиоксидантные, противовоспалительные, радиозащитные,

противоожоговые и другие. [4,5]), при этом фенозан К применяется в медицине в качестве противоэпилептического препарата [6].

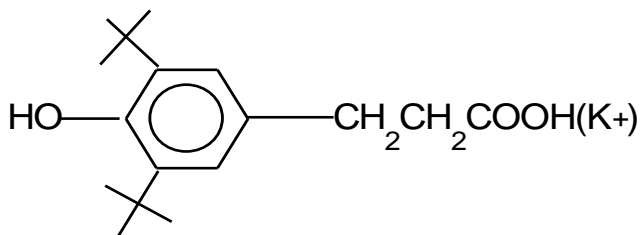


Рисунок 1.1. Структурная формула препарата фенозан К

Антиоксидант широкого спектра действия - фенозан калия (3-3,5-дитретбутил-4-гидроксифенил пропионат калия) (Рисунок 1.1) был синтезирован в Институте Химической Физики РАН для стабилизации полимеров и является родоначальным соединением семейства фенольных антиоксидантов. Технология производства данных АО разработана лабораторией химии антиоксидантов ИХФ (позднее ИБХФ) РАН в содружестве МНПЗ в 70-80-х годах [7].

АО, такие как фенозан К и ИХФАН-10, могут предотвращать негативные изменения происходящие в клетке, ингибируя окисление в реакции со свободными радикалами в плазматической мембране (ПМ). ПМ включают в себя различные системы вторичных посредников, которые могут регулировать клеточный метаболизм и защищать клетку от различных негативных внешних факторов, например влияя на перекисное окисление липидов (ПОЛ). Показано, что синтетический АО фенозан К способен снижать уровень продуктов и скорость ПОЛ [7,8].

Фенозан К, по мнению ряда авторов [9], способен специфически связываться с определенными рецепторными участками на плазматической мембране, либо взаимодействовать напрямую с протеинкиназой С. При этом он способен встраиваться в области, содержащие данный фермент и менять микровязкость липидного окружения фермента. Фенозан К, как

предполагается, является суперактиватором протеинкиназы С, активность которой напрямую зависит от концентрации Ca^{2+} [10], а также вызывает существенные изменения в микровязкости липидов ПМ [9].

Фенозан К по своей природе водорастворим, но образует с липидами гомогенные растворы. В то же время ИХФАН-10, имеющий в своей структуре кватернизированный атом азота (полярный фрагмент), может самопроизвольно формировать мицеллы, в которых фенольный гидроксил может быть скрыт внутри, за счет ориентации полярных и неполярных групп мицеллы [11]. Показана возможность самоорганизации и изменение физико-химических свойств водных растворов амфифильных производных фенолов (фенозан К и ИХФАН-10) в области низких концентраций в естественных и гипoeлектромагнитных условиях, которые создавались в пермалловом контейнере [12].

Фенозан К - пространственно затрудненный фенол, амфифильное вещество. Предполагается, что он располагается преимущественно близко к мембране эритроцитов [13]. Ранее, методом малоугловой рентгеновской дифракции в работе Архиповой Г.В с соавторами было показано, что в больших концентрациях фенозан К влияет на организацию бислоев мультиламеллярных липосом из фосфатидилхолина: увеличивает толщину бислоя и снижает уровень регулярности мембран в мультиламеллярной липосоме [14].

В работах Бурлаковой Е.Б показаны положительные воздействия фенозана К в сверхмалых дозах на теплокровных животных [15]. Особенностью фенозанов, обнаруженной при исследовании их метаболизма в организме теплокровных животных (на примере кроликов), является образование в качестве метаболитов также редокс активных соединений – метилового эфира 4-гидрокси-3,5-ди-третбутилкоричной кислоты (в результате дегидрирования карбоксэтильного фрагмента) и 2,6-ди-трет-

бутил-п-бензохинона, образующегося при разрыве связи карбоксиэтильного заместителя с фенольным кольцом [15].

Для проникновения в более глубокие слои мембраны, создатели препарата провели гидрофобизацию антиоксиданта, а также добавление холина - фрагмента, способного ингибировать ацетилхолинэстеразу. На основе экранированного фенола - фенозана К в ИБХФ РАН Никифоровым Г.А. были синтезированы его производные - гибридные антиоксиданты ИХФАНЫ, структурная формула представлена на Рисунке 1.2. Важный этап при взаимодействии данного соединения с клетками происходит посредством мембранного транспорта, проникновение в мембрану и распределение во внутримембранном пространстве [16]. Синтез осуществляется по следующей схеме (Схема 1) [17,18,19].

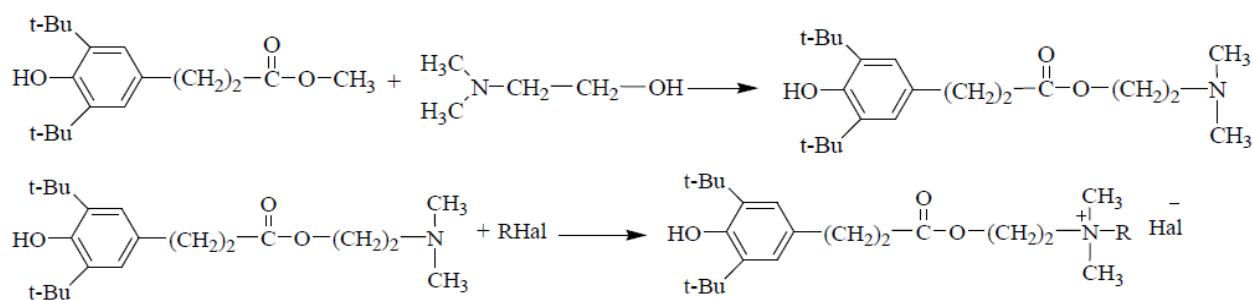


Схема 1

Схема 1. Синтез гибридных антиоксидантов - ИХФАНов [19]

Молекулы ИХФАНов содержат экранированный фенол, обладающий антиоксидантными свойствами, фрагмент, содержащий кватернизированный атом азота (аналог холина), выступающий в качестве ингибитора ацетилхолинэстеразы и алкильный заместитель (R), содержащий, 1, 8, 10, 12 или 16 атомов углерода, придающий ИХФАНам гидрофобные свойства. Указанный фрагмент способен встраиваться в липидный бислой клеточной мембраны и менять его вязкость [19].

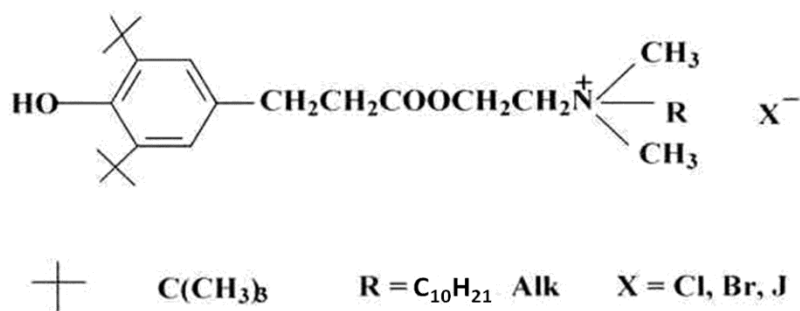


Рисунок 1.2. Структурная формула ИХФАН-10

Выявлена высокая антиоксидантная активность ИХФАНов и ингибирующее действие на ацетилхолинэстеразу эритроцитов человека [20,21]. Производные пространственно затрудненных фенолов представляют собой биологически активные вещества, способные замедлять процессы пероксидного окисления липидов и снижать окислительный стресс организма [5]. В растворе липидов ИХФАНы эффективно тормозят окисление метилолеата (МО), при этом константа K_7 ниже чем у α -токоферола, и сопоставима в сравнимых концентрациях с действием дибунола. При этом получены следующие константы K_7 для дибунола – $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{xc}^{-1}$, фенозана – $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{xc}^{-1}$, ИХФАН-10 – $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{xc}^{-1}$. Уменьшение K_7 для ИХФАНов по сравнению с дибунолом обусловлено влиянием электроноакцепторных заместителей, снижающих, как известно, антирадикальную активность АО [11].

Если фенозан К является антиоксидантом, влияющим на структуру и состав липидной фазы мембран, и пока не обнаружено что он имеет определенные мишени воздействия, то ИХФАНы синтезированы как «мультицелевые» агенты с несколькими определенными возможностями - модификацией структуры мембраны, влиянием на процессы перекисного окисления, ингибированием ацетилхолинэстеразы [11].

ИХФАНы относят к новой группе антиоксидантов "поплавкового" типа. По мнению авторов, положительно заряженный четвертичный атом

азота позволяет удерживать молекулу гибридного антиоксиданта на поверхности клеточной мембраны. Благодаря гидрофобному фрагменту происходит фиксирование молекулы на определенной глубине во внутримембранном пространстве (поплавковый эффект) [18].

Важным свойством ИХФАН-10 оказалась способность ингибировать ацетилхолинэстеразы (и другие холинэстеразы) в различных тканях по конкурентному или смешанному типу [22]. Поскольку блокаторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ) препятствуют разрушению ацетилхолина в синаптической щели, то их применение является одним из направлений при лечении болезни Альцгеймера. Как известно, ацетилхолин индуцирует конформационные изменения рецептора, которые передаются на белки натриевых и калиевых каналов в постсинаптической мембране, в результате каналы открываются [23]. Поэтому, в качестве перспективного препарата для лечения болезни Альцгеймера, в институте ИБХФ РАН было предложено использовать гибридный антиоксидант (ГАО) ИХФАН-10. Другим составляющим патологических механизмов нейродегенеративных болезней, при болезни Альцгеймера, а также при старении, являются изменения в структуре и в липидном составе эритроцитов, при которых эритроциты деформируются и теряют характерную для них форму.

Ранее были проведены многоплановые исследования по изучению действия ИХФАНов и фенозана К, а также мелафена на структурные свойства мембран разного уровня организации, бычий сывороточный альбумин (белок БСА), митохондрии, эритроциты, клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), а также на Ca^{2+} -зависимую сигнализацию клеток [20, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30].

Показано, что ИХФАН-10 и фенозан К оказывали стимулирующее (при низких концентрациях) и угнетающее (в средних концентрациях, выше 10^{-10} М) влияние на Ca^{2+} -сигнализацию клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), по-разному влияя на пуриновые рецепторы и CRAC-каналы (Са

регулируемые Ca^{2+} -каналы) [31]. В работе [31] при тестировании эритроцитов (в которых имеется только $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -канал), было обнаружено такое же бимодальное влияние (при больших и сверхмалых концентрациях) антиоксиданта Ихфан-10 на Ca^{2+} - зависимый выход K^+ из эритроцитов и незначительное влияние фенозана К на этот процесс [31].

1.3. Эритроциты - клеточная модель для изучения действия биологически активных соединений и АО

Одной из удобных моделей для исследования воздействия АО могут служить эритроциты, которые, кроме основной функции переносчика кислорода, осуществляют и транспортные функции, сорбируя на своей поверхности как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные соединения, аминокислоты и липиды, кроме того, эритроциты осуществляют и другую защитную функцию - адсорбируют токсины и антитела. Помимо удобной клеточной модели для исследовательских целей, эритроциты могут использоваться как естественные контейнеры, нагружаемые определенными способами лекарственными препаратами. Это позволяет пролонгировать действие лекарственных препаратов в терапевтических дозах в течение 2-3 недель [32].

В норме эритроцит имеет форму дискоцита и сохраняет свои геометрические параметры, деформируясь только при прохождении мелких капилляров. При нарушении формы эритроцитов ухудшаются реологические свойства крови и периферическое кровоснабжение, что может приводить к различным патологическим состояниям, которые наблюдаются при болезнях печени, сердечно-сосудистых заболеваниях, при раковых осложнениях и др.

Форма и размеры эритроцитов, характеристика пула эритроцитов в крови, отражают их функциональное состояние и зависят от действия БАВ и развития некоторых патологических процессов в организме [21].

Изучение действия БАВ на эритроциты, в том числе амфифильных

соединений, к которым относятся ИХФАНЫ, представляет большой интерес.

С одной стороны - в связи с их важной ролью в организме, поскольку клетки крови одними из первых реагируют на проникновение экзогенных веществ и транспортируют их по организму, с другой стороны - эритроциты являются удобной клеточной моделью при исследовании взаимодействия БАВ с мембраной эритроцитов, их действия на ее транспортные системы, архитектонику и другие функциональные и морфологические свойства.

Эритроциты млекопитающих не содержат ядер, митохондрий, и не способны к синтезу белков, в эритроците функционируют только те белки, которые образовались на более ранних стадиях развития эритроцита. Клетки циркулируют в крови около 120 дней. Одним из важнейших свойств эритроцитов является деформируемость, обуславливающая их способность выполнять физиологические функции. Чтобы проходить через капилляры, эритроциты подвергаются различным деформациям, но при этом незначительно изменяют свои объем и площадь поверхности, что поддерживает процессы диффузии газов на высоком уровне. Снижение деформируемости эритроцитов происходит, в том числе, за счет увеличения внутриклеточной концентрации ионов кальция. Другим следствием роста внутриклеточной концентрации ионов кальция является открытие Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов, обеспечивающих выход ионов калия из эритроцитов [16,33,34]. Ca^{2+} - регулирующая система и связанная с ней система ионных насосов и каналов в мембране эритроцитов, чувствительна к воздействиям различных препаратов. Значительный вклад в осмотический баланс внутри эритроцита вносят катионы Na^+ и K^+ , и анионы Cl^- и HCO_3^- .

Основными насосами, контролирующими объем эритроцитов являются белки Na^+ , K^+ -АТФаза и Ca^{2+} -АТФаза, эритроцит также имеет ионный (Ca^{2+})-зависимый K^+ канал (KCa). Важную роль в эритроците выполняет клеточная (плазматическая) мембрана, пропускающая газы (кислород, углекислый газ), ионы (Na^+ , K^+) и воду. Белки: спектрин, актин, анкерин образуют гибкую

сетевидную структуру, которая поддерживает форму эритроцита и противостоит давлению при прохождении его через тонкий капилляр.

Как следует из данных литературы, объем эритроцитов зависит от соотношения интенсивностей пассивного транспорта Ca^{2+} внутрь эритроцита и АТФ - зависимого Ca^{2+} транспорта в обратном направлении, осуществляемого Ca^{2+} - АТФазой. Это соотношение различно в эритроцитах в зависимости от их возраста. Доказано, что старые клетки имеют пониженную активность кальциевого насоса, они накапливают Ca^{2+} и поэтому имеют меньший объем, чем молодые [31,34]. Истощение клеток по АТФ также приводит к снижению активности кальциевого насоса и уменьшению объема эритроцитов. Введение кальциевых ионофоров *in vitro* повышало внутриклеточный кальций и уменьшало объем эритроцитов.

При использовании эритроцитарной модели, часто исследуют изменение их геометрических параметров и формы при взаимодействии БАВ с мембраной эритроцитов и при старении эритроцитов. Показано, что ряд антибиотиков, такие как метилпреднизалон: используемый при лечении астмы, изменяет структуру мембраны и форму эритроцитов [14], а полиеновый антибиотик амфотерицин - приводит к увеличению объема эритроцита приблизительно на 5% [34]. Обнаружено, что синтетические антиоксиданты ИХФАНЫ, введенные в суспензию эритроцитов в значительных концентрациях, 10^{-4} М, способны в зависимости от времени воздействия изменять форму эритроцитов [35].

Так, в работе [35] методом электронной микроскопии и спиновых меток было показано, что большие дозы 10^{-4} М гибридных антиоксидантов, в том числе ИХФАН-10, при введении *in vitro* в суспензию эритроцитов, способны встраиваться в структуру мембраны и менять форму эритроцитов: от дискоцитов в контроле к стоматоцитам и эхиноцитам [13,16]. Ранее, методом АСМ, было обнаружено неспецифическое связывание гормонов кортизола и катехоламина с мембраной эритроцитов. Показано образование новых

объемных белково-липидных областей и взаимодействие с карбонильными и amino-группами белков и фосфолипидов [36].

Исследование изменения архитектоники эритроцитов под действием различных мембранотропных веществ и АО проводились в ряде работ в нашем институте методом электронной микроскопии [16]. Эксперименты выполнялись либо в системе *in vivo*, либо *in vitro*, однако одновременного исследования фенозана К и ИХФАН-10 в обеих системах не проводилось. Кроме того, изучалось воздействие больших концентраций препаратов (1×10^{-4} , 1×10^{-5} М). Поэтому необходимо было исследовать морфологические изменения эритроцитов и их размерных параметров под БАВ и АО при очень низких концентрациях, и сравнить их воздействие в *in vivo* и *in vitro*.

Так как объем эритроцитов связан с АТФ-зависимой Ca^{2+} регулирующей системой, а также системой ионных насосов и каналов в мембране эритроцитов, то изменения в этих системах могут приводить к изменению объема, что может быть зарегистрировано методом АСМ.

Данные, полученные методом АСМ о геометрических параметрах каждого имиджа эритроцита, с привлечением методов статистики, могут позволить выявить возможные изменения в морфологии эритроцитов под действием исследуемых биологически активных соединений и дать им объяснение.

1.4. Влияние стрессовых факторов и АО на растения

Все живые организмы неодинаково реагируют на изменения окружающей среды. В растительных организмах происходит постоянный процесс адаптации к внешним условиям за счет активации генетического аппарата клеток, вследствие чего изменяется функционирование основных систем организма. Такие закономерности чаще всего проявляются при недостатке влаги и одновременно при начале интенсивного роста проростка, когда необходимо хорошее обеспечение влагой и энергией, а также в зимне-

весенний период, при заморозках и отсутствии воды (после бесснежной зимы).

При действии на растения различных стрессовых факторов запускаются механизмы устойчивости растений к стрессам, которая вероятно зависит от соответствия функционального состояния митохондрий к энергетическим потребностям клетки и всего организма в целом.

Обнаружено, что изменение температуры окружающей среды приводит к изменению липидного состава мембран митохондрий. В то же время происходит изменение количества и степени насыщенности свободных жирных кислот, что, вероятно, является признаком действия стресс факторов. Увеличение количества свободных жирных кислот (СЖК) изменяет редокс-состояние внутренней мембраны митохондрий, что приводит к экспрессии генов первичного ответа (стресс генов) [37]. Недостаточное увлажнение, солевой стресс и тепловой шок также являются причиной смещения антиоксидантно-прооксидантного равновесия и увеличения уровня АФК в клетке.

Мембраны играют важную роль в функционировании клеток и в структурной организации клеточных структур. Они являются ключевым барьером, который защищает содержимое клетки от внешней среды. Мембраны включают в себя различные липид-белковые комплексы, осуществляющие перенос различных молекул и ионов через мембрану. В том числе, липиды мембран, такие как фосфолипиды, состоят из гидрофильной части и гидрофобного “хвоста” и формируют устойчивый бислой, с которым связаны различные белковые комплексы. Белки, образующие каналы, а также АТФазы имеют глобулярную или развернутую структуру и погружены в гидрофобные участки липидного бислоя мембраны. Периферические белки полярными группами аминокислот электростатически взаимодействуют с внешними слоями липидного бислоя и не проникают в мембрану.

В мембранах митохондрий происходят наиболее важные

энергетические процессы, процессы дыхания и синтез АТФ. Митохондрии являются функционально - зависимыми органеллами. В клетках животных и дрожжей эти органеллы объединены в разветвленную митохондриальную сеть, именуемую "митохондриальным ретикулумом" [38]. У высших растений митохондрии одиночны и имеют либо сферическую, либо цилиндрическую форму [39]. В условиях стресса (тепловой шок, гипоксия, УФ-облучение или при воздействии сильных окислителей), митохондрии образуют плотные кластеры, группирующиеся вокруг хлоропластов или в других областях цитозоля. Формирование «гигантских митохондрий» сопровождается увеличением генерации АФК. Антиоксиданты предотвращают как образование «гигантских митохондрий», так и рост генерации АФК этими органеллами [40,41]. Стандартная процедура выделения митохондрий в растворе сахарозы приводит к полному разрушению межмитохондриальных контактов. По этой причине, митохондрии растений представлены в виде отдельных пузырьков. Морфология изолированных митохондрий, возможно, отражает их функциональное состояние [42].

Митохондрии содержатся во всех эукариотических клетках, они главное место аэробной дыхательной цепи активной клетки, и являются единственным источником энергии клеток. Размеры растительных митохондрий могут варьировать по длине в пределах от 1,5 - 10 мкм, а по ширине в пределах 0,25 - 1,00 мкм, однако растительные митохондрии, в частности митохондрии гороха, после выделения представляют собой изолированные глобулярные структуры [43]. Митохондрии являются ключевыми звеньями в энергетических, окислительно-восстановительных и метаболических процессах в клетке. Известно, что обработка растений сильными окислителями – продуцентами АФК (метил виологеном и s-триазином) приводила к изменению формы и размеров митохондрий [40,44]. Ранее было показано, что мелафен в малой дозе усиливает эффективность

энергетического обмена, при этом меняется жирнокислотный состав и микровязкость микросомальных и митохондриальных мембран в растительной клетке [45].

1.5. Мелафен - синтетический антиоксидант и регулятор роста растений нового поколения

Мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил) фосфиновой кислоты) - гетероциклическое соединение, которое было синтезировано в ИОФХ им. А.Е. Арбузова (Рисунок 1.3.). В молекуле мелафена присутствуют кислотная, фосфорильная и оксиметильная группы, потенциально способные связываться с различными мишенями в растительной и животной клетке [45]. Мелафен - это запатентованный препарат, при его использовании для увеличения урожайности и качества получаемой сельскохозяйственной продукции рекомендуются водные растворы мелафена в концентрациях $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ М ($1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-9}$ М) [45].

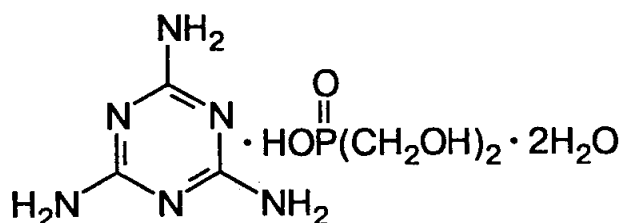


Рисунок 1.3. Структурная формула препарата мелафен

Новый вклад в выяснение воздействия малых доз мелафена принадлежат академику Коновалову и сотрудникам. Ими было обнаружено, что мелафен в воде образует различные супрамолекулярные системы с участием молекул воды, в области низких концентраций. В области концентраций растворов мелафена ниже 1×10^{-8} М, образуются наноассоциаты и наблюдается стимулирующий эффект на рост клеток хлореллы, на всхожесть и интенсивность прорастания семян озимой пшеницы [46,47,48,

49,50].

На модельных системах методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, было показано, что термодинамические параметры (энтальпия, максимум температурного перехода и кооперативность) липидных доменов в липосомах из ДМФХ (димиристоилфосфатидилхолин) изменяются в присутствии мелафена (10^{-17} - 10^{-3} М) [51].

Мелафен, как установлено в ряде работ, повышает стрессоустойчивость растений в условиях засухи и переохлаждения. При этом растения приобретают более развитую корневую систему и высоту проростков. Механизм действия мелафена все еще находится в стадии изучения, проводятся многочисленные исследования, показывающие многоплановость воздействия мелафена на метаболизм растительной клетки. Так, было установлено, что мелафен оказывает мембранотропное действие, в очень низких концентрациях оказывает влияние на энергетику митохондрий, изменяя физико-химические свойства липидного бислоя мембраны, повышает активность РНК-полимеразы I, влияет на экспрессию гена раннего светоиндуцированного белка хлоропластов ячменя в условиях стресса, а также вызывает мелафен-индуцированное тирозинное фосфорилирование белков темновой стадии фотосинтеза в концентрации 10^{-8} и 10^{-6} М [51,52, 53,54].

Как было показано ранее, у растений при холодовом воздействии происходит разобщение дыхания и окислительного фосфорилирования, за счет накопления в митохондриях эндогенных жирных кислот, и переходу их в низкоэнергетическое состояние [55]. Важную роль в проницаемости мембран митохондрий играют ионы Ca^{2+} , при этом увеличение ионов Ca^{2+} и взаимодействие со свободными жирными кислотами (ЖК) приводит к открытию пор и набуханию митохондрий, это приводит к запуску запрограммированной гибели путем апоптоза [56,57].

Регулятор роста растений мелафен, в низких концентрациях (2×10^{-10} - 2×10^{-9} М), как было установлено, повышает устойчивость растений к стрессовым воздействиям. Ранее было показано, что в митохондриях, полученных из проростков гороха, семена которых подвергались воздействию холод - засуха, изменялось соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (ЖК) липидов митохондрий в сторону увеличения насыщенных ЖК. Предварительная обработка семян гороха мелафеном, в концентрации 2×10^{-12} М, предотвращала эти изменения в ЖК составе липидов мембран митохондрий [45].

Поскольку мелафен начинает широко использоваться в с/х, то в настоящее время встает вопрос о его влиянии на животные клетки. В работе Ерохина В.Н. и др. было проведено исследование по изучению влияния мелафена на рост асцитной карциномы Эрлиха [46,58]. За развитием опухолевого процесса следили по изменению размеров опухоли. Размер опухоли достоверно уменьшался у животных во всех экспериментальных группах (2×10^{-12} моль/кг, 2×10^{-9} моль/кг, 2×10^{-5} моль/кг) по сравнению с опухолью у животных в контрольной группе. Таким образом, мелафен замедляет рост опухоли, и можно предположить, что в животных клетках мелафен будет влиять на молекулярные мишени апоптоза.

Был проведен ряд экспериментов по изучению действия мелафена на митохондрии растительных и животных клеток и обнаружено [59], что антиоксидант мелафен в малых дозах предотвращал изменение в жирнокислотном составе митохондрий, оказывал существенное воздействие на микровязкость, уровень ПОЛ, активировал перенос электронов при окислении НАД-зависимых субстратов, а также изменял структурные характеристики мембран митохондрий гороха. Однако не было определено как меняется морфология митохондрий при стрессе в условиях незначительного охлаждения и засухи и оказывает ли мелафен существенное воздействие на морфологию митохондрии растительных клеток, после

предварительной обработки семян растений мелафеном в малых концентрациях.

1.6. Действие АТФ, фитогормонов и мелафена на растительные организмы

Фаттахов С.Г. и группа ученых при исследовании мелафена и при получении патента, определили, что наибольшее действие на рост культуры оказывает мелафен в концентрации 1×10^{-7} - $1 \times 10^{-8}\%$. Оказалось, что рострегулирующая активность препарата настолько высока, что сравнима с влиянием аденозинтрифосфата (АТФ) (в равных концентрациях) на этот процесс [60].

При сравнении влияния АТФ и препарата мелафен на скорость фотосинтеза также обнаруживается сходный эффект [61]. Экспериментальные данные на культуре хлорелла показали, что препарат мелафен имеет широкий спектр действия и обладает высокой физиологической активностью, сравнимой с различными проявлениями действия фитогормонов и АТФ в низких концентрациях [61].

Концепция АТФ и пуриновых производных как внеклеточных сигнальных молекул родилась в конце 1920-х и начале 1930-х годов, когда были обнаружены физиологические эффекты производных аденина [62]. АТФ является универсальным источником энергии для биохимических реакций всех живых организмов, а также играет другие важные роли в нескольких физиологических процессах. В клетках животных, АТФ хорошо известна в качестве внеклеточного сигнала в ряде клеточных реакций, таких как нейротрансмиссии, иммунный ответ, апоптоз и регуляции кровяного давления [63,64,65].

Главными пуриновыми соединениями в организме являются аденин, а также гуанин, ксантин и гипоксантин. При присоединении к ядру пуриновых оснований рибозы образуются нуклеозид - аденозин и при дальнейшем

фосфорилировании происходит образование АТФ (Рисунок 1.4.) [66].

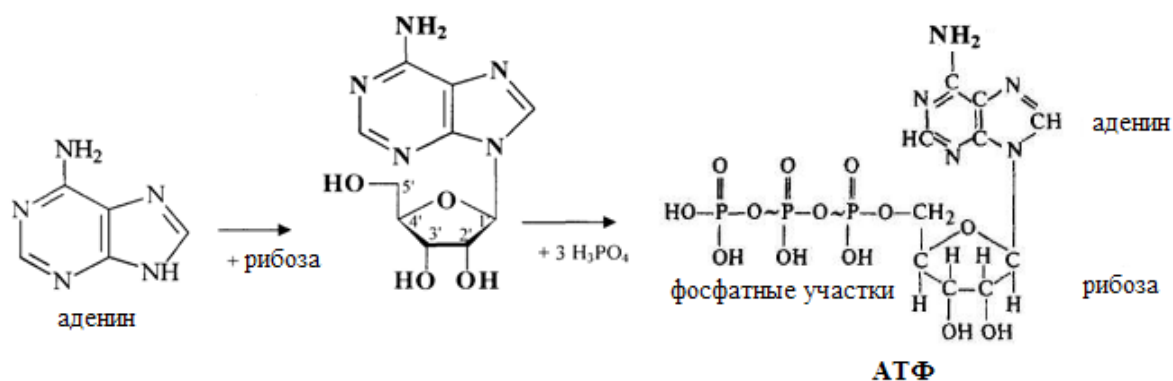


Рисунок 1.4. Фосфорилирование гидроксильной группы рибозы в положение 5' с получением аденозитрифосфорной кислоты [66]

Два основных семейства рецепторов АТФ, аденозина и аденина, так называемых пуринорецепторов (P1 и P2) были подтверждены в клетках животных [62].

Пуринорецепторы делятся на два класса: P1 или рецепторы аденозина и P2, которые узнают в первую очередь внеклеточный АТФ и АДФ. Рецепторы P2 в свою очередь подразделяются на два подкласса. P2X регулируют вход внеклеточного Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , H^+ и ионов металлов, таких как Zn^{2+} и/или Cu^{2+} . P2Y рецепторы (за исключением P2Y₁₂ и P2Y₁₃) связываются с гетеротримерным G белком и фосфолипазой, поднимая внутриклеточную концентрацию свободного кальция.

Освобождение АТФ из внутриклеточного пространства во внеклеточное происходит в основном во время клеточного стресса, воспаления и окислительного стресса и т.д. После высвобождения, АТФ может свободно связываться с P2X и P2Y рецепторами на той же клетке или соседних клетках. В эритроцитах, как обнаружено, имеется подтип пуринорецепторов P2X₇ и P2Y₁₃ [67,68,69]. Внеклеточный АТФ сигнал может быть передан через плазматическую мембрану внутрь клетки через специфические рецепторы нуклеотидов или пуринорецепторы. Сигнальные

процессы, индуцированные внеклеточной АТФ в клетках животных, включают производство активных форм кислорода (ROS) и окись азота (NO), увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и другие процессы [67,68,69,70].

По-видимому, пуриnergическая сигнализация в клетках животных и растений не совпадает, хотя некоторые клеточные ответы схожи в обеих системах [например повышенные уровни цитозольного свободного кальция, оксида азота (NO) и активных форм кислорода (ROS)].

Внеклеточный АТФ и другие нуклеотиды обсуждаются в биологии и медицине как сигнальные молекулы, опосредующие многочисленные животные клеточные процессы, в том числе нейротрансмиссию, иммунные реакции, клеточный рост и гибель клеток [71,72,73,74]. Установлено, что внеклеточный АТФ участвует в различных физиологических процессах при росте и развитии растений, в том числе росте корня растения [75,76], росте пыльцевой трубки [77], вегетативного роста [78], биотических / абиотических реакций на стресс [79,80,81,82].

Song, C.J. и другие исследователи [70,81] измерили уровень АТФ, который составил до 40мМ в клеточной жидкости, извлеченной из оторванных (раненых) участков растения (*Arabidopsis*), что свидетельствовало о важности внеклеточной АТФ при различных процессах, вызывающих лизис клеток. Такая роль внеклеточного АТФ сходна с его ролью в клетках животных, где она также играет важную роль в воспалительной реакции [83,84].

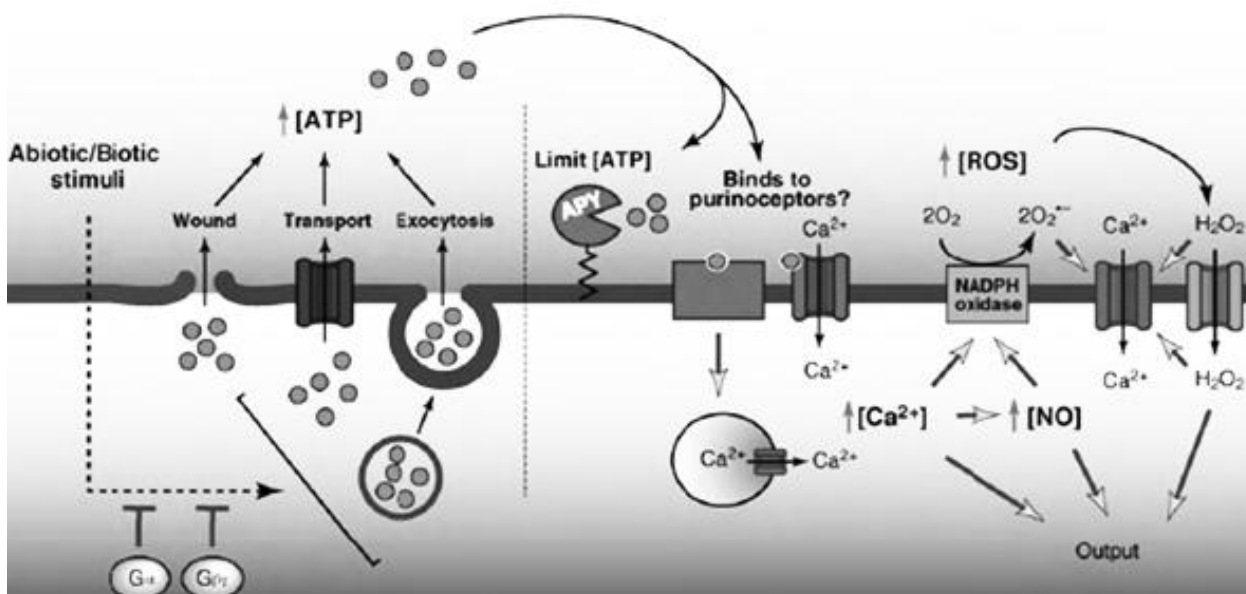


Рисунок 1.5. Предполагаемая схема внеклеточной АТФ сигнализации в растениях [84]

Как видно из рисунка 1.5, повышение уровня внеклеточного АТФ предположительно активирует внеклеточный механизм АТФ распознавания (предполагаемые пуринорецепторы), который в свою очередь может поднять цитозольную концентрацию Ca^{2+} . Это вызывает производство NO или АФК через активацию NADPH оксидазы. Вторичное увеличение внутриклеточного Ca^{2+} , является результатом активации Ca^{2+} притока, АФК, таких как O_2^- и H_2O_2 . Такое трио (NO, ROS, Ca^{2+}) активизирует клеточные сигнальные пути, которые ведут к индукции различных физиологических реакций, в том числе активацию экспрессии генов апоптоза [84].

Другие системы, а именно анионные и другие каналы, до сих пор недостаточно изучены в растениях. Если существуют пуринергические рецепторы в растениях, они либо являются уникальными или сильно расходятся с их животными аналогами.

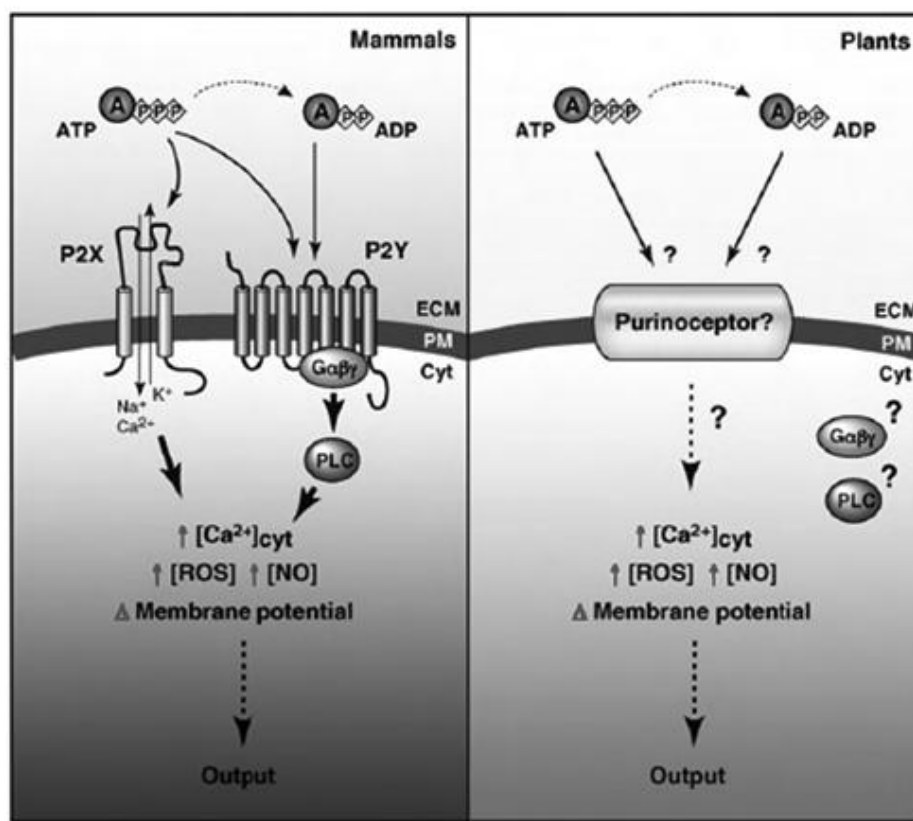


Рисунок 1.6. Сравнение известных пуринаргических сигнальных путей в клетках животных до гипотетического пути в растительных клетках [84]

Некоторые аспекты клеточных ответов, вызванные пуринаргическими раздражителями имеются у млекопитающих и растений, такие как повышение внутриклеточной концентрации кальция Ca^{2+} , ROS, NO и изменение мембранного потенциала. Однако, у млекопитающих, передача сигналов происходит через P2X ионотропные рецепторы и P2Y метаботропные рецепторы, через гетеротримерный G белок (G $\alpha\beta\gamma$) и фосфолипазу C (PLC), тогда как у растений пуринаргический рецептор (S) и точная роль гетеротримерного G белка не определены, но явно отличаются от существующих у животных [85]. Поэтому можно предположить, что растения узнают внеклеточную АТФ с помощью механизма, не связанного с классической моделью животного рецептора на мембране [86,87].

Для повышения качества и урожайности сельскохозяйственных культур, а также устойчивости к воздействию различных неблагоприятных

факторов внешней среды, часто используют синтетические регуляторы роста, а также природные фитогормоны. Аналоги природных фитогормонов должны быть безопасны для окружающей среды, животных и для здоровья человека, поэтому так важен поиск нетоксических соединений.

Экспериментально было показано, что таким препаратом является препарат мелафен, который обладает высокой физиологической активностью, сравнимой с природными регуляторами роста (кинетином), и сравним с действием АТФ в низких концентрациях. Авторы сделали вывод, что препарат играет не субстратную роль, а подобно фитогормонам (в том числе кинетину, зеатину) действует в ничтожно малых количествах, необходимых для запуска и регуляции физиологических и генетических программ, аналогичных действию АТФ [88]. Фитогормоны имеют определенные рецепторы в растительной клетке, благодаря которым они могут как активировать, так и замедлять функциональную активность клеток и вызывать как быстрые, так и медленные физиологические реакции. Быстрые физиологические реакции обычно связаны с воздействием фитогормонов на мембраны, а медленные зависят от синтеза белков и нуклеиновых кислот [89].

1.7. Влияние биологически активных препаратов на сигнальные системы и регуляторные пути апоптоза клеток

Механизмы действия новых антиоксидантов и регулятора роста растений еще недостаточно изучены, поэтому представляет интерес определить их влияние на клеточные системы и трансдукцию сигнала в животных клетках, тем более, что ранее было обнаружено, что мелафен, фенозан К и ИХФАН-10, по-разному влияют на Ca^{2+} регуляцию в клетках животных, вызывая флуктуацию их объема при введении АТФ [31,51].

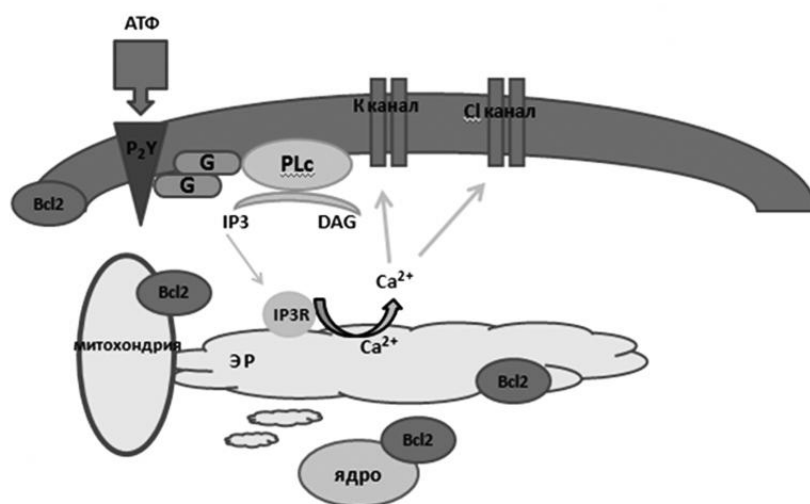


Рисунок 1.7. Активация Ca^{2+} - сигнальной системы введением АТФ

На рисунке 1.7 приведен механизм активации Ca^{2+} -сигнальной системы и роль G-белков, которые взаимодействуют со специфическими рецепторами, что приводит к активации Ca^{2+} -каналов на мембране. В цитоплазму начинает поступать кальций, что приводит к повышению цитоплазматической концентрации Ca^{2+} , активации Ca^{2+} - K^+ каналов и Ca^{2+} - Cl^- каналов. Концентрация ионов кальция в эндоплазматическом ретикулуме может достигать 10^{-3} моль, а в цитозоле составляет порядка 10^{-7} моль (в состоянии покоя). При действии инозитолтрифосфата (IP₃) и некоторых других стимуляторов, кальций высвобождается из эндоплазматического ретикулума путем облегченной диффузии.

Как и эндоплазматический ретикулум (ER), митохондрии способны связывать и освобождать ионы Ca^{2+} и тем самым модулировать кальций - зависимые сигнальные системы. Наконец, митохондрии могут также способствовать поддержанию кальциевого гомеостаза, поставляя АТФ в качестве топлива для плазматической мембраны и работы Ca^{2+} -АТФазы. Угнетение Ca^{2+} сигнализации способно вызвать апоптоз клеток, поскольку оказывает воздействие на транскрипционную активность белка контроллера апоптоза p53. Известно, что в клетке Ca^{2+} связывается с Ca^{2+} - связывающими

белками семейства S100, которые в свою очередь регулируют транскрипционную активность контроллера апоптоза белка p53 [28,90,91,92].

Апоптоз - это процесс запрограммированной гибели клеток, который может вызывать множественные процессы, в том числе внешние и внутриклеточные сигналы (химические, радиационные), и различные рецепторные системы [93]. В регуляции апоптоза участвуют, в том числе, такие белки как, белок - контроллер p53, так и белки семейства Bax и Bcl-2.

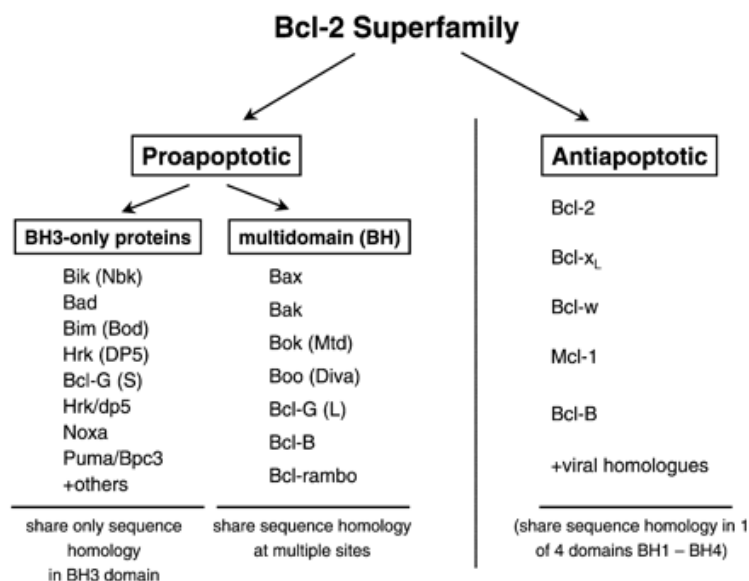


Рисунок 1.8. Члены суперсемейства Bcl-2 – основные регуляторы митохондриального пути индукции апоптоза [94]

Апоптоз в клетках взрослого организма происходит постоянно, удаляются нежелательные, злокачественные, зараженных вирусом или мутантные клетки. Замедление этого процесса может привести к образованию раковых опухолей. При использовании препаратов, регулирующих концентрацию кальция, либо активирующие (ингибирующие) различные протеинкиназы, можно регулировать процесс апоптоза в различных типах клеток [93].

Одним из наиболее мощных регуляторов апоптоза является опухолевый супрессор p53. Белок p53 активируется при наличии различных стрессовых

факторов и неблагоприятных воздействий, такие как повреждения ДНК, гипоксия и др. [95,96]. P53 активирует транскрипцию генов *Bax*, *apaf-1*, *fas* и подавляет транскрипцию генов *BCL2*. В регуляции апоптоза также участвуют гены *PIG*, чьи продукты вызывают оксидативный стресс, из-за них также нарушается проницаемость митохондриальной и ядерной мембран, экспрессия этих генов может быть повышена благодаря белку p53 [97]. P53 может напрямую активировать *Bax* и запускать программу апоптоза [98]. В свою очередь активность белков *BAX* регулируется белком *Bcl-2*.

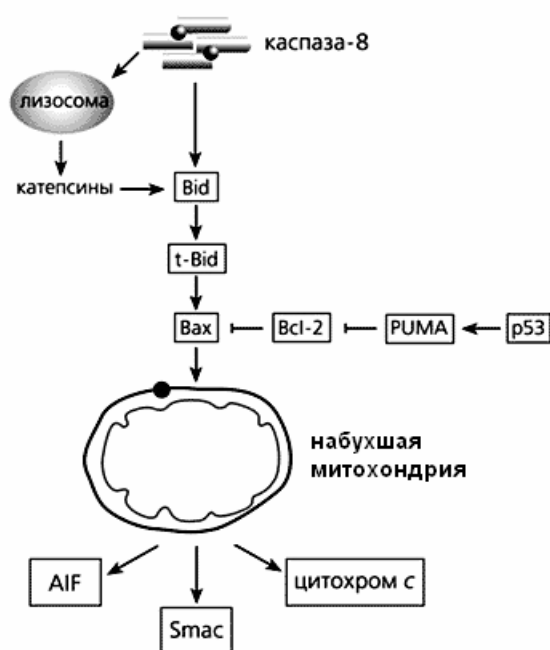


Рисунок 1.9. Схема последовательности включения участия ряда белков в проведении пути апоптоза по p53 активирующему механизму [99]

Функции p53 заключаются в непосредственном участии в репарации повреждений ДНК, p53 оказывает как про- так и анти - апоптозное действие, а также p53 участвует в индукции митохондриального пути клеточной смерти [100]. Считается, что белок-контроллер p53, находящийся в митохондриях, непосредственно участвует в процессе антиоксидантной защиты. Как уже упоминалось, определенное количество белка p53 участвует

в индукции апоптоза путем прямого взаимодействия с белками семейства Bcl-2. Однако, в митохондриях животных клеток, p53 не только вызывает апоптоз, но может способствовать выживаемости клетки, в том числе связываясь с митохондриальной ДНК полимеразой и усиливая репликацию митохондриальной ДНК [101].

Многие белки семейства Bcl-2 участвуют в регуляции выхода белков из митохондрий в цитоплазму. Большинство белков этого семейства расположено на внешней мембране митохондрий. Одновременное увеличение уровня белков Bcl-2 и p53 может свидетельствовать о преобладании процессов репарации над процессами апоптоза, в то же время снижение содержания антиапоптозного белка Bcl-2 будет говорить о включении последовательности процессов, которые могут привести к проапоптотическим изменениям.

Уровень содержания белка p53 в клетках возрастает при развитии лейкозов и используется для характеристики лейкозов и других злокачественных процессов, и служит показателем системного ответа организма на различные воздействия [102,103].

При лейкозе - системном злокачественном процессе, поражающем костный мозг с постепенным вытеснением нормальных ростков кроветворения, злокачественно трансформированные клетки - лейкоциты и лимфоциты, вероятно, циркулируют по всему пораженному организму, в том числе в крови и селезенке. Ранее были обнаружены сходные и соизмеримые изменения структурных характеристик ДНК как в селезенке, так и в лимфоцитах крови при хроническом лимфоидном лейкозе человека и крупного рогатого скота [104]. Белок p53, синтезируемый лимфоцитами, может попадать в сыворотку крови, а изменение уровня его содержания в крови и селезенке, вероятно, свидетельствует об изменении активности генов системы защиты генома. Увеличение содержания p53 было зарегистрировано ранее у мышей линии АКЭ [105]. Поэтому важно было определить, как

изменяется содержание антиапоптозных белков при введении изучаемых нами антиоксидантов. Исследование изменения содержания регуляторных белков апоптоза (Bcl-2 и p53) в клетках органов млекопитающих, под действием малых доз препаратов (мелафен, ИХФАН-10, фенозан К), может позволить прояснить механизмы их воздействия на организм животных и человека, но и определить возможные про- и анти- апоптотические эффекты действия этих БАВ. В соответствии с изложенным, мы проводили исследование по определению изменения содержания регуляторных белков p53 и Bcl-2 в нормальных и опухолевых клетках, в частности, в опухолевых клетках мышей лейкозной линии АКЭ, а также в клетках селезенки и крови мышей.

Установлено, что АО, в том числе ряд природных антиоксидантов, такие как теафлавины оказывали влияние на повышение экспрессии белка-регулятора p53 и белка Bax, способствовавшему апоптозу, при этом происходило снижение антиапоптозного белка Bcl-2 (кемпферол, ресвератрол). Это свидетельствовало о том, что АО могут влиять на сигнальные пути апоптоза [3].

Таким образом, в последние десятилетия механизм действия синтетических антиоксидантов, таких как мелафен, фенозан К и ИХФАН-10 довольно широко и интенсивно изучаются.

Исследование фенольных АО и применение их в профилактике и лечении онкологических, нейродегенеративных и других заболеваниях в настоящее время продолжает оставаться актуальным.

Обширные исследования по действию РРР мелафена на растительные клетки свидетельствуют о многоплановом воздействии и положительном его влиянии на рост и развитие растений. При изучении действия мелафена на метаболизм растительных клеток, значительная часть работ была посвящена изучению изменения ЖК состава митохондрий, разобщению дыхания и фосфорилирования, а также других энергетически значимых функций

митохондрий, которые были нарушены при стрессе и восстанавливались при действии малых доз мелафена. При этом изучение морфологических изменений самих митохондрий не проводилось, поэтому представляется важным установить, наблюдаются ли видимые изменения митохондрий в стрессовых условиях и при действии 2×10^{-12} М, при котором проявлялись его защитные свойства.

Поскольку препарат мелафен предложен для предпосевной обработки семян растений, то впоследствии он может оказывать воздействие на животный организм, однако работ по воздействию на животные клетки проводилось недостаточно.

Поэтому представляется важной задачей выяснение вопроса о влиянии мелафена как на растительные (митохондрии), так и на животные клетки, такие как эритроциты, которые могут подвергаться воздействию антибиотиков, лекарственных препаратов и АО, и транспортировать их по организму.

Эритроцит является универсальной моделью при исследовании структурно - функционального состояния мембран. Ранее было изучено действие на эритроциты таких АО, как ИХФАНЫ. Однако в этих работах действующая концентрация АО была довольно высока и составляла 10^{-4} М и при этом эксперименты проводились в системе *in vitro*. Были обнаружены существенные морфологические изменения эритроцитов. Поэтому представляет интерес провести работу по изучению действия ИХФАНов и мелафена на морфологию эритроцитов *in vitro* в широком диапазоне концентраций, начиная с малых доз (10^{-11} М), и параллельно провести исследование в системе *in vivo*, так как ранее наблюдалось биологическое действие этих АО именно в низких концентрациях.

В настоящее время существуют различные современные методы исследования биологических объектов, в том числе метод АСМ.

Метод позволяет сканировать объект наноразмерным зондом, непосредственным образом наблюдать сканированную поверхность и получать трехмерный рельеф (имидж) исследуемого объекта, а также использовать статистические методы при обработке АСМ имиджей. В связи с этим представляется важным изучить структурные изменения биологических объектов, таких как митохондрии и эритроциты методом атомно-силовой микроскопии.

В последние десятилетия большой интерес представляет исследование влияния малых доз БАВ на биологические системы. Показано, что даже в таких дозах как 10^{-12} и 10^{-11} моль, АО оказывают влияние на различные сигнальные системы, что в дальнейшем может приводить к изменению метаболизма растительных и животных клеток, ускорению роста и развития или к инициации процессов апоптоза клеток.

В проведенных ранее исследованиях было обнаружено, что мелафен вызывает экспрессию некоторых генов растений и активирует ряд сигнальных систем растительных и животных клеток [106], в то же время АО фенозан К и ИХФАН-10 в сверхмалых дозах влияют на Ca^{2+} -сигнализацию клеток [31]. Поэтому проведение работ по изучению влияния мелафена и фенольных АО на систему сигнальной трансдукции, репарации и апоптоза животных клеток, представляется необходимым и важным.

В связи с ростом использования различных синтетических антиоксидантов и других биологически активных соединений в с/х, медицине и фармакологии, выше обозначенные проблемы приобретают все большую остроту и актуальность.

ГЛАВА 2. МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Модель совместного действия недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения на субклеточные структуры растений

В качестве объектов исследования использовали митохондрии, выделенные из 5-ти дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum L.*), сорт Флора-2. Семена гороха промывали водой с мылом и 0.01% раствором KMnO_4 . Контрольную группу семян замачивали в воде, а опытную группу – в 2×10^{-12} М растворе мелафена. Длительность замачивания – 1 час. После этого семена переносили в закрытые кюветы на влажную фильтровальную бумагу, где они находились в темноте в течение 1 суток (22°C). Спустя сутки для половины семян, обработанных мелафеном, и половины контрольных семян создавали условия, моделирующие недостаточное увлажнение (НУ) при пониженной температуре (14°C). С этой целью семена переносили на сухую фильтровальную бумагу в открытые кюветы, где они находились при 14°C в течение двух суток (группы «НУ+ 14° » и «МФ+НУ+ 14° »). Затем все проростки данных групп переносили в помещение с температурой воздуха 22°C , и помещали в закрытые кюветы с увлажненной бумагой. Контрольная группа проростков в течение всего времени находилась при температуре 22°C с увлажненной бумагой. На 5-й день из проростков выделяли митохондрии. (Модель совместного действия недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения на проростки гороха была предложена сотрудником Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН – Генерозовой И.П. [107]).

2.2. Выделение митохондрий

Выделение митохондрий из 5-ти дневных эпикотилей проростков проводили методом дифференциального центрифугирования. При этом

эпикотили гороха длиной 3-6 см (20-25 г) гомогенизировали со 100 мл среды выделения, содержащей: 0,4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 8.0), 10 мМ KCl , 2 мМ дитиоэритрита и 0,1% БСА (свободный от жирных кислот). Гомогенат центрифугировали при 25000g в течение 5 мин. Второе центрифугирование - в течение 3 мин при 3000 g. Осаждение митохондрий проводили в течение 10 мин при 11000 g. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл среды, содержащей: 0.4 М сахарозу, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 0.1% БСА (свободный от жирных кислот), и вновь осаждали митохондрии при 11000 g в течение 10 мин [107].

2.3. Приготовление образцов для АСМ

Образцы митохондрий для атомно-силовой микроскопии готовили следующим образом. Митохондрии в буфере выделения (0.4 М сахароза, 20 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4), 0.1% БСА (свободный от жирных кислот)) наносили на поверхность кремниевой подложки и инкубировали 1 мин, затем поверхность подложки промывали тем же буфером, но без БСА. Далее наносили 2% глутаровый альдегид в буфере без БСА, и образец инкубировали 3 мин. Все процедуры проводили в мокром состоянии подложки. Затем промывали поверхность дистиллированной водой и подсушивали на воздухе.

Анализ АСМ изображений исследуемых митохондрий на подложке позволяет определять объем отдельных митохондрий. Объем митохондрий соответствует произведению площади сечения имиджа митохондрии на среднюю высоту данного имиджа в области сечения и определяется с помощью программы Image Analyzis по координатным данным и шагу сканирования. Сечение производили на высоте 30 нм.

Полученные образцы фиксированных митохондрий исследовали на приборе SOLVER P47 SMENA на частоте 150 кгц в полуконтактном режиме. Использовали кантилевер NSG11 с радиусом кривизны 10 нм. АСМ имиджи

митохондрий получали сканированием участков 5×5 мкм² и 10×10 мкм² [47,108,109,110,111,112,113].

2.4. Действие препаратов на эритроциты *in vivo*

В работе были прослежены изменения морфологии эритроцитов при введении мышам *in vivo* водных растворов мелафена, фенозан К, ИХФАН-10 в широком диапазоне концентраций.

В опытах использовали мышей двух линий (питомник «Столбовая»): белых беспородных мышей – самцов, 3 мес. возраста, весом 22-25 г. (в опытах с фенозаном К и ИХФАН-10), и линии balb/c (в опытах с мелафеном). Водные растворы препаратов вводили внутрибрюшинно мышам за 12 ч. до взятия крови (путем декапитации животного) и последующего исследования. В контроле, мышам за то же время вводили соответствующий водный раствор без препаратов. Концентрация исследованных веществ рассчитывалась на объем (массу) животного. Время воздействия препаратов составило 12 ч и выбиралось из предположения, что произойдет распределение исследуемых веществ и не будет полного выведения из организма.

2.5. Выделение эритроцитов

Забор крови производили от предварительно наркотизированной эфиром мыши посредством ее декапитации. В качестве антикоагулянта использовали 0,11 М раствор цитрата натрия. Кровь собирали в склянку, куда предварительно добавляли раствор антикоагулянта, соблюдая соотношение цитрат/кровь – 1:5. Кровь центрифугировали в течение 7 мин. при 1500g. Плазму декантировали. Осадок эритроцитов осторожно ресуспендировали в изотоническом растворе NaCl, содержащем глюкозу (0,15 М NaCl, 10 мМ глюкоза, 5mM Na-фосфатный буфер, pH 7.4). Операцию центрифугирования повторяли троекратно. После каждого центрифугирования супернатант

декантировали, осадок эритроцитов ресуспендировали в новой порции изотонического раствора NaCl, содержащем глюкозу.

2.6. Приготовление образцов эритроцитов для АСМ исследования

Для выделения эритроцитов использовалась кровь мышей, полученная после декапитации животного.

Для приготовления воздушно сухих образцов проводили фиксацию эритроцитов 2% глутаровым альдегидом в течение 30 мин в среде выделения. Затем эритроциты трехкратно отмывали дистиллированной водой. АСМ образцы готовили путем воздушного высушивания суспензии эритроцитов на кремниевой подложке.

АСМ сканирования эритроцитов проводили на площади 25×25 мкм в различных участках исследуемого препарата фиксированных эритроцитов многократно для получения порядка 100 имиджей изолированных эритроцитов в каждой исследуемой точке на графике [114,115].

Площадь АСМ имиджа эритроцитов (S_{cp}) определяли на полувысоте эритроцитов, среднюю высоту (Z_{cp}) АСМ имиджа определяли как интегральное значение высоты в пределах площади АСМ имиджа. Объем АСМ имиджа эритроцитов - V_{cp} , S_{cp} и Z_{cp} получали с использованием программы Image Analysis для АСМ. Опыты для каждого исследуемого соединения повторяли на разных мышах трижды. Полученные данные суммировались и обрабатывались используя программу "Statistica 6" с 95% доверительным интервалом, обозначенным на графиках [114,115,116].

2.7. Метод АСМ (атомно - силовая микроскопия)

В медицине, биологии и фармакологии большое применение находит метод атомно-силовой микроскопии, из-за ряда своих преимуществ перед электронной и оптической микроскопией. С помощью атомно-силового микроскопа можно получать трехмерный рельеф исследуемой поверхности.

Измерения с помощью подобного микроскопа возможно производить как на воздухе, так и в жидкости, вакууме.

Благодаря АСМ можно не только видеть клетки в трехмерном виде, но и наблюдать за их функциональным состоянием. Поскольку в АСМ можно выбирать различные режимы, то возможно измерять вязкость, упругость и другие свойства мембран клеток [49]. Работа АСМ микроскопа основана на учете сил взаимодействия измеряемой поверхности и кантилевера системой обратной связи в зависимости от типа и режима измерения. Сканирование в плоскости параллельной поверхности объекта (XY) осуществляется пьезоподвижками, расположенными либо в столике, перемещающем объект сканирования, либо в системе управления кантилевером, где располагается перпендикулярная (Z) пьезоподвижка [117]. В зависимости от выбора взаимодействия в системе обратной связи кантилевера существует несколько режимов работы АСМ. В случае биологических объектов в основном используют полуконтактный режим, позволяющий при измерении оказывать минимальное давление на объект [118]. Сканирование в плоскости XY производится пошагово, в зависимости от типа сканера, который имеет 256, 512, 1024 шага по X и Y координате. При этом взаимодействие с объектом кантилевера удерживается системой обратной связи, по Z координате на постоянном уровне в зависимости от выбранного режима измерения. Разрешение АСМ зависит от радиуса кривизны кантилевера, чаще всего порядка 10нм, температуры измерения. По Z координате при комнатных температурах разрешение порядка 1нм.

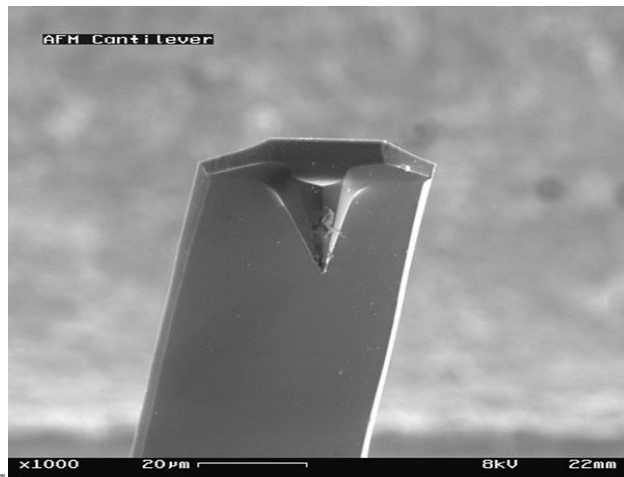


Рисунок 2.1. Основной элемент - АСМ-зонд [119]

В нашей работе использовали прибор SOLVER P47 SMENA, где объект исследования располагается на столике в нижней части прибора на системе подвода. XYZ пьезоподвижки расположены в верхней головке в системе управления кантилевером.

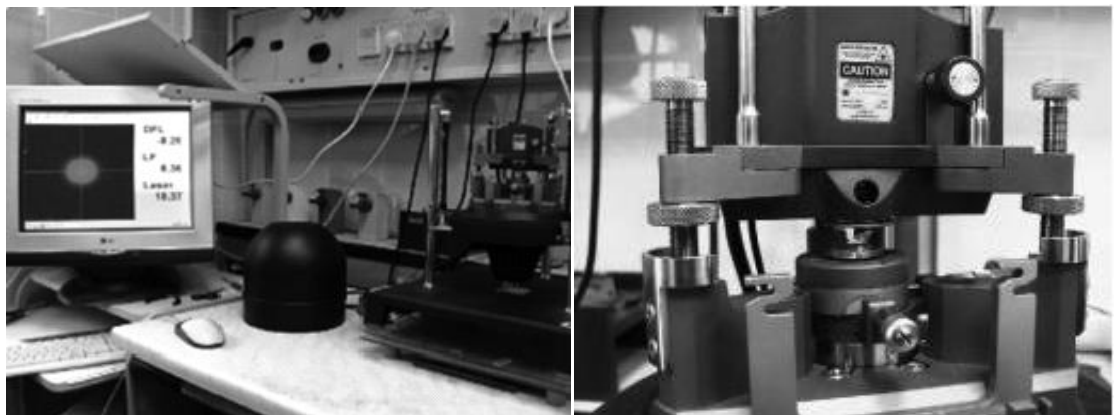


Рисунок 2.2. Прибор SOLVER P47 SMENA и измерительная часть - «SMENA» прибора SOLVER P47 SMENA

2.8. Анализ АСМ имиджей митохондрий

Анализ АСМ изображений исследуемых митохондрий на подложке позволяет определять объем отдельных митохондрий. Объем имиджа митохондрий соответствует произведению площади сечения имиджа митохондрии на среднюю высоту данного имиджа в области сечения и

определяется с помощью программы Image Analyzis для АСМ по координатным данным и шагу сканирования 256. Сечение производили на высоте 30 нм. При этом можно получить и другие параметры - среднюю высоту и площадь АСМ имиджа в области сечения митохондрий. При анализе и обработке массива данных использовали программу Statistica 6. Для расчета брались одиночные митохондрии [108,109].

2.9. Количественный анализ АСМ имиджей эритроцитов

Площадь АСМ имиджа эритроцитов (S_{cp}) определяли на полувысоте эритроцитов, среднюю высоту (Z_{cp}) АСМ имиджа определяли как интегральное значение высоты в пределах площади АСМ имиджа. Объем АСМ имиджа эритроцитов - V_{cp} , S_{cp} и Z_{cp} получали с использованием “AFM Image Analysis”. Опыты для каждого исследуемого соединения повторяли на разных мышцах трижды.

Полученные данные суммировались и обрабатывались используя “Statistica 6” с 95% доверительным интервалом, обозначенным на графиках [114,115].

2.10. Метод иммуноблоттинга

Метод иммуноблоттинга основан на комбинации гель-электрофореза и иммунохимической реакции «антиген-антитело». Он включает 4 основных стадии: разделение смеси белков методом гель-электрофореза с ДДС-Na, перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану, блокирование неспецифических связываний, детекция - определение белков с помощью специфических антител.

2.10.1. Электрофорез

Физический принцип метода иммуноблоттинга и электрофореза заключается в переносе заряженных макромолекул в электрическом поле.

При электрофорезе могут быть использованы разные носители белков - гелевые среды, бумага, жидкостные среды или капилляры. Гелевые среды на основе акриламида могут иметь различную степень сшивания гелей. Концентрация акриламида определяет разрешающую способность геля, что позволяет разделять белки разной молекулярной массы. Величина и знак заряда макромолекул зависит от pH среды.

Благодаря обработке белковой смеси додецилсульфатом натрия (10% ДДС) перед началом электрофореза, белки получают суммарный отрицательный заряд, при этом анионный детергент ДДС связывается с белками в соотношении 1.4 мг ДДС/мг белка. ДДС разрушает нековалентные связи, приводя к денатурации белков. Обработка белков препаратом 2-меркаптоэтанолом или дитиотриэтолом (ДТТ), приводит к дальнейшей денатурации белков, разрушению S-S связей и белковых комплексов. Вследствие этого подвижность белков в полиакриламидном геле после электрофореза определяется размером белка, т.е его молекулярной массой: высокомолекулярные комплексы движутся медленнее, чем низкомолекулярные. Это означает, что по относительной подвижности белка в геле, может быть определена молекулярная масса белков [120].

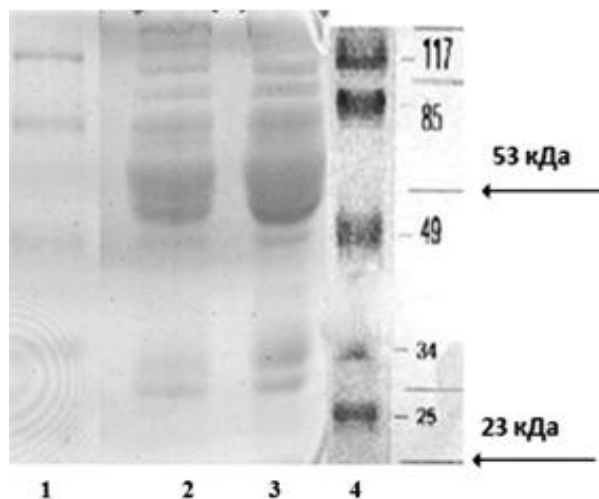


Рисунок 2.3. Гель с полосами белков, оставшихся после электрофореза и переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану, окрашенный красителем

coomassie blue R-250. Сопоставление электрофореза белков свидетелей (колонка 1- после переноса), и стандартных белков (колонка 4- до переноса). Колонки 2,3 - белки опухолевых клеток мышей АКЭ

Электрофорез проводили в 10% ПААГ, содержащем ДДС-Na с помощью источника питания BioRad при токе 10 мА.

2.10.2. Перенос белков с ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану

Белковые препараты наносили в растворе, содержащем отрицательно заряженный краситель - бромфеноловый синий, в его состав входят два дибромфенольных остатка. Реагент для окрашивания гелей с белками содержал 0,1% coomassie blue R-250, 40% этанол, 10% этанол, 10% уксусной кислоты. Для отделения несвязанного с белком красителя гель многократно отмывали или проводили 5 мин. кипячение. Содержание белков в полосах гелей определяли по интенсивности окраски в полосах регистрируемых на сканере с помощью специальной программы BMP SCAN в относительных единицах.

2.10.3. Блокирование неспецифических связываний

Эффект блокирования достигается инкубацией мембраны в разбавленном растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) с небольшим процентом детергента Tween. БСА связывается с мембраной в тех местах, где нет исследуемого белка. В результате антитела при их добавлении могут связываться только со специфичными сайтами связывания на исследуемых белках. Блокирование позволяет достигать чистого фона и исключает получение ложноположительных результатов.

2.10.4. Детекция белков

Белки p53 и Bcl-2 детектировали с использованием специфических антител методом «сэндвича». Вначале детектируемый белок связывается с

первичными антителами, на которые сверху накладывается вторичное антитело (принцип сэндвича). Вторичное антитело, в свою очередь конъюгировано с ферментом - пероксидазой хрена. Определение концентрации белков проводили коммерческими наборами, в частности, проявляющим набором AEC Staining Kit (Sigma-Aldrich). Визуализация исследуемого белка достигалась путем проведения пероксидазной реакции с образованием продукта, который определяется денситометрически по специфическому окрашиванию.

На рисунке 2.4 представлена (блот) нитроцеллюлозная мембрана с полосами белков клеток АКЭ, обработанная избытком антител на Bcl-2.

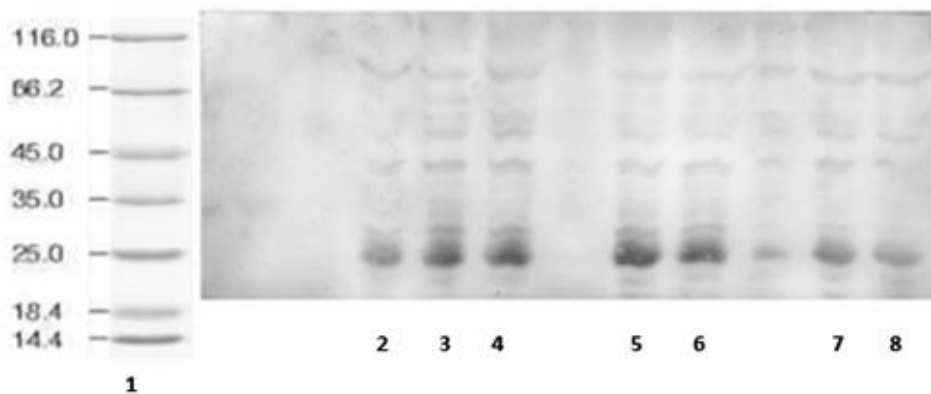


Рисунок 2.4. Детектирование полос белков клеток АКЭ антителами на Bcl-2 на нитроцеллюлозной мембране, первая колонка - белки - свидетели, остальные колонки - белки опухолевых клеток мышей АКЭ

Для определения белка p53 методом иммуноблоттинга в клетках АКЭ (асцитной карциномы Эрлиха) использовали специфические антитела к белку p53: FL-393 (“Santa Cruz”, США), в качестве второго антитела, меченные пероксидазой хрена антитела “sc-6243” (фирмы “Sigma-Aldrich”).

Содержание белка Bcl-2 в препаратах определяли как методом иммуноблоттинга, так и методом дот-блоттинга. В качестве первого антитела использовали моноклональные антитела “Monoclonal Anti-BCL-2 clone10C4”,

второго антитела - меченный пероксидазой хрена иммуноглобулин anti-rabbit IgG (“Sigma”).

Определение концентрации белков проводили проявляющим набором АЕС Staining Kit (“Sigma-Aldrich”). Для определения положения белков использовали окрашенные стандарты “SDS Protein standards” фирмы “Sigma”. Плотности полос белков на мембране, определяли путем сканирования мембраны и использования программы BMP Scale.

Результаты были обработаны с помощью программы Statistica, версия 6.0. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

2.11. Опухолевые и низкораковые линии мышей

Опыты с препаратом мелафен проводили на 3х - месячных мышак-самках лейкозной линии АКЭ. Мыши линии АКЭ являются носителями вируса Т- лимфоцитарного лейкоза Гросса, который проявляется клинически в возрасте 5-6 мес. Развитие лейкоза у мышей линии АКЭ в возрасте 5-9 месяцев сопровождалось конформационными изменениями ДНК, динамика которых в клетках тимуса и селезенки была практически одинакова [121, 122,123].

При изучении влияния малых доз мелафена на факторы индукции и ингибирования короткоживущей опухоли АКЭ *in vitro*, препарат мелафен, в концентрации 10^{-10} М, вводили в суспензию опухолевых клеток мышей АКЭ и инкубировали - 0 часа, 0,5 часа и 1,5 часа. Клетки АКЭ были взяты на 7-е сутки после перевивки опухоли, и обладают полной системой трансдукции. В гомогенате клеток, полученного после неоднократного замораживания и размораживания в изотоническом растворе, и последующего центрифугирования, методом иммуноблоттинга определяли содержание белков p53 и Bcl-2.

На мышак - гибридах низкораковой линии F1(СВА×С₅₇В1) массой 19-20 г, проводили эксперименты по определению влияния антиоксиданта

фенозана К. Контрольная, как и опытная группа, состояла из 8-10 особей. В опытах проводилось 4-х дневное введение препарата фенозан К, максимальная концентрация в организме не превышала до 10^{-14} или 10^{-4} М/кг. Контрольным животным вводили соответствующий водный раствор, без фенозана К. Через 1 сутки проводили определение количества белка Vcl-2 в белковых экстрактах селезенки мышей.

Эксперименты по влиянию ИХФАН-10 проводили на мышах-гибридах низкорактовой линии F1(CBA×C₅₇Bl) массой 19-20 г.

При проведении эксперимента по изучению действия ИХФАН -10 *in vitro*, антиоксидант в концентрации 10^{-8} моль/к инкубировали с гепариновым препаратом крови мышей F1 в течении 1 часа, затем отделяли сыворотку крови, и, методом иммуноблоттинга определяли содержание белка Vcl-2 в контрольных и в опытных образцах.

Исследование по изучению влияния препаратов мелафен, фенозан К и ИХФАН-10 на эритроциты выполнялись на белых беспородных мышах (питомник Столбовая) методом АСМ.

2.12. Определение перекисного окисления липидов флуоресцентным методом

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом. Липиды экстрагировали из митохондрий, содержащих 3-5 мг белка, смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему). Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол составляло = 1:10. Митохондрии гомогенизировали в течение 1 мин при температуре 10°C, затем к смеси добавляли равный объем дистиллированной воды, быстро смешивали и переносили в 12 мл центрифужные стаканы. (Промывание водой необходимо для удаления флавиновых компонентов, имеющих максимум флуоресценции в области 520 нм). Центрифугировали в течение 5 мин при 600 g. Отбирали 3 мл нижнего (хлороформного) слоя и добавляли

0,3 мл метанола. Регистрацию флуоресценции проводили в десятимиллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0,3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции была 360 нм, испускания – 420-470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции пересчитанных на мг белка. Регистрацию спектров флуоресценции продуктов ПОЛ мы проводили на спектрофлуориметре FluoroMax-HoribaYvon GmbH (Германия) Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ.

ГЛАВА 3. Исследование действия рострегулятора мелафена на структурные характеристики растительных органелл и животных клеток, и на индукцию белков пути апоптоза в клетках мышей линии АКЭ.

3.1. Влияние мелафена на морфологию митохондрий проростков гороха при стрессовых воздействиях

Протекторные свойства мелафена исследовали на модели недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения семян растений. Данная модель была выбрана потому, что в обычных условиях растительный организм подвергается не одному, а сразу нескольким факторам воздействия. Кроме того, известно, что недостаточное увлажнение приводит к снижению функциональной активности митохондрий и хлоропластов.

В работе для изучения влияния регулятора роста растений мелафена, были проведены эксперименты по предварительной обработке семян гороха раствором препарата в концентрации 2×10^{-12} М и дальнейшему их проращиванию в стрессовых условиях: при совместном действии недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения (НУ+14⁰С).

На рисунках 3.1 - 3.3 представлены АСМ имиджи митохондрий, некоторые участки двумерных и трехмерных изображений АСМ имиджей в различных областях сканирования от 2×2 мкм² до 10×10 мкм². На рисунке 3.1. (а), (г) представлены АСМ изображения митохондрий в контроле, где можно наблюдать делящиеся митохондрии. Было обнаружено, что, в группе НУ+14⁰С (Рисунок 3.1 (в), (е)) наблюдаются увеличенные в размерах одиночные митохондрии, в то время как при предварительном введении мелафена, в группе МФ+НУ+14⁰С, которая представлена на рисунке 3.1 (б), (д) размерные параметры митохондрий приближаются к контрольным и вновь наблюдается деление митохондрий [108,109,110,111,112,113].

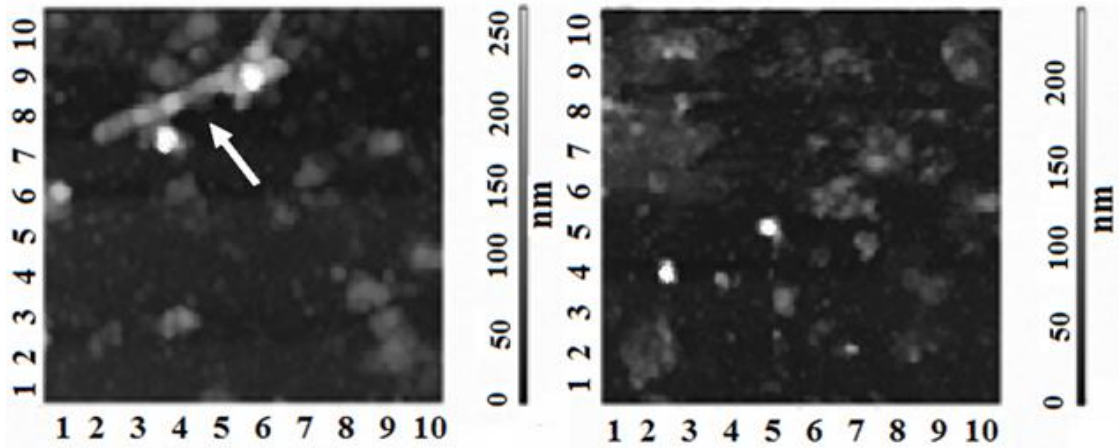
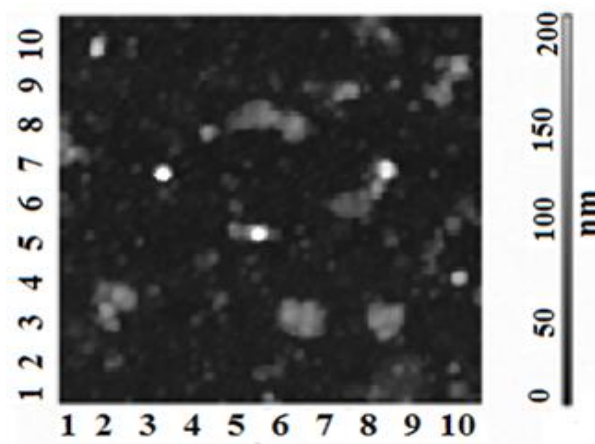
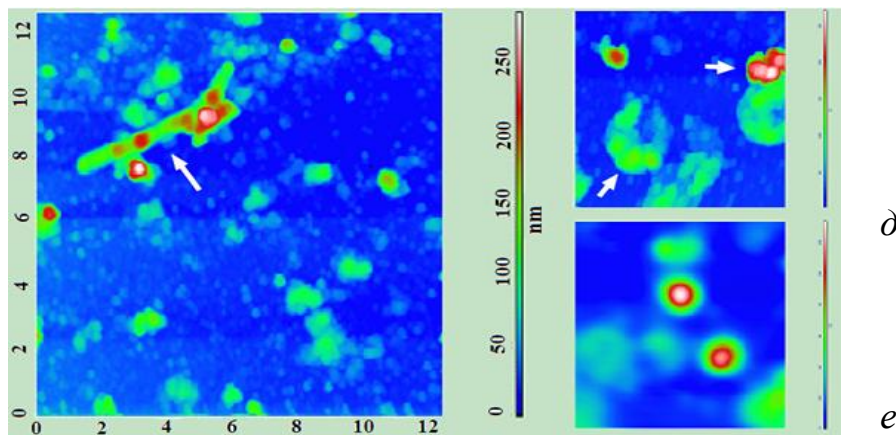
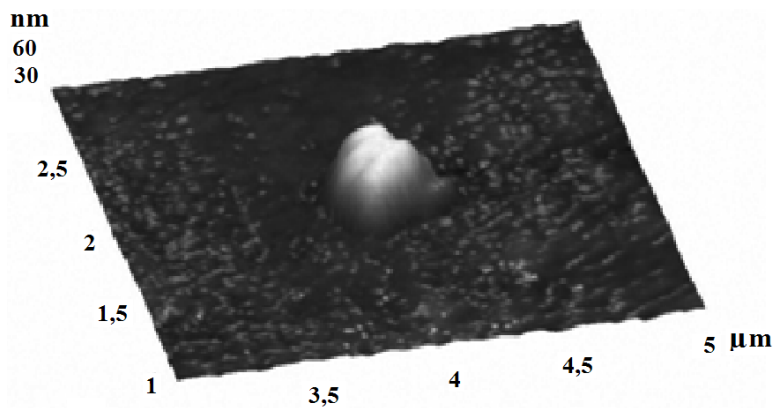
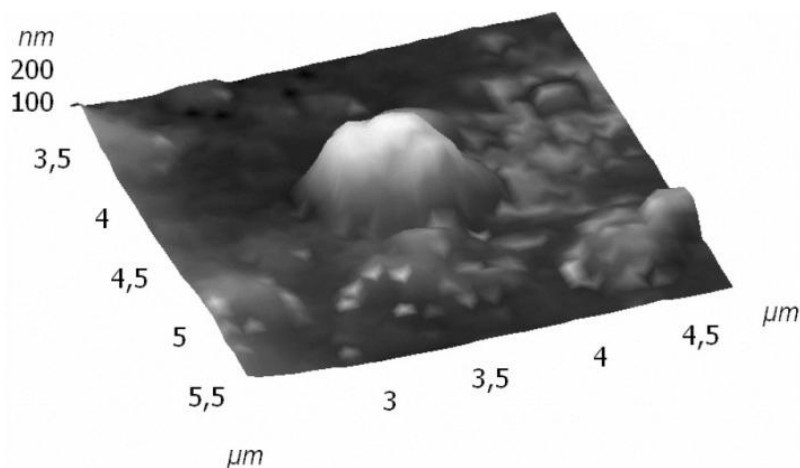
*a**б**в**д**е**з*

Рисунок 3.1. Двумерное АСМ изображение митохондрий ($10 \times 10 \text{ мкм}^2$) из 5-ти дневных проростков гороха в контроле – (а, г), в группе МФ+НУ+ 14^0С – (б, д), в группе НУ+ 14^0С – (в, е) (делящиеся митохондрии указаны стрелками)

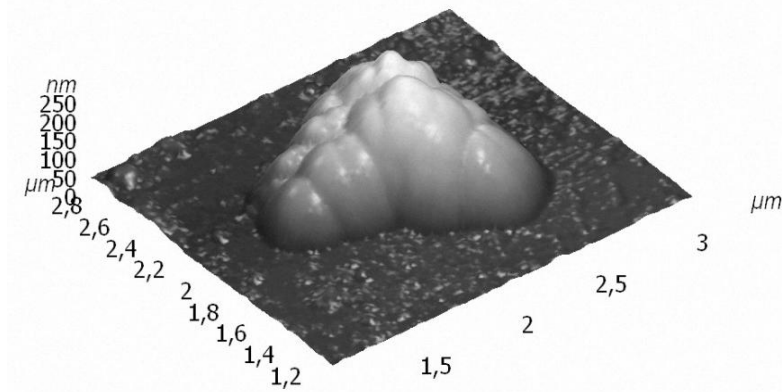
При рассмотрении в увеличенном масштабе, представлены трехмерные изображения одиночных митохондрий в области сканирования $2 \times 2 \text{ мкм}^2$ (x (мкм), y (мкм), z (нм)), в том числе в контроле (Рисунок 3.2 (а)), при воздействии НУ+14⁰С (Рисунок 3.2 (б), (в)), и при предварительном воздействии МФ+НУ+14⁰С (рисунок 3.3 (а), (б)), видно, что данные воздействия приводили к существенному изменению АСМ имиджей митохондрий 5-ти дневных проростков гороха. Так, (Рисунок 3.2.(б)), при воздействии НУ+14⁰С наблюдается увеличение размеров митохондрий по сравнению с контрольными (рисунок 3.2. (а)), а также сильно набухшие митохондрии (Рисунок 3.2 (в)), имиджи которых не учитывались при статистической обработке.



а



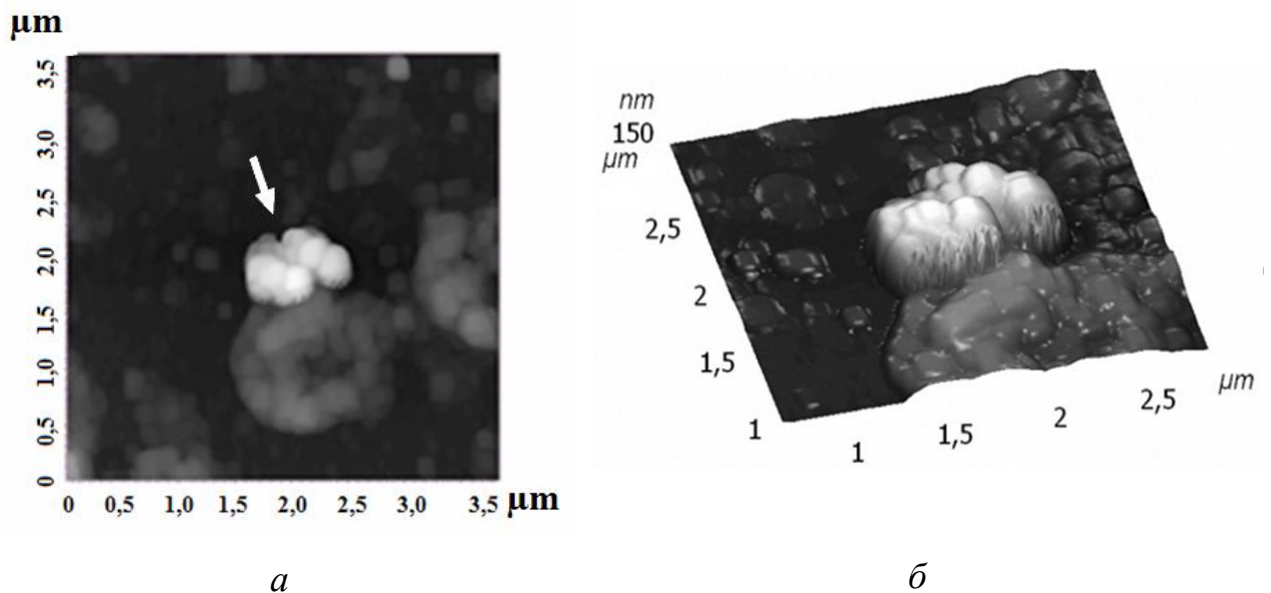
б



в

Рисунок 3.2. АСМ изображение в области сканирования 2×2 мкм² (x (мкм), y (мкм), z (нм)), одиночной митохондрии, выделенной из проростков гороха контрольной группы – (а), из группы НУ+14⁰С – (б), (в)

В группе митохондрий (Рисунок 3.3 (а), (б)) после предварительной обработки семян гороха раствором препарата мелафен в концентрации 2×10^{-12} М (МФ+НУ+14⁰С), можно наблюдать группу делящихся митохондрий (указано стрелкой).



а

б

Рисунок 3.3. АСМ имидж группы митохондрий из проростков гороха при воздействии мелафена: МФ+НУ+14⁰С в плоскости – (а) в области сканирования $3,5 \times 3,5$ мкм² и в объеме – (б) в области сканирования 2×2 мкм² (x (мкм), y (мкм), z (нм)).

Далее был проведен статистический анализ трехмерных АСМ изображений митохондрий, выделенных из 5-ти дневных проростков гороха при разных условиях выращивания, и построены гистограммы объема и площади, которые были аппроксимированы нормальным распределением. На рисунке 3.4 и в таблице 1 приведены средние значения объема ($V_{\text{ср}}$) и площади сечения ($S_{\text{ср}}$) (на высоте 30 нм) АСМ имиджей митохондрий проростков гороха в разных условиях проведения опыта.

Таблица 1. Влияние совместного действия дефицита влаги, умеренного охлаждения и мелафена (2×10^{-12} М) на изменение объема АСМ имиджа митохондрий проростков гороха.

Варианты опыта	$V_{\text{ср.}}$ (мкм) ² × нм	+95% (мкм) ² × нм	-95% (мкм) ² × нм
контроль	81,05	92,11	69,99
МФ+ НУ+14 ⁰ С	86,43	94,51	78,38
НУ+14 ⁰ С	115,13	127,23	103,03

Примечание. $V_{\text{ср.}}$ - среднее значение объема, +95% - верхняя и -95% - нижняя граница доверительного интервала для среднего значения.

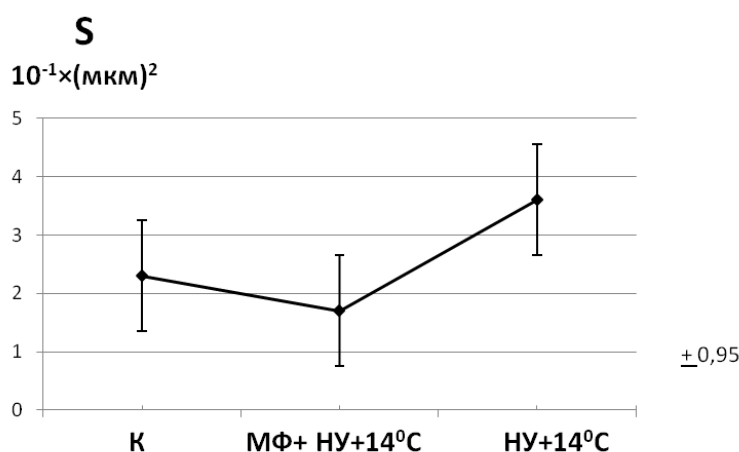


Рисунок 3.4. Изменение площади АСМ имиджа митохондрий проростков гороха в контроле (К), под влиянием совместного воздействия дефицита влаги, и умеренного охлаждения (НУ+14⁰С) и мелафена (2×10^{-12} М) (МФ+НУ+14⁰С)

Как видно из таблицы 1 и рисунка 3.4, при проведении опытов в условиях НУ+14⁰С происходило увеличение среднего значения объема до 115,1 мкм²×нм и средней площади до 3,6×10⁻¹мкм² митохондрий по отношению к контролю (V=81,0 мкм²×нм, S=2,3×10⁻¹мкм²). При предварительном воздействии мелафена (МФ+НУ+14⁰С) соответствующие характеристики (V=86,4мкм²×нм, S=1,7×10⁻¹мкм²) приближались к контрольным значениям.

Таким образом, средние значения АСМ имиджей митохондрий проростков гороха, подвергшихся двухдневному воздействию недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения, существенно изменялись и отличались от контрольных образцов. При этом наблюдалось увеличение размерных параметров имиджа митохондрий, и значительное число набухших митохондрий, а число делящихся митохондрий существенно уменьшалось. Однако, предварительное замачивание семян в растворе мелафена (2×10⁻¹² М) предотвращало изменения геометрических параметров митохондрий находящихся в условиях НУ+14⁰С и эти параметры были близки к контрольной группе. Процесс набухания митохондрий растений при стрессовых воздействиях в последнее время привлекает особое внимание, поскольку может явиться началом процесса апоптоза растительной клетки [108,109,110,111,112,113]. Об этом свидетельствуют данные Logan D.C. и Scott I, которые были получены при обработке листьев *Arabidopsis thaliana* метил-виологеном [40].

Поскольку стрессовые воздействия приводят к смещению антиоксидантно-прооксидантного равновесия и увеличивают содержание АФК, что может приводить к повреждению клеточных структур, а основным источником АФК являются митохондрии [57,107], то можно предположить, что при сочетанном воздействии умеренного охлаждения и недостаточного увлажнения в клетках проростков гороха, вероятно, происходило увеличение

генерации АФК с последующим набуханием митохондрий, а действие мелафена могло снижать уровень АФК.

Взаимодействие АФК с полиненасыщенными жирными кислотами, входящими в состав липидов мембран, такими как линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты, могут приводить к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) [124]. Поэтому в работе было изучено влияние совместного действия умеренного охлаждения и недостаточного увлажнения в мембранах митохондрий проростков на перекисное окисление липидов (ПОЛ). Для этого была измерена интенсивность флуоресценции перекисного окисления липидов (ПОЛ), экстрагированных из митохондрий смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему).

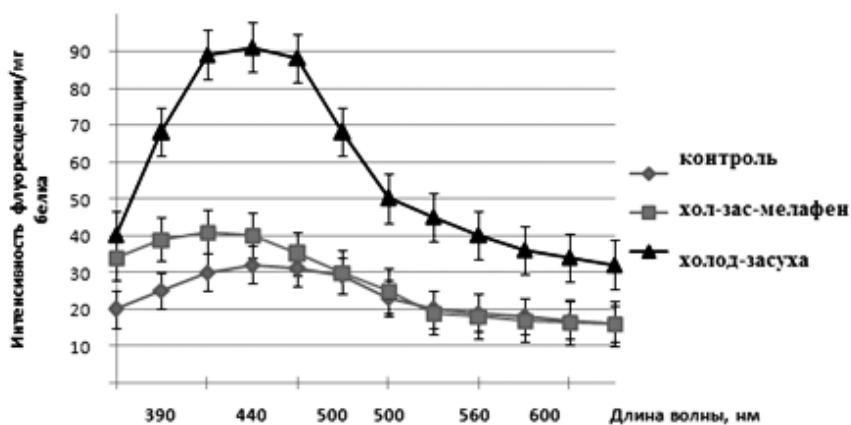


Рисунок 3.5. Спектры флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий проростков гороха в условиях действия недостаточного увлажнения с умеренным охлаждением и обработки семян гороха мелафеном [107]

Обнаружено (Рисунок 3.5), что при стрессовом воздействии наблюдалась активация ПОЛ, при этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ возрастала в 2,5-3 раза относительно контроля. Предварительное замачивание семян в 2×10^{-12} М растворе мелафена с последующим воздействием НУ+14⁰С, приводило к снижению содержания продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий: интенсивность флуоресценции

продуктов ПОЛ снижалась почти до контрольного уровня, что согласуется с действием ряда антиоксидантов при стрессовых воздействиях [107].

Таким образом, предварительная обработка семян мелафеном в низкой концентрации, перед воздействием холод-засуха предотвращала изменение морфологии митохондрий. Согласно нашим данным, защитный эффект мелафена, вероятно обусловлен его антиоксидантными свойствами и снижением интенсивности процессов свободно-радикального окисления, что возможно, находило отражение в предотвращении активации ПОЛ и сохранении морфологии митохондрий.

Существуют различные объяснения действия малых доз биологически активных соединений на исследуемые объекты, учитывающие механизмы усиления сигнала (амплификации). В ряде работ обсуждается возможность образование кластеров молекул вещества (мелафена) с молекулами воды в разбавленных растворах, что меняет свойства препарата. Так, в последнее время развивается представление, что при введении ряда веществ в малых дозах в водной среде образуются нанокластеры, наноассоциаты, что может способствовать накоплению их в мембране в липидной или белковой зонах и усиливать их воздействие на определенные мишени в мембране [50].

С другой стороны, появились данные о том, что при введении некоторых мембранотропных препаратов стимулируется образование островков микрогетерогенности, вблизи так называемых рафтов (ассоциатов липидов и белков), что также может приводить к амплификации действия этих веществ на регуляторную и транспортную функцию белков вблизи таких зон [125].

3.2. Сигнальные свойства мелафена

При изучении эффектов действия мелафена было обнаружено, что он относится к тем специфическим химическим факторам, которые способны в

сверхнизких концентрациях регулировать рост растительной клетки. Ответные реакции клеток растений на действие препарата мелафен объясняются в ряде работ воздействием на сигнальные системы клеток, которые с помощью различных рецепторов на мембранах способны усиливать действие сигнальной молекулы в 100-1000 раз, вызывая клеточный ответ [106]. Существует предположение, что мелафен действует подобно внеклеточной АТФ при контакте с внешней мембраной растительных клеток и вызывает усиление роста и деления. Ранее, в ряде работ было показано, что мелафен в растениях обладает сигнальными свойствами, сходными с действием молекулы АТФ, а также природными фитогормонами, такими, как кинетин, основной функцией которых является стимулирование роста и деления клеток [60, 63, 78, 96, 99].

Как следует из рисунка 3.6, где представлены структурные модели молекулы АТФ, мелафена и одного из аденин содержащих цитокинов - кинетина, наблюдается сходство по расположению зарядов на поверхности, доступной для молекулы воды, в области пуриновых групп с адениновой частью молекулы АТФ, кинетина и мелафена. Поэтому, можно предположить, что мелафен может связываться с некоторыми регуляторными нуклеотид - связывающими участками аденин (пурин), и вызвать ответ ряда сигнальных систем растительных и животных клеток. В частности, как упоминалось ранее, в животных клетках мышей АКЭ мелафен оказывает влияние на P2Y метаботропные рецепторы, отвечающие на связывание АТФ или аденозина на поверхности клеток в сверхнизких концентрациях, вызывая изменение Ca^{2+} -ответа [126].

Рядом авторов предполагается, что защитный эффект препарата обусловлен его антиоксидантными свойствами, при этом эффективная константа скорости взаимодействия мелафена с пероксидными радикалами K_7 в МО модели довольно велика и составляет $1.64 \times 10^6 (Ms)^{-1}$, в то время как меламина (компонента в молекуле мелафена) K_7 составляет $0.24 \times 10^4 (Ms)^{-1}$

[61,107]. С другой стороны, эффективна именно низкая концентрация мелафена при обработке растений (2×10^{-12} М), что дает основание предполагать, что могут одновременно осуществляться и другие механизмы действия препарата. Поскольку мелафен в сверхмалых количествах предотвращает набухание митохондрий, возможно, что мелафен регулирует, или влияет на активацию, мито- K^+ АТФ - зависимые каналы (митохондриального АТФ-зависимого K^+ канала) или на его каналообразующую субъединицу, встроенную в бислойную липидную мембрану. Такая активация в митохондриях также может приводить к снижению генерации АФК митохондриями и предотвращать их набухание.

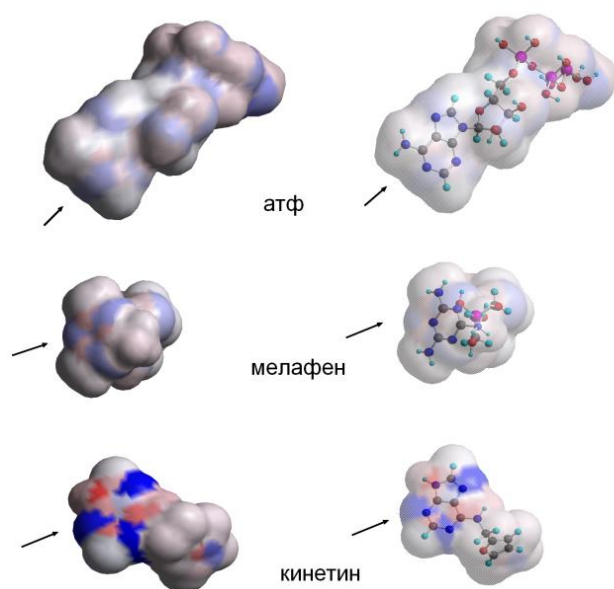


Рисунок 3.6. Молекулярные модели молекулы АТФ, мелафена и кинетина. (Отмечены участки пуриновых групп АТФ, кинетина и меламиновой группы мелафена. Показано распределение зарядов (красный - синий: положительный - отрицательный) на поверхности доступной для молекул воды). (Avogadro, Chem3D)

Как известно, АТФ в малых концентрациях выполняет сигнальную функцию, усиливая передачу сигналов через рецепторы АТФ на внешней

мембране клеток, в частности, сигналов к росту и делению [119]. Можно предположить, что мелафен также относится к тем специфическим химическим факторам, который, подобно АТФ, способен в сверхнизких концентрациях регулировать рост растительной клетки. Возможно, мелафен действует подобно АТФ при контакте с внешней мембраной растительных клеток и вызывает усиление роста и деления, имитируя АТФ по своему распределению поверхностной плотности зарядов в области пуриновой группы АТФ.

Вопрос о том, проявляет ли мелафен свойства фитогормонов, остается спорным. Так, в работе [53] указывается, что мелафен повышает активность РНК - полимеразы I, но не влияет на транскрипцию хлоропластных генов и не обладает характерными цитокининовыми эффектами. Однако, в других работах [52] обнаружено, что мелафен влияет на экспрессию гена раннего светоиндуцированного белка хлоропластов ячменя и вызывает тирозинное фосфорилирование белков темновой стадии фотосинтеза [54], последнее присуще и фитогормонам [78].

3.3. Исследование морфологических изменений эритроцитов в присутствии и отсутствии глюкозы с помощью метода АСМ

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) начинает широко использоваться, в том числе и при исследовании эритроцитов. Это связано с тем, что атомно-силовой микроскоп позволяет получать непосредственно трехмерный рельеф исследуемой поверхности, проследить за изменениями размерных параметров отдельного эритроцита, и провести статистическую обработку этих результатов.

При исследовании воздушно-сухих образцов эритроцитов используют различные методы предварительной фиксации эритроцитов [119,127,128]. При жестких методах фиксации (метанол и др.) происходит значительное

искажение формы и размеров эритроцитов. Более прямым методом регистрации поверхности эритроцитов является измерение в жидкостной ячейке. Однако этот метод не является рутинным и его трудно использовать для больших объемов измерений, необходимых для статистической обработки.

Фиксация эритроцитов глутаровым альдегидом, создающим как внутримолекулярные, так и межмолекулярные сшивки белков, который мы использовали в нашей работе, является более подходящим способом для экспериментов, а учитывая плотную упаковку гемоглобина в эритроците, наименее искажающим форму эритроцитов [127].

Объем имиджа эритроцитов полученных методом АСМ на воздухе, может отличаться в меньшую сторону от объема эритроцитов, зарегистрированного традиционными методами, калибруемыми по гематокриту. Это происходит вследствие некоторой усадки эритроцитов из-за потери воды, однако сравнительное исследование морфологии и размерных параметров эритроцитов является правомочным.

Следует отметить, что показатели объема и диаметра эритроцитов мышей несколько меньше, чем у человека. Так, у самцов и самок домашней мыши *Mus musculus*, диаметр эритроцитов мыши составляет (4,0-5,0 мкм), средний диаметр эритроцитов человека 7-8 мкм [129].

При подготовке образцов, в нашей работе мы использовали метод фиксации эритроцитов 2% глутаровым альдегидом с последующей промывкой и нанесением на полированную кремневую подложку, и сушкой на воздухе. При такой обработке форма эритроцитов не изменяется, они остаются в форме дискоцитов, не наблюдалось искаженных или слипшихся клеток.

На рисунке 3.7 представлено АСМ изображение эритроцита мыши, который в крови обычно имеет форму дискоцита (а), и типичный участок сканирования 30×30 мкм² (б). В зависимости от условий среды форма

эритроцита может искажаться, изменяются и определенные параметры в архитектонике эритроцитов. И хотя объем эритроцита величина динамическая, зависящая от соотношения концентраций многих веществ по обе стороны мембраны, он строго контролируется сложной ионно-транспортной системой ионных насосов и каналов в мембране, что позволяет поддерживать форму эритроцита [130].

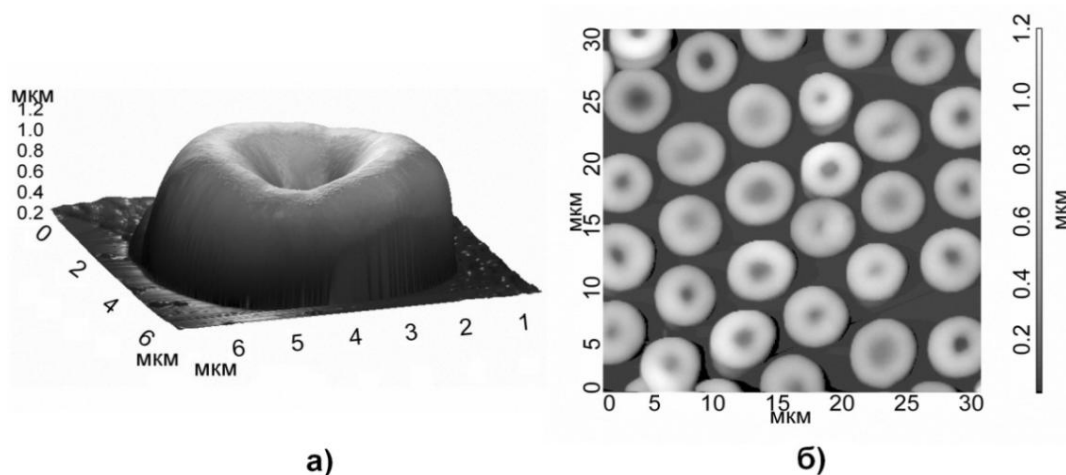


Рисунок 3.7. Трехмерное АСМ изображение одиночного эритроцита на кремниевой подложке, фиксированного глутаровым альдегидом – (а) и двумерный участок (30×30 мкм²) АСМ имиджей эритроцитов – (б)

На рисунке 3.8 схематично представлено определение объема АСМ имиджа эритроцита. В эксперименте объем определяется с помощью программы Image Analysis, исходя из координатных данных и заданного шага сканирования в области сечения.

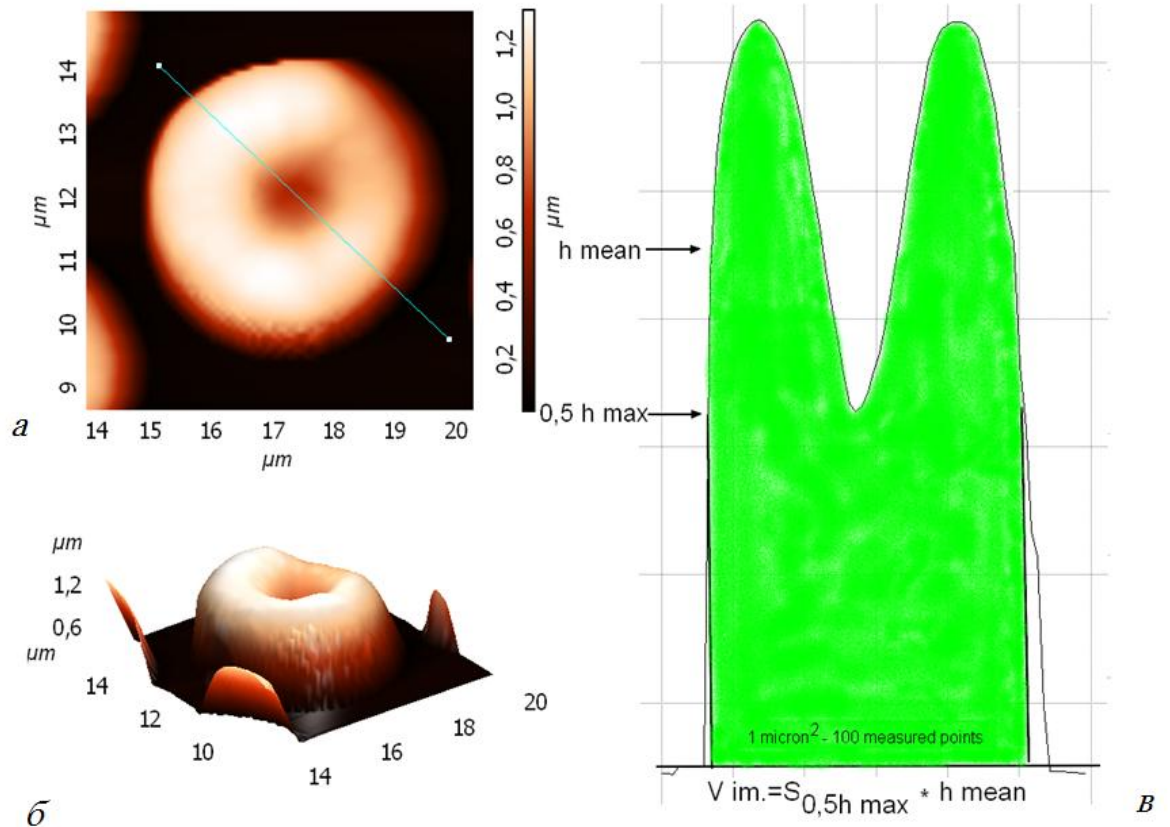


Рисунок 3.8. АСМ имидж эритроцита в D2 (двухмерном) – (а), и D3 (трехмерном) – (б) измерения и схема определения параметров имиджа эритроцита – (в): площади эритроцита на середине высоты ($S_{0,5h_{max}}$), средней высоты (h_{mean}) и объема ($V = S_{0,5h_{max}} \times h_{mean}$)

Эритроциты адсорбируют из плазмы крови глюкозу, белки, липиды, аминокислоты и другие вещества и переносят их к тканям. Глюкоза является основным источником энергии в организме, также это основной показатель углеводного обмена. Эритроциты зависят от уровня глюкозы энергетически, так как гликолиз в эритроцитах основной источник АТФ, при этом жизнеспособность клетки определяется поддержанием концентрации глюкозы в организме на должном уровне [131]. В зависимости от условий среды форма эритроцита и некоторые параметры в архитектонике эритроцитов могут изменяться.

Ранее отмечался ряд важных структурных изменений, которые происходят при участии АТФ, поэтому в работе была поставлена задача проверить возможность АСМ метода при исследовании морфологических изменений, которые происходят в эритроцитах в отсутствии глюкозы, необходимой для гликолиза - источника АТФ в эритроцитах в системе *in vitro*. Для этого эритроциты инкубировали в стандартном фосфатно - солевом буфере в течении 1-4 часов в присутствии 10 мМ глюкозы (контроль) и без нее, т.е. при гликолитическом голодании эритроцитов. Статистическая обработка АСМ имиджей этих препаратов показала, что распределение объема эритроцитов было близко к нормальному, как в присутствии глюкозы, так и без нее. Инкубация эритроцитов в течение часа как в буфере с глюкозой, так и без нее, незначительно влияла на размеры эритроцитов. Однако инкубация в буфере, не содержащем глюкозы в течение 4-х часов, приводила к достоверному снижению объема, средней высоты и периметра АСМ имиджей эритроцитов. Результаты представлены на рисунках 3.9- 3.11.

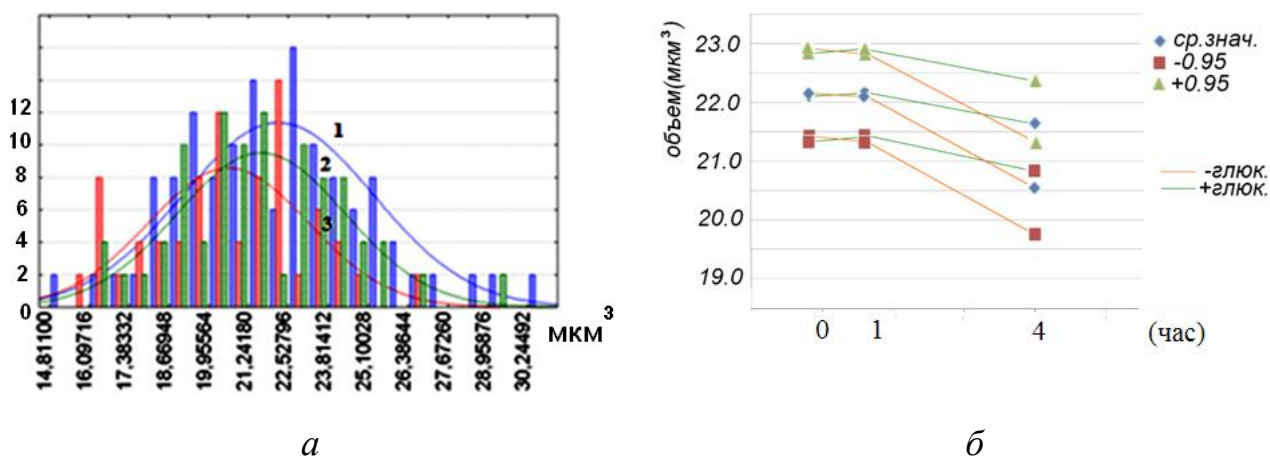
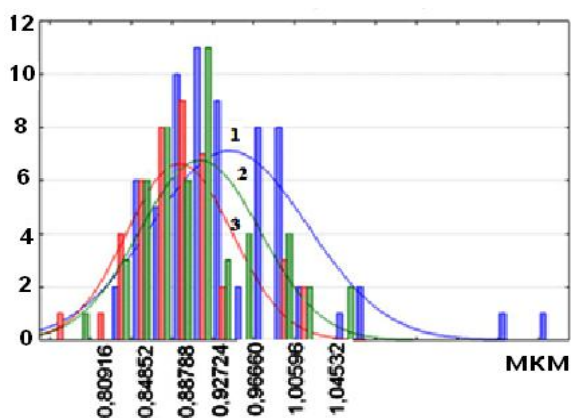
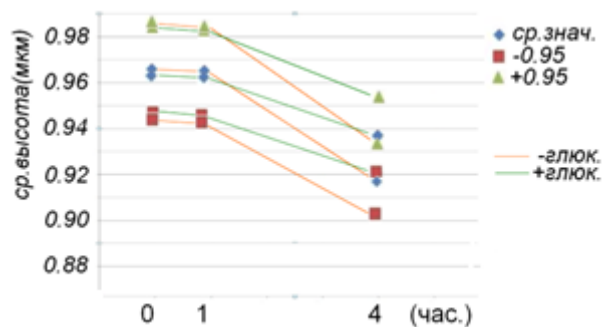


Рисунок 3.9. Гистограмма распределения объема (V_{cp}) АСМ имиджа эритроцитов и аппроксимация нормальным распределением через 4 часа инкубации – (а); и изменение (V_{cp}) в зависимости от времени воздействия (показан 95% доверительный интервал) – (б): в контроле – (1 - синий), в присутствии глюкозы (2 - зеленый) и без глюкозы (3 - красный). Показан 95% доверительный интервал – (б)

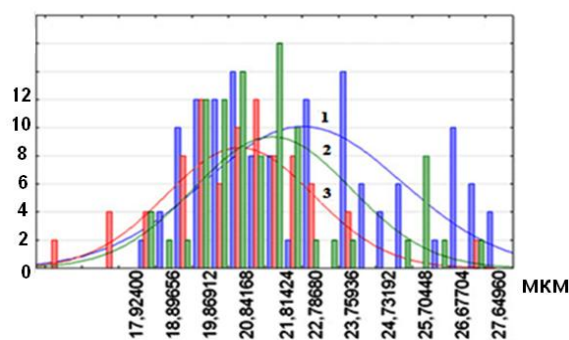


а

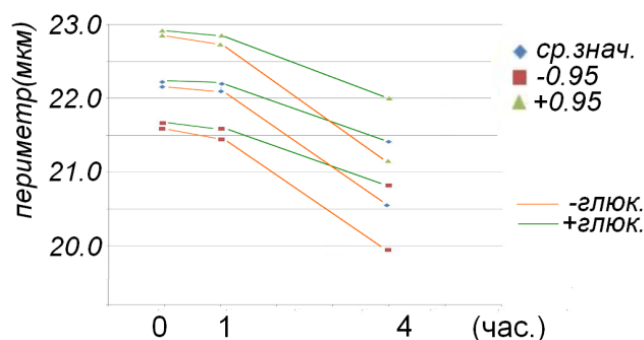


б

Рисунок 3.10. Гистограмма распределения средней высоты (Z_{cp}) АСМ имиджа эритроцитов и аппроксимация нормальным распределением через 4 часа инкубации – (а); и изменение (Z_{cp}) в зависимости от времени воздействия (показан 95% доверительный интервал) – (б): в контроле – (1 - синий), в присутствии глюкозы (2 - зеленый) и без глюкозы (3 - красный). Показан 95% доверительный интервал – (б)



а



б

Рисунок 3.11. Гистограмма распределения периметра (P_{cp}) АСМ имиджа эритроцитов и аппроксимация нормальным распределением через 4 часа инкубации – (а); и изменение периметра в зависимости от времени воздействия (показан 95% доверительный интервал) – (б): в контроле – (1 - синий), в присутствии глюкозы (2 - зеленый) и без глюкозы (3 - красный). Показан 95% доверительный интервал – (б)

Из полученных данных видно, что в отсутствии глюкозы через 4 часа инкубации уменьшается средняя высота, средний периметр имиджа и средний объем эритроцитов. Изменение объема происходит примерно на 4-5%, через 4 часа инкубации без глюкозы, что может быть связано с истощением клеток по АТФ при гликолитическом голодании. Согласно работе [34], уменьшение объема эритроцитов в этих условиях может быть связано со снижением активности кальциевого насоса и накоплению ионов Ca^{2+} . Наши данные также согласуются с результатами работы [127], где отмечается, что для поддержания формы эритроцита в виде дискоцита, необходимо наличие АТФ, а также с работой Слобожанина Е.И и др. [132] по снижению объема при гликолитическом голодании, выполненной методом фильтрации.

Учитывая полученные результаты, дальнейшие эксперименты по воздействию биологически активных соединений на морфологию эритроцитов методом АСМ в системе *in vitro* проводили в буфере, содержащем 10 мМ глюкозы при инкубации эритроцитов в течение 1 часа.

3.4. Изменение морфологии эритроцитов мышей при действии препарата мелафен

Удобной моделью для исследования воздействия мелафена на животные клетки могут служить эритроциты, которые выполняют транспортную функцию, и контактируют с поступающими экзогенными соединениями. Можно было полагать, что размерные параметры эритроцитов будут чувствительны к воздействию мелафена в низких концентрациях так, было показано ранее, что в концентрации 10^{-11} М он влияет на регуляцию Ca^{2+} в клетках АКЭ [133].

Для исследования действия мелафена на морфологию эритроцитов мышей в системе *in vivo*, препарат вводили внутривенно за 12 ч до забора крови у мышей в конечной концентрации (10^{-11} - 10^{-5} М). В

экспериментах *in vitro* выделенные эритроциты инкубировали в фосфатно-солевом буфере с глюкозой при различных концентрациях мелафена в течение 1 часа при комнатной температуре. АСМ измерения проводили вышеописанным способом. В каждой исследуемой выборке было около 100 дискоцитов.

В наших экспериментах, в контрольных образцах эритроцитов присутствовали в основном дискоциты, в то же время наблюдалось небольшое количество других форм – стоматоцитов, эхиноцитов и промежуточных форм (менее 3%) (Рисунок.3.12) [47,114,115].

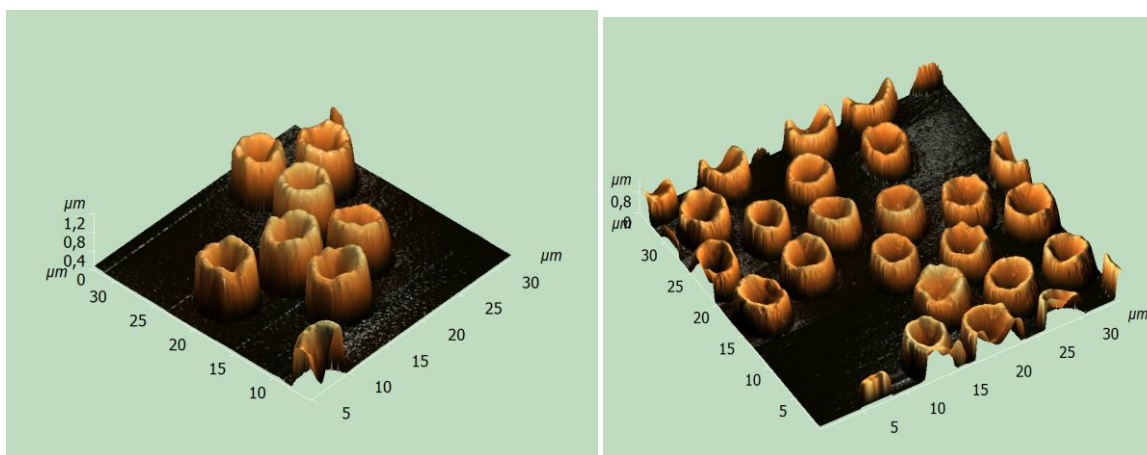


Рисунок 3.12. АСМ имиджи эритроцитов, предварительно фиксированные глутаровым альдегидом, на кремниевой подложке, в контроле и при введении препарата мелафен в концентрации 10^{-5} М

В экспериментах *in vivo* при действии мелафена в концентрации 10^{-11} - 10^{-5} М статистически значимого отличия в количестве различных форм эритроцитов обнаружено не было. В то же время наблюдалось достоверное, в зависимости от концентрации препаратов, изменение ряда параметров АСМ имиджа эритроцитов [115,116].

На рисунках 3.13 - 3.16 представлены результаты этих экспериментов.

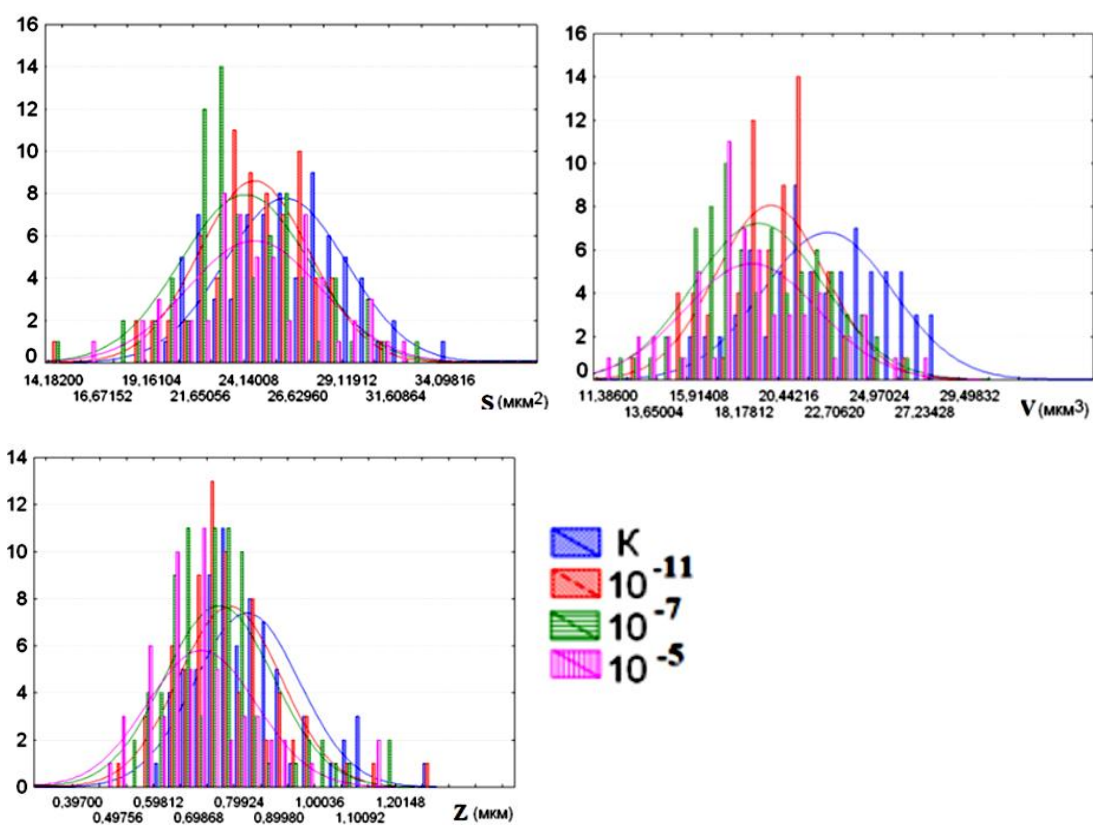
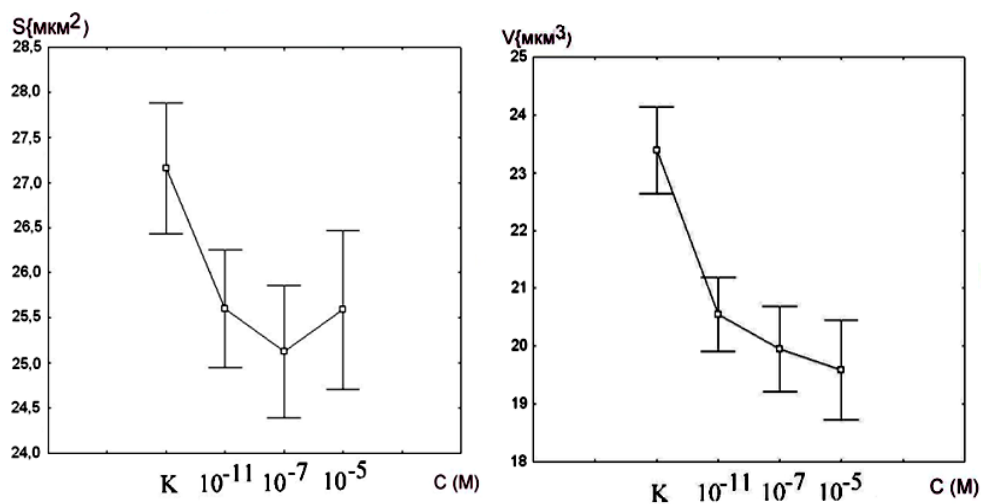


Рисунок 3.13. Гистограммы распределения площади (S) , объема(V) средней высоты (Z) эритроцитов при введении препарата мелафен *in vivo* в контроле и при различных концентрациях мелафена



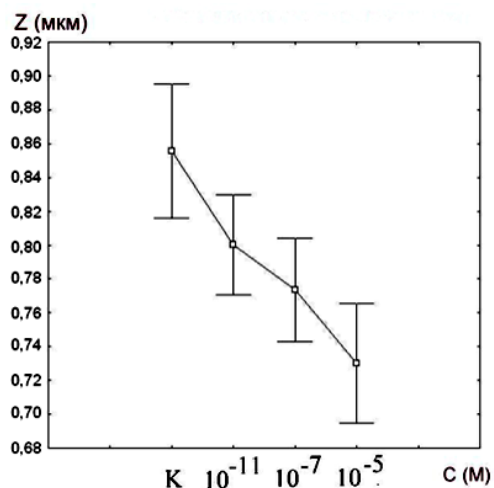


Рисунок 3.14. Изменение площади (S_{cp}) – (а), средней высоты (Z_{cp}) – (б), объема (V_{cp}) – (в), АСМ имиджа эритроцитов в зависимости от концентрации мелафена *in vivo* (Обозначен 95% доверительный интервал)

Как видно из рисунка 3.14, при исследовании действия низких концентраций препарата мелафен (10^{-11} М, 10^{-7} М) и более высоких концентраций (10^{-5} М) в системе *in vivo*, наблюдалось уменьшения площади, высоты и объема АСМ имиджа эритроцита, причем изменения размерных параметров были довольно значительными уже при концентрации 10^{-11} М. Значение объема эритроцитов уменьшалось на 12-13% [115,116].

Для сравнения данных, обнаруженных при действии мелафена *in vivo*, были проведены эксперименты по действию мелафена в системе *in vitro*. Для этого, согласно методике, выделенные эритроциты (см. методику) инкубировали в течение часа в присутствии различных концентраций мелафена. Результаты представлены на рисунке 3.16.

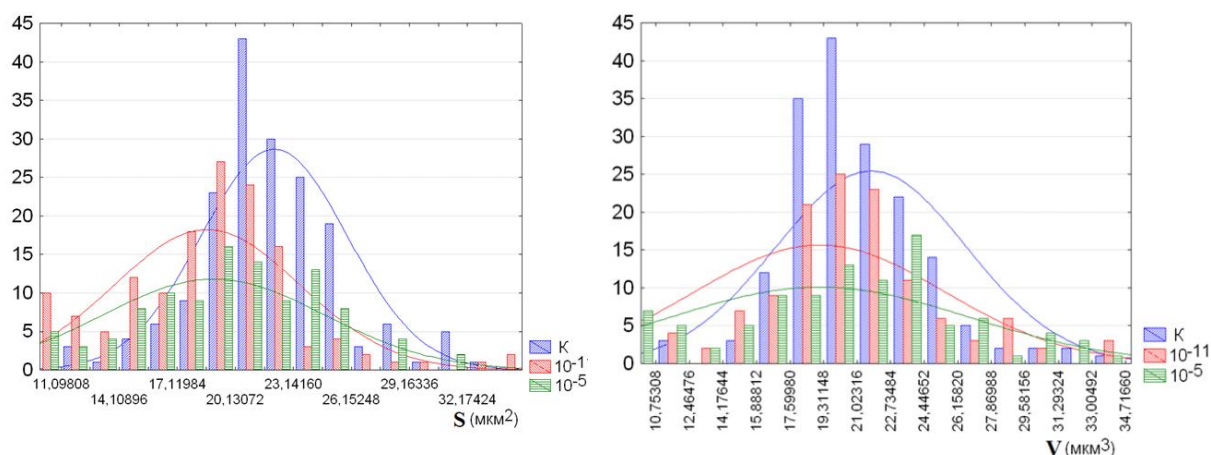


Рисунок 3.15. Гистограммы распределения площади (S), объема (V), АСМ имиджа эритроцитов *in vitro* в зависимости от концентрации препарата мелафен

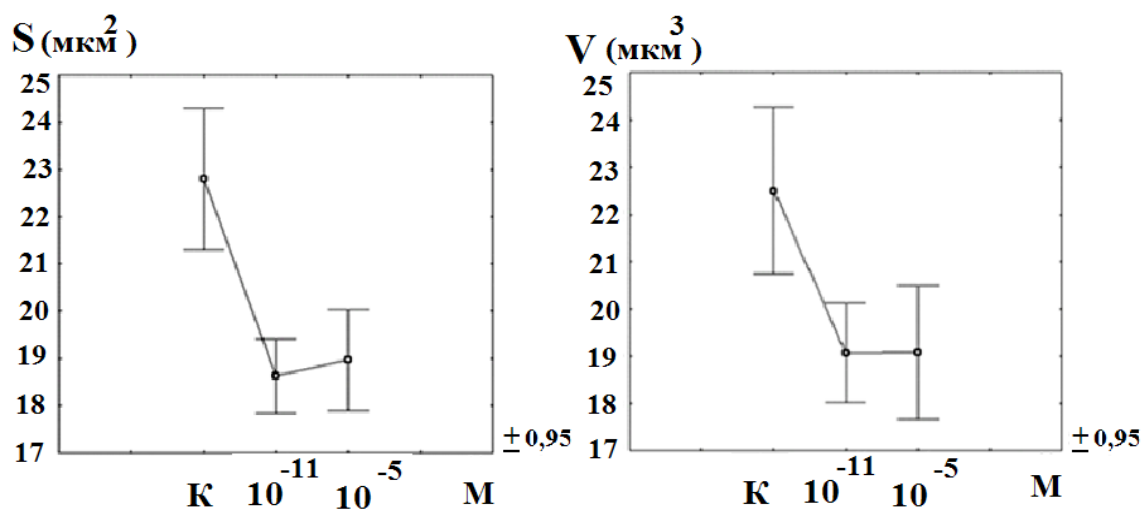


Рисунок 3.16. Изменение площади (S_{cp}) – (а), и объема (V_{cp}) – (б), АСМ имиджа эритроцитов в зависимости от концентрации мелафена *in vitro*

Как видно из рисунков 3.13 - 3.16, изменения размерных параметров имиджей эритроцитов под действием мелафена *in vitro* были близки к данным, полученным *in vivo*. По-видимому, полученные результаты указывает на сходный механизм действия мелафена как *in vitro*, так и *in vivo*. Это исключает возможность того, что уменьшение среднего объема эритроцитов происходит вследствие изменения их пула в кровеносной системе, например, за счет выхода эритроцитов из резервных депо.

Следует отметить, что изменения АСМ имиджа эритроцитов, полученные в этих экспериментах, происходят в ту же сторону, что и в экспериментах по гликолитическому голоданию (уменьшение площади, высоты и объема) по отношению к контрольным образцам.

Возможно, что действие мелафена может осуществляться через его влияние на АТФ - зависимые ион-транспортные системы, путем взаимодействия с пуриновыми участками. Это согласуется с тем, что мелафен угнетал Ca^{2+} -сигнальную систему клеток АКЭ при концентрациях 10^{-11} , 10^{-10} М, воздействуя на пуриновые рецепторы P2Y и на Ca^{2+} -проводящие каналы емкостного входа (CRAC) [47,48,20,134]. При этом нельзя исключить и его непосредственного влияния на процесс гликолиза. Можно предположить, что действие мелафена в эритроцитах, приводящее к нарушению в ион-транспортной системе и уменьшению объема эритроцитов, связано с накоплением Ca^{2+} [126,135,136,137,138].

3.5. Влияние мелафена в концентрации 10^{-10} М на трансдукцию апоптоза.

Определение содержания белка- регулятора p53 и антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках АКЭ

Как известно, важным свойством мелафена является то, что в малых дозах он является мощным стимулятором роста растений, в больших дозах - угнетает их рост, т.е. оказывает разнонаправленное влияние на делящиеся клетки, в зависимости от концентрации [47,29]. Как отмечалось, также дозозависимо он влияет на Ca^{2+} -сигнализацию клеток [20], угнетая систему Ca^{2+} регуляции уже в концентрации 10^{-10} - 10^{-11} М. Ca^{2+} -сигнальная система клеток различными путями связана с процессами апоптоза клеток. В частности, концентрация Ca^{2+} в клетке оказывает влияние на активность кальций связывающих белков ряда S100, которые связываются с белком p53, изменяя его транскрипционную активность. При этом, белок S100 может оказывать как протективный (в наномолярных концентрациях), так и

дегенеративный или проапоптотический эффект (в микромолярных концентрациях) [90].

Поэтому, можно было ожидать, что мелафен будет влиять на пути трансдукции сигнала апоптоза, и будет влиять на изменение содержания про- и антиапоптотических белков.

Как известно, содержание контролера клеточного цикла - белка p53, может служить показателем системного ответа организма на различные воздействия, стимулируя большое число клеточных генов, включая проапоптотические гены [137,138].

Сам ген P53 часто мутирует в опухолевых и лейкозных клетках, что приводит к появлению мутантного, более стабильного белка с утраченной функцией надзора за структурой ДНК, свойственной белку p53 дикого типа. Это приводит к тому, что содержание белка p53 возрастает при ряде опухолевых заболеваний, в том числе при развитии лейкозов [139,140,141].

Определение изменения содержания белка Bcl-2, который играет важную антиапоптотическую роль в мембране митохондрий и в сыворотке крови, может быть показателем направленности протекания метаболических процессов в сторону репарации или апоптоза клеток и, следовательно, служить параметром для прогнозирования последствий определенного воздействия.

В нашей работе было изучено влияние мелафена на молекулярные факторы индукции и ингибирования апоптоза в клетках опухоли АКЭ *in vitro* по показателю содержания белка - регулятора p53 и белка Bcl-2 [142]. В параллельных работах Ерохина В.Н и др. было изучено влияние мелафена на развитие перевивных солидных опухолей - карциномы Льюиса мышей *in vivo*. Для проведения экспериментов была использована концентрация мелафена 10^{-10} моль/кг, при которой наблюдалось торможение роста карциномы Льюиса: скорость роста которой уменьшалась по сравнению с контролем [46].

Полученные данные электрофореза белков и данные иммуноблоттинга препаратов белков асцитных клеток мышей АКЭ, представлены на рисунках 3.17-3.18. Как было указано в методике, электрофорез белков проводили в системе SDS – электрофореза в системе Лэммли в 10% геле.

На рисунке 3.17 представлены гели с нанесенными белками гомогената опухолевых клеток (после неоднократного замораживания и размораживания) и блоты с полосами белков p53 и Bcl-2, в контроле, через 0,5 часа и 1,5 часа после введения в суспензию клеток регулятора роста мелафена в концентрации 10^{-10} М после электрофореза и окраски белка.

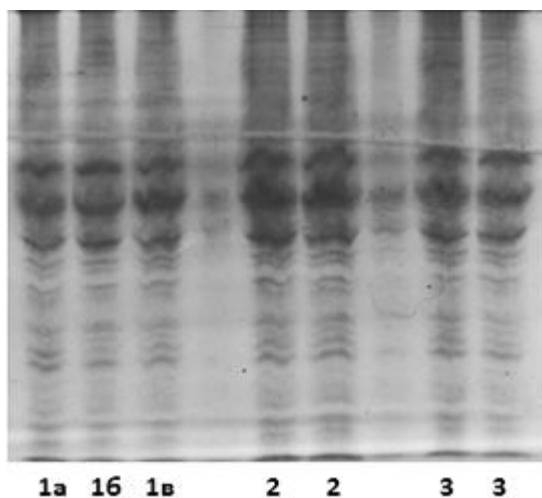


Рисунок 3.17. Гель после электрофореза белков 7- дневных асцитных клеток мышей линии АКЭ, контроль – 1а, контроль через 1,5 часа – 1б, контроль мелафен в концентрации 10^{-10} М (сразу после введения) – 1в; через 0,5 часа после введения препарата мелафен – 2; через 1,5 часа – 3

Содержание белка Bcl-2 в препаратах определяли как методом иммуноблоттинга, так и методом дот-блоттинга. В качестве первого антитела использовали моноклональные антитела “Monoclonal Anti-BCL-2 clone10C4”, второго антитела - меченный пероксидазой хрена иммуноглобулин anti-rabbit IgG (“Sigma”) (Рисунок 2.4).



Рисунок 3.18. Полоса белка p53 на нитроцеллюлозной мембране (блот), колонки: мелафен в концентрации 10^{-10} М в контроле сразу после введения препарата – 1, через 0,5 часа после введения – 2 и через 1,5 часа после введения мелафена – колонка 3

На рисунке 3.18 представлен блот, с полосами белка p53, детекцию белков проводили 1-м специфическим антителом FL-393 (“Santa Cruz”, США), в качестве второго антитела, меченые пероксидазой хрена антитела “sc-6243” (фирмы “Sigma-Aldrich”). Определение концентрации белков пути апоптоза проводили проявляющим набором AEC Staining Kit (Sigma-Aldrich).

На диаграммах можно проследить за изменением содержания белка - регулятора p53 и антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках АКЭ, в зависимости от времени воздействия мелафена в низкой концентрации 10^{-10} М.

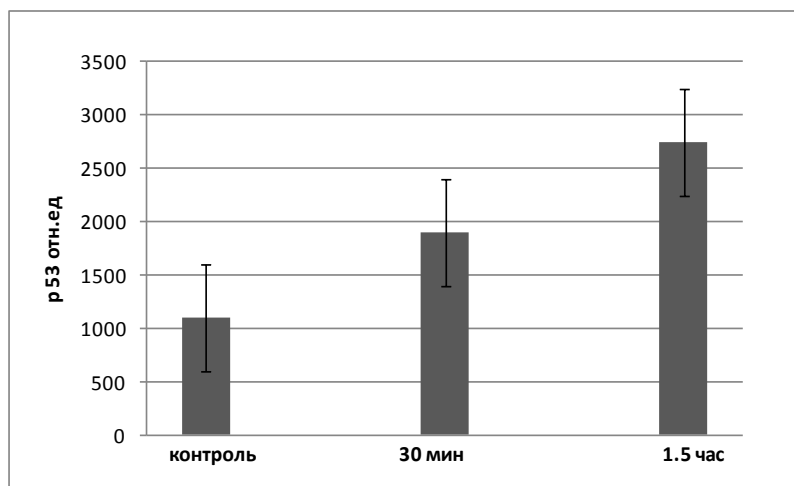


Рисунок 3.19. Изменение содержания белка - регулятора p53 в асцитных клетках мышей АКЭ при введении мелафена в низкой концентрации 10^{-10} М в зависимости от времени воздействия

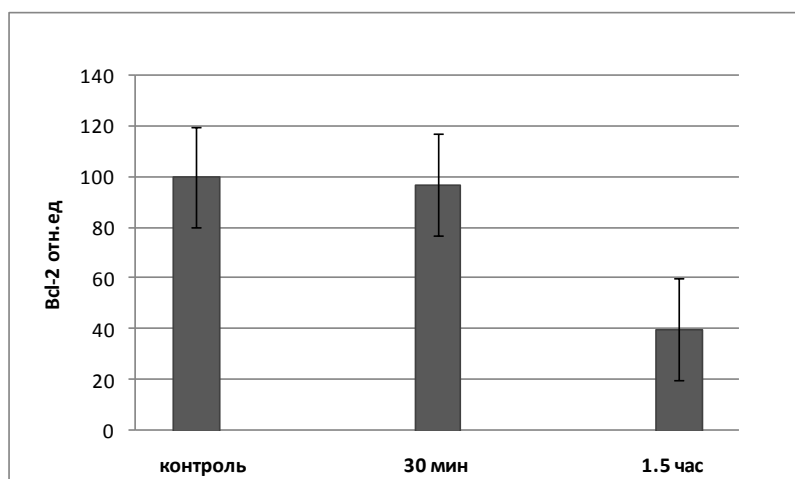


Рисунок 3.20. Изменение содержания антиапоптозного белка Bcl-2 в асцитных клетках мышей АКЭ, при введении мелафена в низкой концентрации 10^{-10} М в зависимости от времени воздействия

Экспериментальные данные позволили обнаружить увеличение количества белка p53 и снижение количества белка Bcl-2 через 1,5 часа после воздействия, в то время как через 0,5 часа существенных изменений не наблюдалось. Наблюдаемые эффекты свидетельствуют о влиянии мелафена на молекулярные мишени сигнального пути апоптоза, которые проявляются через 1,5 часа после воздействия мелафена в концентрации 10^{-10} М *in vitro* [142]. Это согласуется с данными работ [20,134,126], что мелафен в дозе (10^{-12} , 10^{-13} М) стимулирует, а при концентрации 10^{-10} М и выше угнетает систему Ca^{2+} -ответа клеток АКЭ. Это может привести к стимулированию белков S100, и транскрипционной активности белка p53, приводящего к апоптозу клеток [20,134]. Увеличение количества белка p53 и одновременное снижение антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках АКЭ, полученное в наших экспериментах, может свидетельствовать об инициации процессов апоптоза опухолевых клеток под действием мелафена. Этот эффект мог оказывать влияние на торможение развития опухоли карциномы Льюиса у мышей линии АКЭ, которую наблюдали в параллельно проведенной работе [48] при введении 10^{-10} М мелафена.

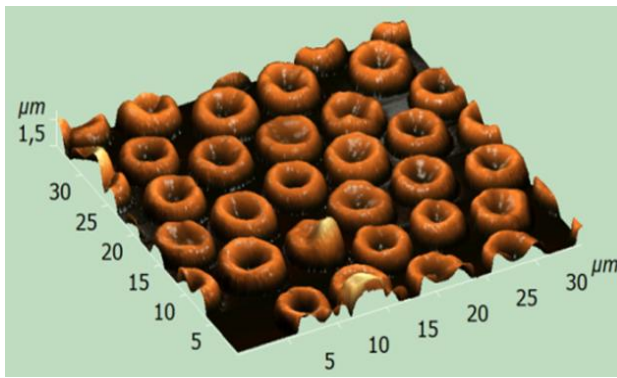
ГЛАВА 4. Исследование действия фенозана К и ИХФАН-10 на структурные характеристики эритроцитов и на трансдукцию белков пути апоптоза животных клеток.

4.1. Изменение морфологии эритроцитов под действием фенозана К и ИХФАН-10 в системах *in vitro* и *in vivo*

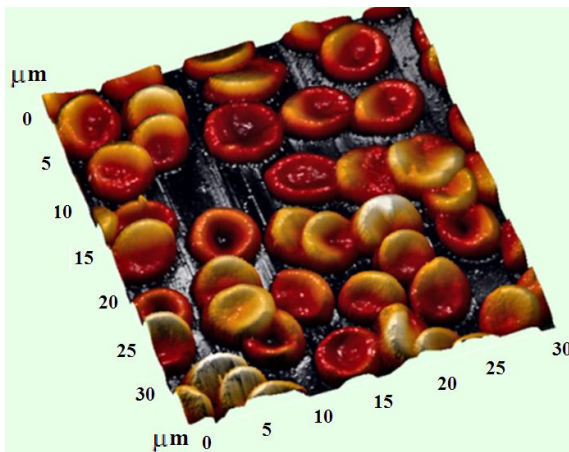
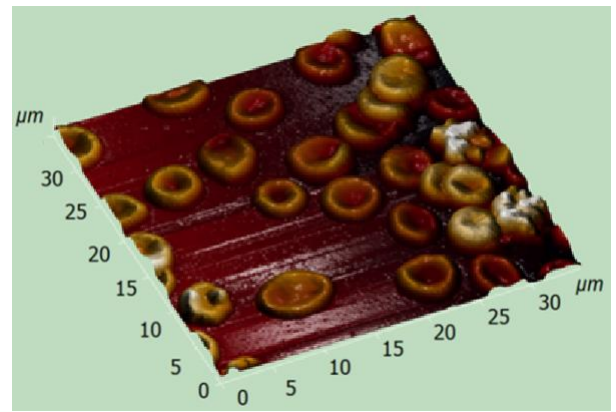
Эритроциты далее использовались в качестве модели при изучении воздействия антиоксидантов фенозана К и ИХФАН-10 в системе *in vitro* и *in vivo*. Можно было предположить, что антиоксиданты будут влиять на изменение размерных параметров эритроцитов, поскольку ранее морфологическая трансформация эритроцитарной мембраны была обнаружена при больших дозах введения ИХФАН-10 [13,36], а также малые дозы этих АО влияли на флуктуацию объема клеток АКЭ и эритроцитов [31].

Мы обнаружили, что исследуемые препараты также оказывают влияние на архитектуру эритроцитов, при этом изменения геометрических параметров при действии этих препаратов регистрируются уже при концентрации 10^{-11} М.

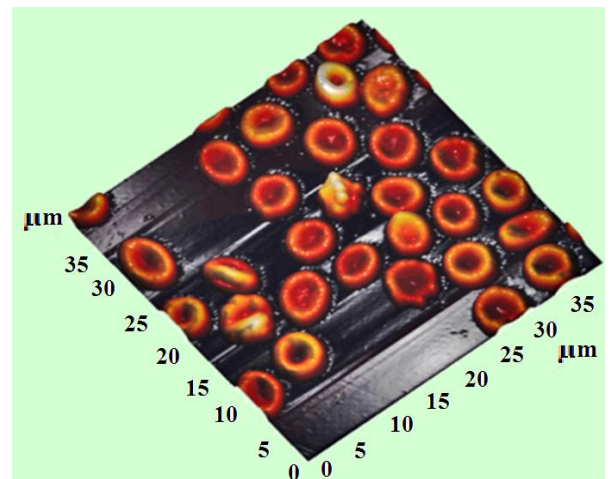
На рисунке 4.1 представлены АСМ имиджи эритроцитов полученных при действии ИХФАН-10 в концентрации 10^{-11} М в системе *in vitro* в сравнении с контрольными образцами и АСМ имиджи эритроцитов полученные из крови через 12 часов после введения мышам ИХФАН-10 в концентрации 10^{-11} М/кг и из крови контрольных мышей (*in vivo*).



а



б



Контроль

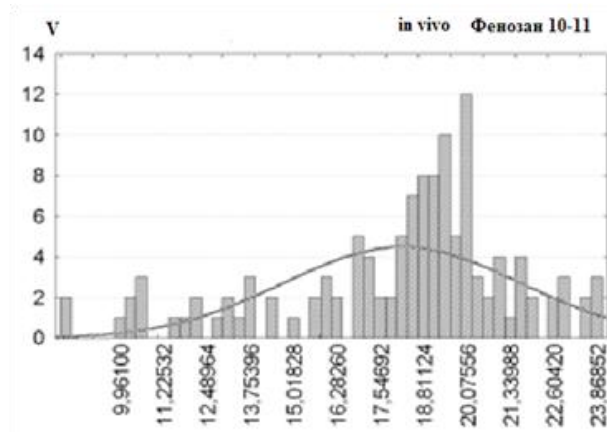
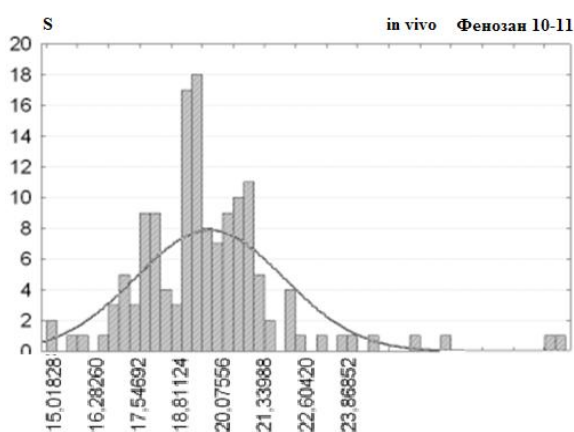
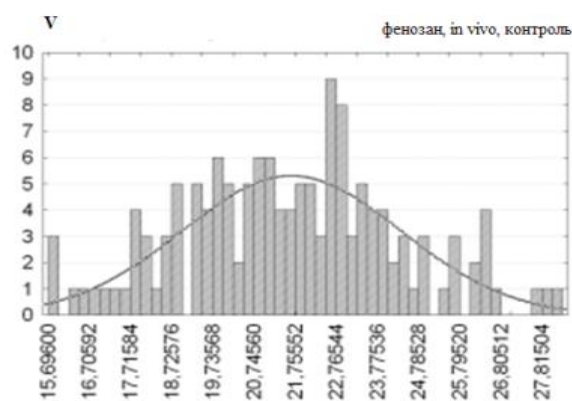
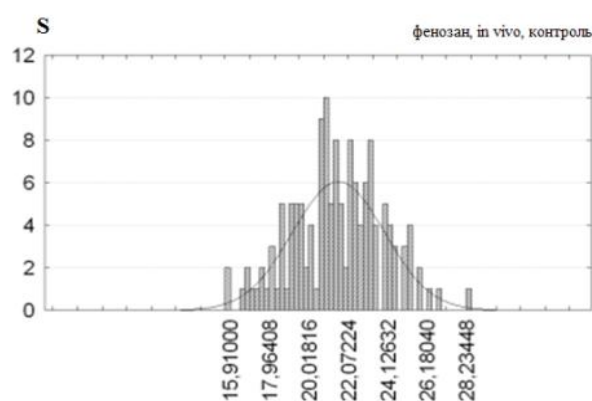
ИХФАН-10 (10⁻¹¹М)

Рисунок 4.1. АСМ имиджи эритроцитов, предварительно фиксированные глутаровым альдегидом, на кремниевой подложке, в контроле и при введении препарата ИХФАН-10 в концентрации 10⁻¹¹М в системе *in vitro* – (а) и *in vivo* – (б)

Визуально наблюдалось, что, при введении *in vivo*, в больших концентрациях 10⁻⁶ М или 10⁻⁵ М препаратов фенозана К и ИХФАН-10 в пробах наблюдалось появление небольшого количества искаженных форм, не более 3% (Рисунок 4.1). Однако статистически значимого отличия в количестве различных форм эритроцитов обнаружено не было. В то же время наблюдалось достоверное, в зависимости от концентрации препаратов, изменение ряда параметров АСМ имиджей эритроцитов.

Была проведена статистическая обработка результатов эксперимента и построены гистограммы распределения некоторых параметров АСМ имиджей эритроцитов. Гистограммы распределения площади (S), средней высоты (Z) и объема (V) АСМ имиджей эритроцитов при введении препарата фенозана К и ИХФАН-10 *in vivo* и *in vitro* в зависимости от концентрации приведены на рисунках 4.2 - 4.9. Видно, что распределение удовлетворительно подчиняется нормальному закону.

Статистическая обработка АСМ имиджей эритроцитов позволила обнаружить, что введение фенозана К *in vivo* вызывает изменение в архитектонике эритроцита, так при концентрациях фенозана К (10^{-11} , 10^{-6} М), наблюдается уменьшение площади и объема АСМ имиджа эритроцитов (Рисунок 4.2-4.3) [47,115,116].



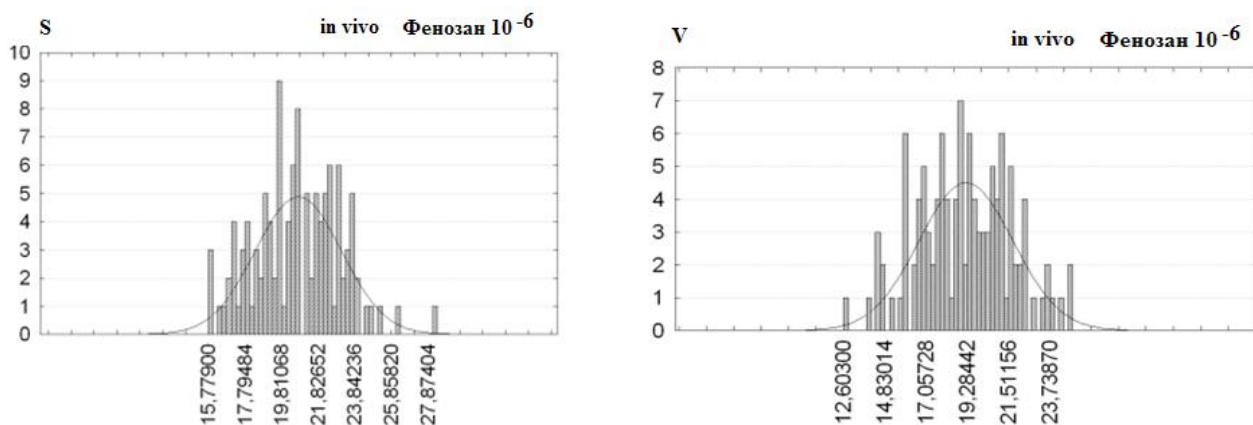


Рисунок 4.2. Гистограммы распределения площади (S), средней высоты (Z) и объема (V) АСМ имиджей эритроцитов при введении фенозана К мышам (*in vivo*) в зависимости от его конечной концентрации (М/кг)

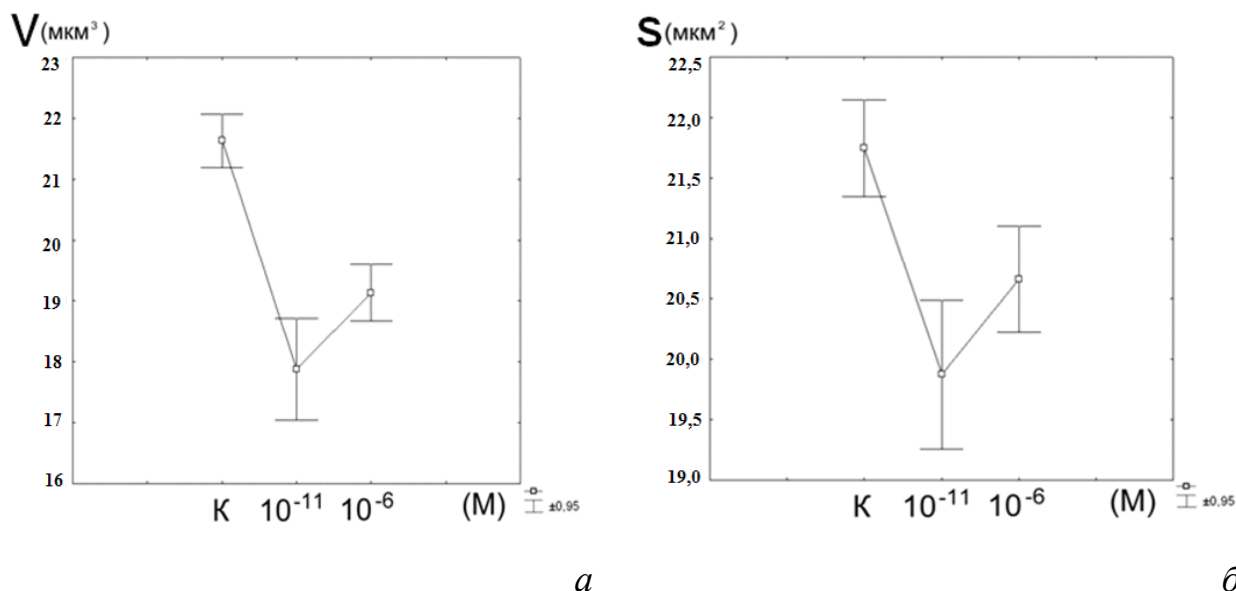
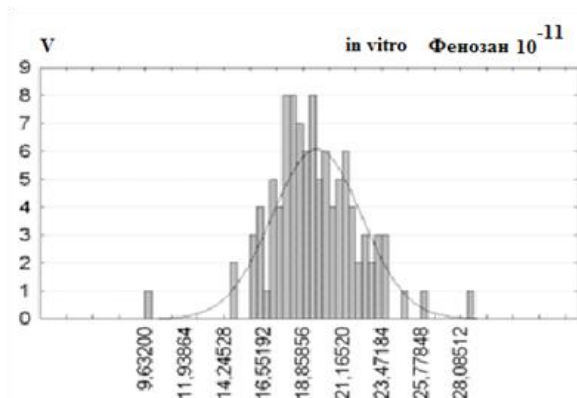
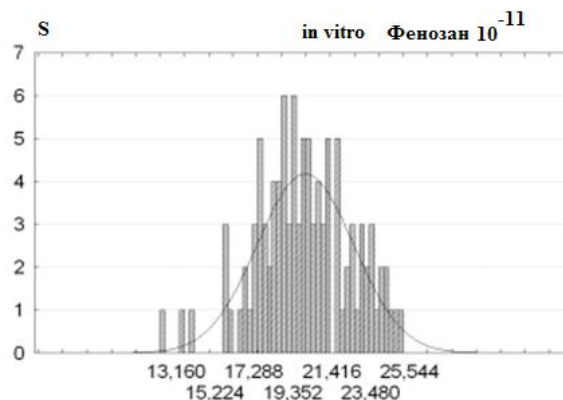
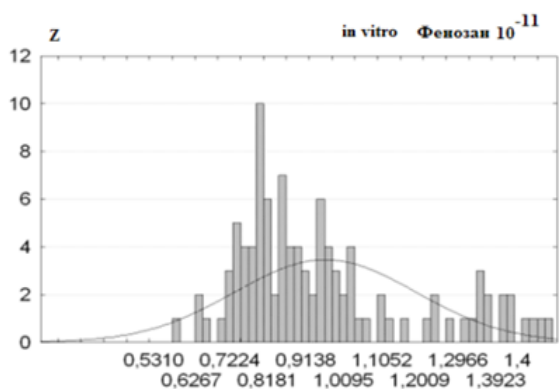
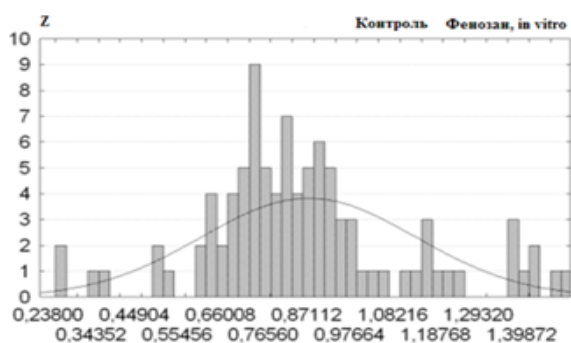


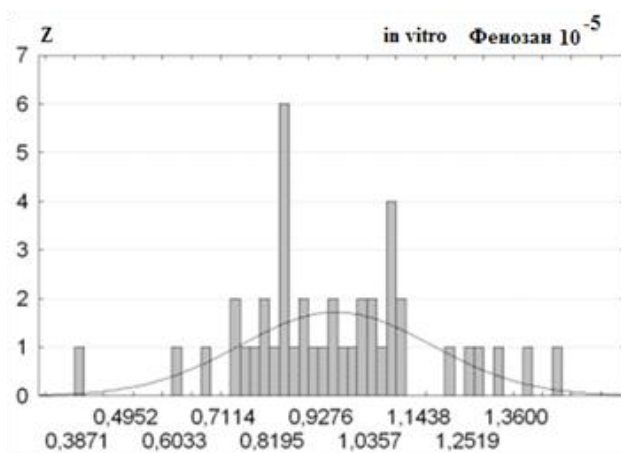
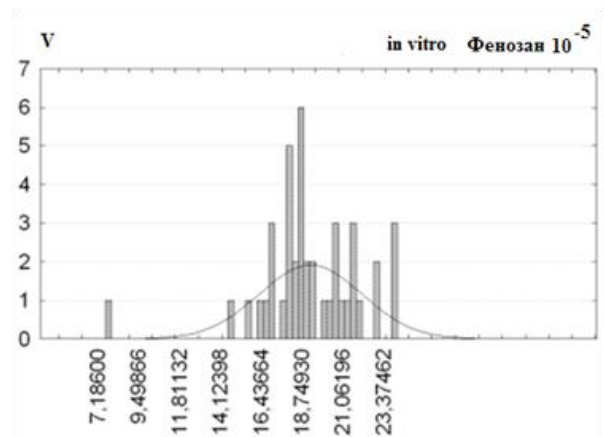
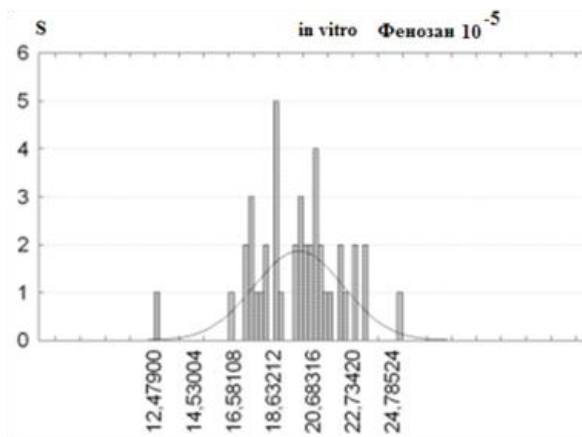
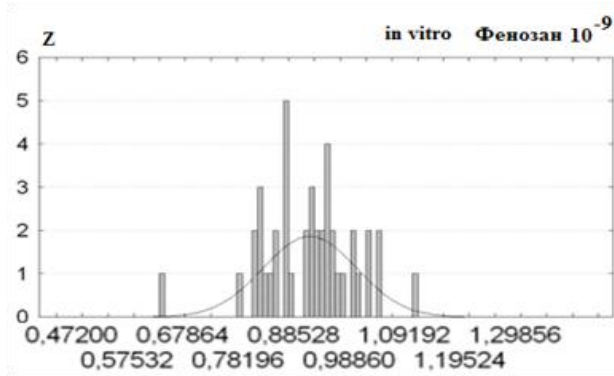
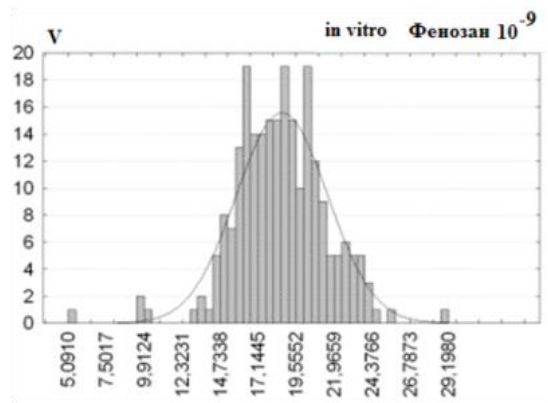
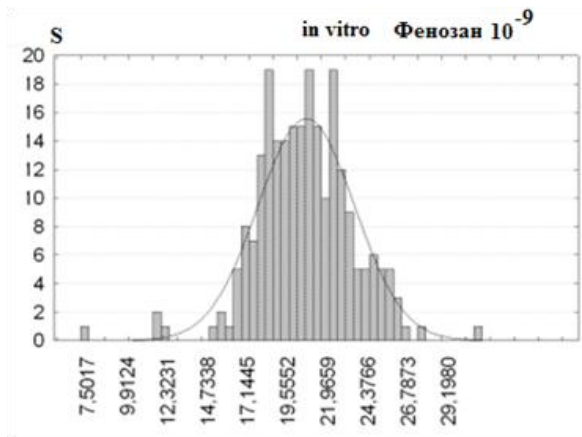
Рисунок 4.3. Изменение объема – (а) и площади – (б) АСМ имиджей эритроцитов при введении фенозана К мышам (*in vivo*) в зависимости от его конечной концентрации (М/кг)

Таким образом, в работе впервые обнаружено действие фенозана К на размерные параметры эритроцитов в очень низких конечных концентрациях (10⁻¹¹М, 10⁻⁹М), при введении мышам *in vivo*. Уменьшение средних размеров эритроцитов *in vivo*, может происходить под действием модифицированного

фенозана К или продуктов его деградации, превращением фенозана К в коричную кислоту в организме животных. Такой эффект может быть обусловлен воздействием этих продуктов непосредственно на эритроциты или эти продукты могут менять пул эритроцитов в кровеносной системе мыши за счет депонированных эритроцитов [116].

Далее представлены гистограммы (Рисунок 4.4) и график (Рисунок 4.5) изменения параметров АСМ имиджей эритроцитов при введении препарата фенозана К *in vitro*.





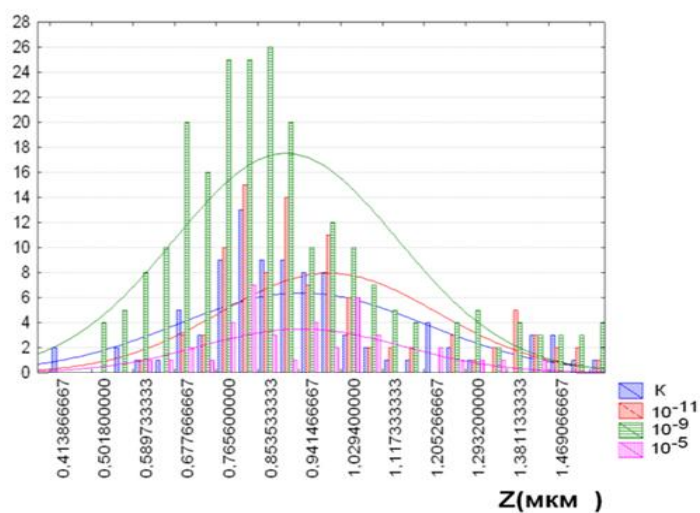
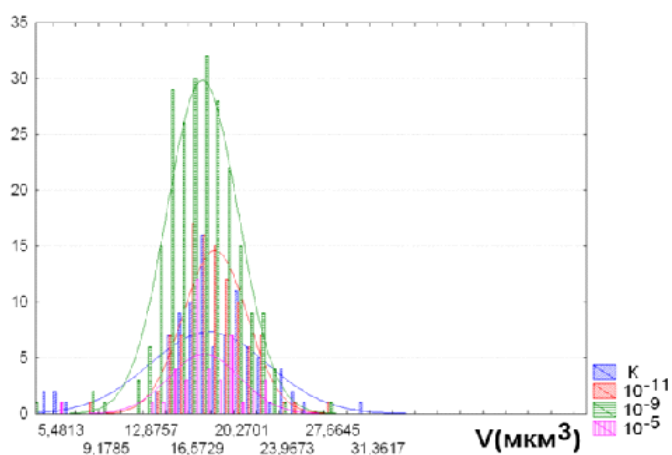
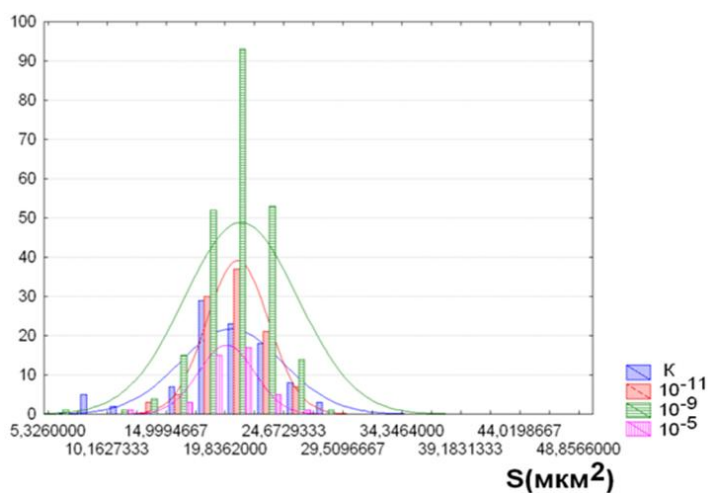
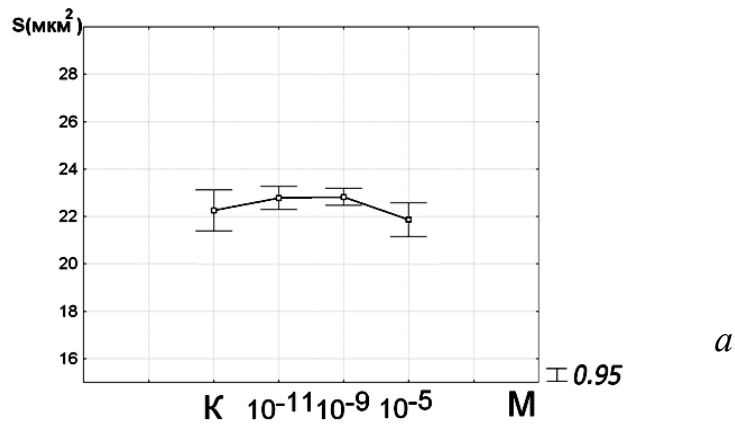
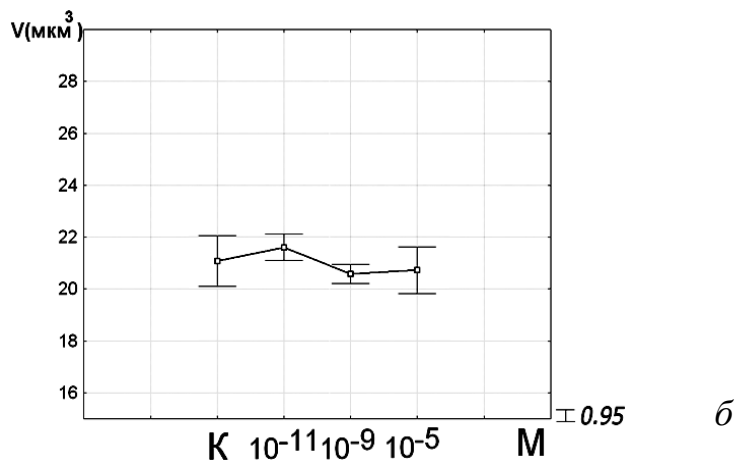


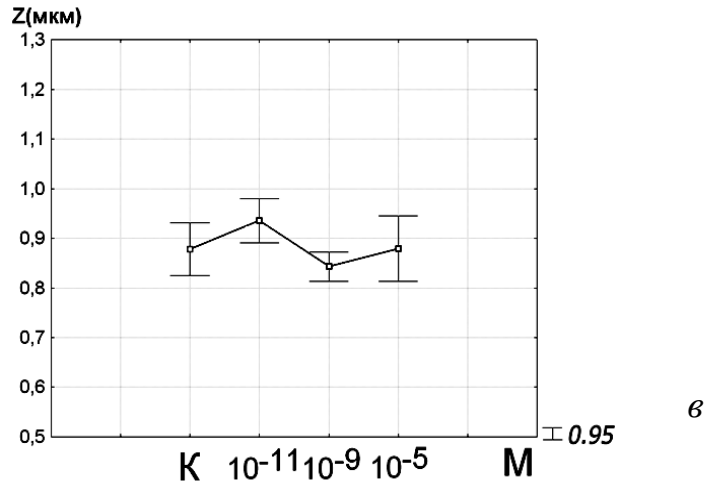
Рисунок 4.4. Гистограммы распределения площади (S), средней высоты (Z) и объема (V) АСМ имиджей эритроцитов при введении фенозана K в суспензию эритроцитов в фосфатно-солевом буфере (*in vitro*) в зависимости от его концентрации



a



б



в

Рисунок 4.5. Изменение площади – (а), объема – (б), средней высоты – (г) АСМ имиджа эритроцитов при введении фенозана K в суспензию эритроцитов в фосфатно-солевом буфере (*in vitro*) в зависимости от его концентрации. Показан 95% доверительный интервал

При введении фенозана К в суспензию эритроцитов *in vitro*, было обнаружено, что наблюдаются незначительные изменения параметров, которые находятся в пределах ошибки измерения (Рисунок 4.5.), не действует на осмотическое состояние эритроцитов. Различие в действие фенозана К на эритроциты *in vitro* и *in vivo*, может быть связано, в частности, и с тем, что в случае *in vivo* за 12 часов, фенозан К, возможно, модифицируется в организме. Это предположение подтверждается тем фактом, что в организме животных (кролика) фенозан К, подвергается изменениям, превращаясь в коричную кислоту и 2,6-ди-трет-бутил-п-бензохинон [15]. С другой стороны определенная доля фенозана К может не изменяться и действовать на липид-белковую часть мембраны [143].

Иные закономерности были выявлены при действии гидрофобного антиоксиданта ИХФАН-10. Обнаружено, что ИХФАН-10 приводил к изменению морфологии эритроцитов при воздействии как *in vivo*, так и в системе *in vitro* (Рисунок. 4.6 - 4.9). На рисунке 4.7 представлено изменение площади, средней высоты и объема АСМ имиджа эритроцитов при введении ИХФАН-10 мышам в зависимости от его конечной концентрации (*in vivo*). При низких концентрациях достоверно уменьшается средняя высота эритроцита и наблюдается тенденция к увеличению площади эритроцита, при сохранении объема, т.е. наблюдается некоторое «расплющивание» эритроцитов, однако, при конечной концентрации 10^{-5} М/кг происходит достоверное уменьшение всех измеряемых параметров АСМ имиджей эритроцитов, в том числе и объема эритроцитов [115,116].

Как видно из рисунка 4.7 при введении ИХФАН-10 в суспензию эритроцитов в системе *in vitro*, уже начиная с малой концентрации 10^{-11} М, наблюдается увеличение объема, площади и высоты эритроцита.

Данные по изменению архитектоники эритроцитов при введении ИХФАН-10 *in vitro* не противоречат данным, полученным методами электронной микроскопии и спиновых меток. Так, ранее было показано, что

ИХФАН-10 *in vitro*, в концентрации 10^{-4} М вызывает изменение формы дискоцитов и в течении определенного времени (часы) переводит их в форму стоматоцитов и эхиноцитов [13, 36].

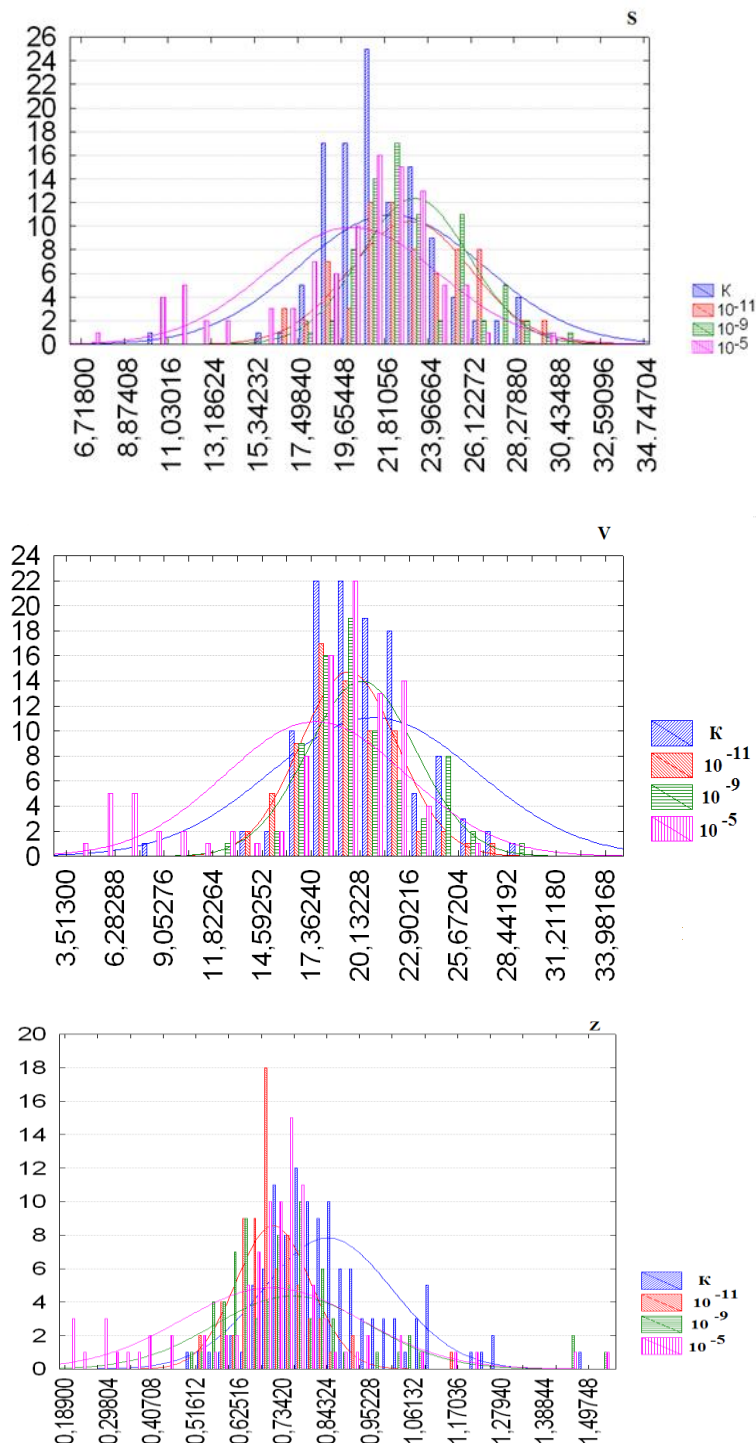


Рисунок 4.6. Гистограммы распределения площади (S), средней высоты (Z) и объема (V) АСМ имиджей эритроцитов при введении ИХФАН-10 *in vivo* в зависимости от его конечной концентрации (М/кг)

Такое различие в действии фенозана К и ИХФАН-10 может быть обусловлено различной гидрофобностью препаратов, а также тем, что как отмечалось ранее, фенозан К способен располагаться как на внешней так и на внутренней стороне мембраны эритроцитов, в то время как ИХФАН-10, способен закрепляться на поверхности мембраны эритроцита и частично проникать в липидную часть мембраны [13], изменяя осмотическое состояние и объем клетки.

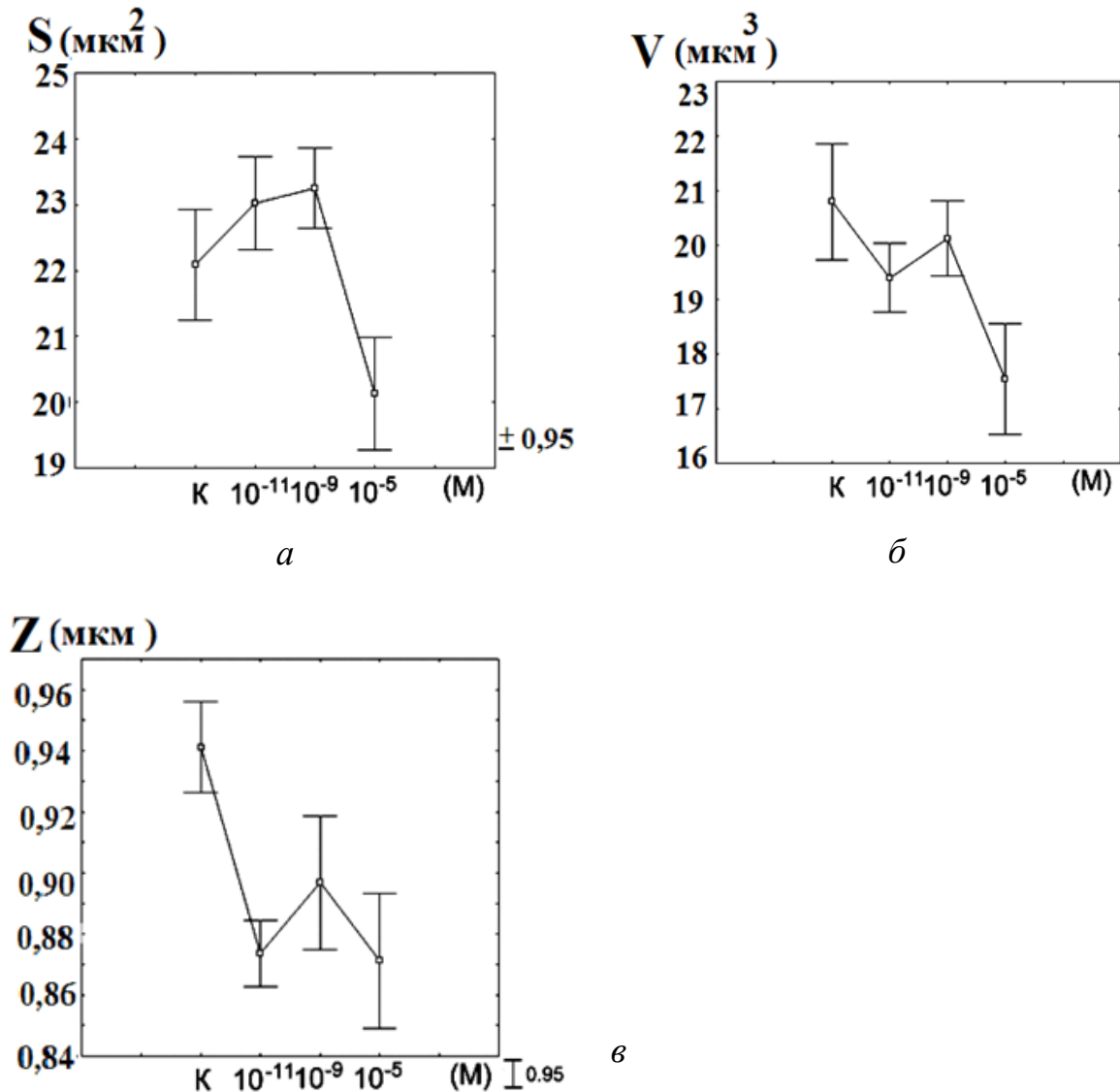


Рисунок 4.7. Изменение площади (S) – (а), средней высоты (Z) – (в) и объема (V) – (б) АСМ имиджей эритроцитов при введении ИХФАН-10 мышам (*in vivo*) в зависимости от его конечной концентрации (М/кг)

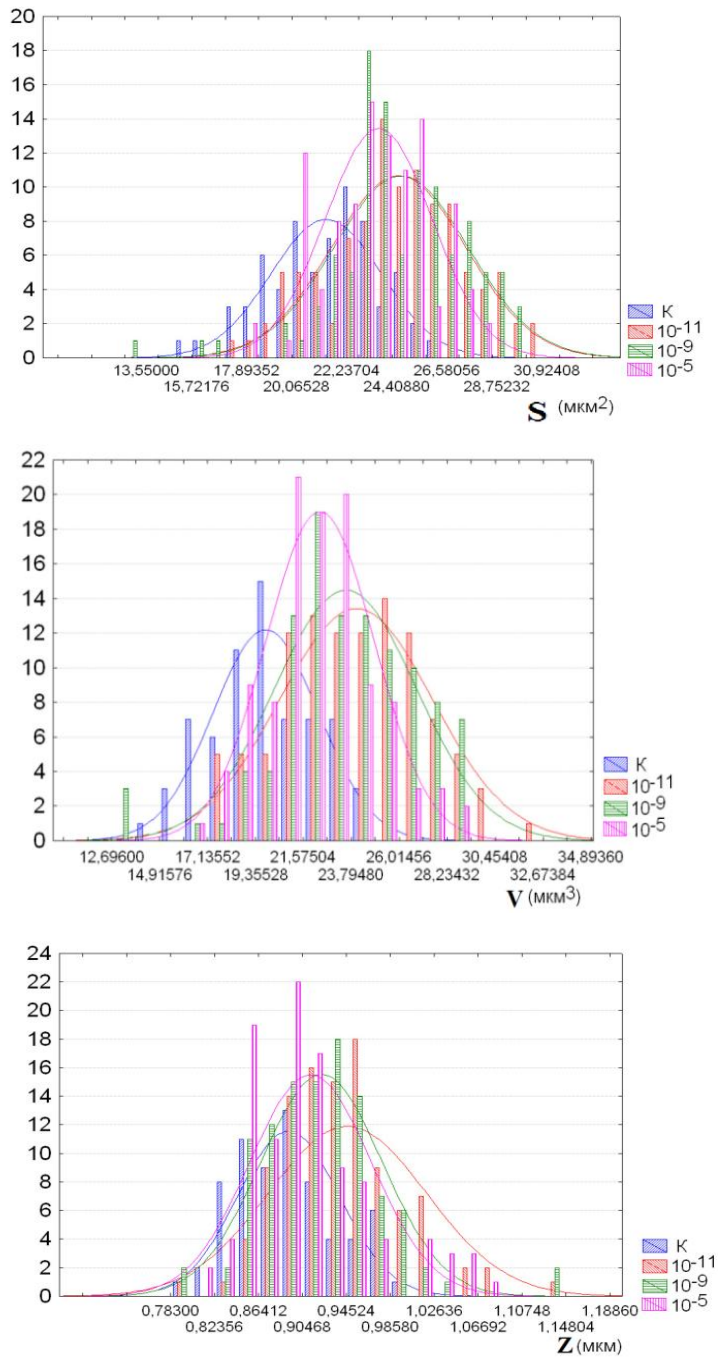


Рисунок 4.8. Гистограммы распределения площади, средней высоты и объема АСМ имиджа эритроцитов при введении препарата ИХФАН-10 *in vitro* в зависимости от его концентрации

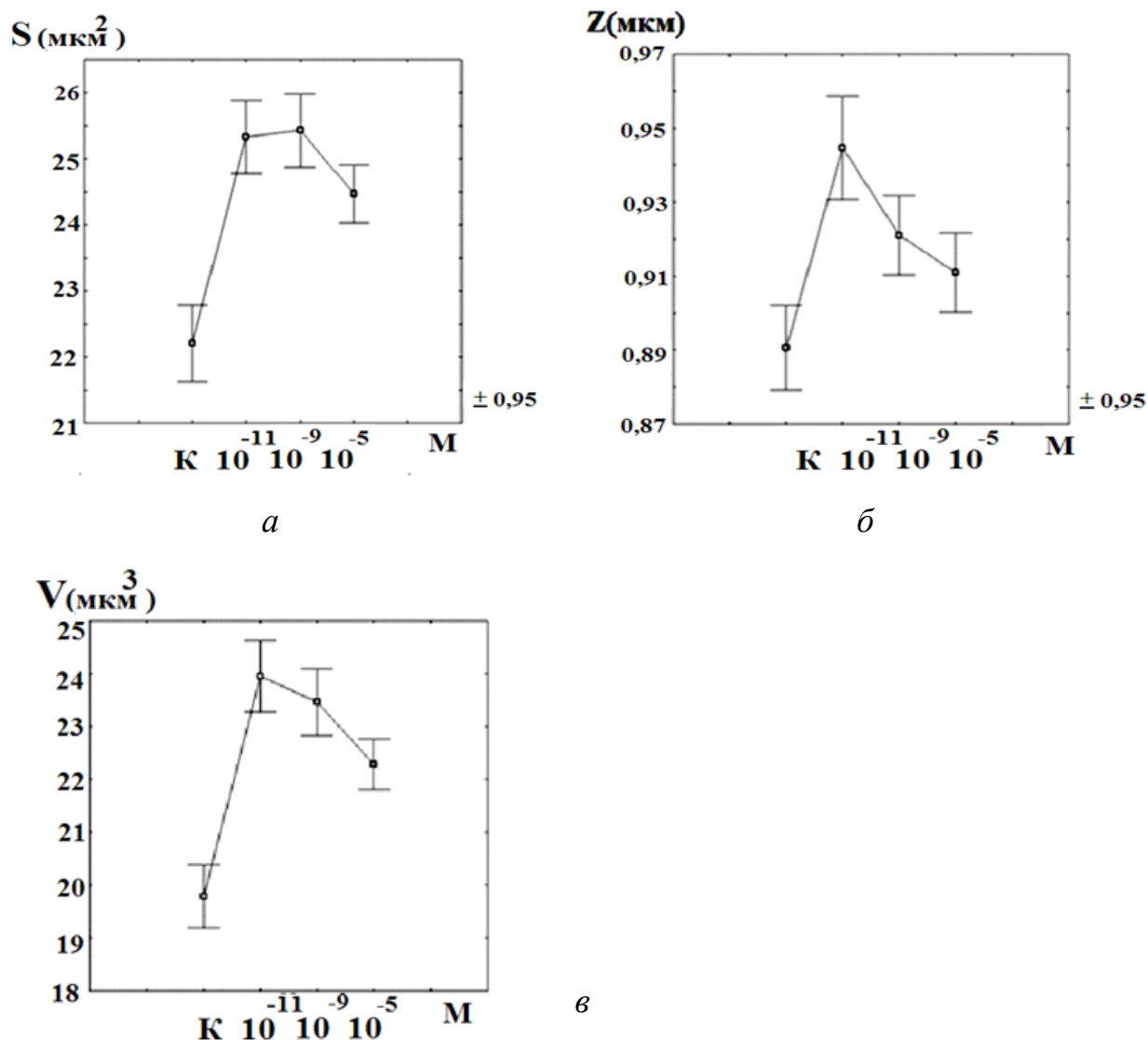


Рисунок 4.9. Изменение площади (S) – (а), средней высоты (Z) – (б) и объема – (V) (в) АСМ имиджей эритроцитов в зависимости от его конечной концентрации (M/kg) ИХФАН-10 (*in vitro*). Показан 95% доверительный интервал

Были обнаружены различные изменения в морфологии эритроцитов под действием исследуемых антиоксидантов: фенозана К и ИХФАН-10, регистрируемые при анализе АСМ имиджей эритроцитов, при проведении экспериментов *in vivo*, в сравнении с экспериментами *in vitro*, в отличие от представленного выше мелафена, который единообразно влиял на

архитектонику эритроцитов. Можно предположить, что это связано с различным механизмом действия АО *in vitro* и *in vivo*. Так гидрофобный антиоксидант ИХФАН-10, *in vitro*, по-видимому, встраивается в липид-белковые области мембраны меняя архитектонику эритроцитов, при этом *in vivo* механизм действия может быть иным и более сложным [115,116].

4.2. Влияние фенозана К и ИХФАН-10 на содержание антиапоптозного белка Bcl-2 в различных клетках

Целью настоящего исследования явилось изучение способности антиоксиданта фенозана К и синтезированного на его основе ИХФАН-10 влиять на механизмы модуляции апоптоза и репарации клеток. Известно, что при введении в организм фенозан К проявляет широкий спектр воздействий - антимикробные и противоэпилептические свойства, обнаруживает антиожоговое и радиопротекторное действие, а также предотвращает возникновение инфарктов и инсультов [6,144,145].

Ранее было показано, что антиоксидант фенозан К, введенный до или после облучения мышей в дозе 15 Гр, снижает интенсивность окислительных процессов в липидах после облучения [146]. Он также оказывал положительное влияние на отдаленные пострадиационные изменения в структуре ДНК головного мозга при облучении мышей линии СВА в сублетальной дозе 150 сГр [14,147]. В тоже время введение фенозана К в сверхмалой дозе 10^{-14} моль/кг мышам линии АКЭ в возрасте 3–4 месяцев приводило к уменьшению поражения животных лейкозом и к существенному увеличению продолжительности их жизни в случае поражения вирусом лейкоза Гросса [148,149]. Такой широкий спектр воздействия фенозана К позволяет предположить его влияние на сигнальные системы клетки, в том числе на митохондриальный путь инициации апоптоза.

Белок Bcl-2 является важным фактором защиты клеток крови от индуцированного апоптоза, кроме того, в тканях селезенки он участвует как в

механизме защиты мембран митохондрий от апоптоза, так и в процессе отбора и узнавания жизнеспособных клеток [150]. Он также является мощным противовоспалительным фактором. При этом в центрах размножения клеток крови происходит сверхэкспрессия белка Vcl-2 и, вместе с другими белками и цитокинами, связывание его с лимфоцитами крови, что способствует их распознаванию и выживанию [150].

Для изучения действия фенозана К мышам гибридов первого поколения F1 (CBA×C₅₇Bl) внутрибрюшинно вводили 10^{-14} или 10^{-4} М фенозана К в конечной концентрации в течении 4 дней, затем анализировали клетки селезенки на содержание белка Vcl-2.

На рисунке 4.10 представлены результаты проведения иммуноблоттинга белков экстракта селезенки мышей линии F1 и детектирование количества белка Vcl-2 – (а), диаграмма изменения количества белка Vcl-2 в белковых экстрактах селезенки мышей линии F1 после 4-х дневного введения фенозана К в зависимости от концентрации – (б).

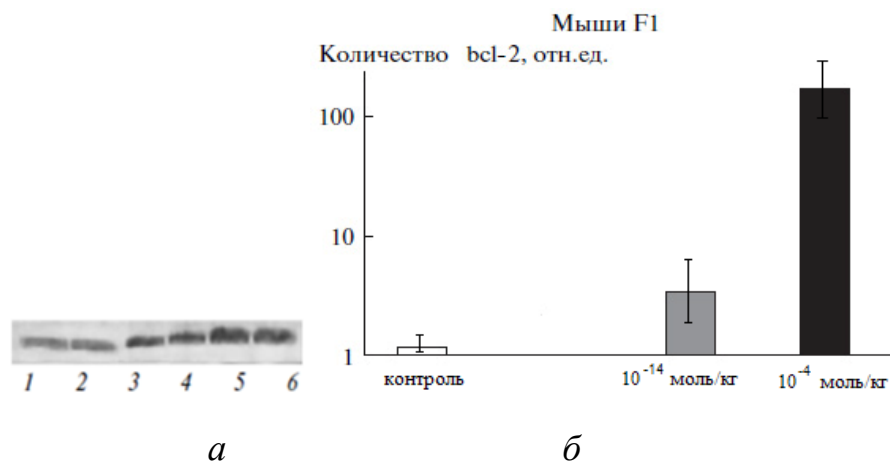


Рисунок 4.10. Иммуноблоттинг белка Vcl-2 в экстрактах клеток селезенки мышей линии F1 после введения фенозана К: контроль – (1, 2 колонка); 10^{-14} моль/кг – (3, 4); 10^{-4} моль/кг – (5, 6) – (а). Изменение количества белка Vcl-2 после воздействия фенозана К в дозах 10^{-14} и 10^{-4} моль/кг – (б)

Как видно из рисунка 4.10, фенозан К в сверхмалой дозе 10^{-14} М/кг и в большей дозе 10^{-4} М/кг при последовательном 4-х дневном введении *in vivo*, вызывает увеличение содержания белков Bcl-2 в экстракте селезенки мышей низкорактовой линии F1(CBA×C₅₇Bl). Это согласуется с ранее проведенными экспериментами в нашей лаборатории, в которых было показано, что фенозан К в сверхмалой дозе 10^{-14} М/кг и в дозе 10^{-4} М/кг вызывал увеличение содержания белков Bcl-2 в сыворотке крови у мышей низкорактовой линии F1(CBA×C₅₇Bl) и мышей лейкозной линии АКЭ [151,152]. Возрастание содержания белка Bcl-2 происходило симбатно с усилением процессов репарации [105] и коррелировало со снижением содержания двунитевых разрывов ДНК после воздействия фенозана К в клетках селезенки, при проведении экспериментов параллельно и на тех же препаратах [105].

Поэтому мы полагаем, что обнаруженное в работе увеличение содержания белка Bcl-2 в экстрактах селезенки мышей-гибридов F1 линий (CBA×C₅₇Bl) под действием фенозана К может способствовать усилению выживаемости клеток и вызывать многие положительные эффекты действия препарата: радиопротекторные, противоожоговые, противовоспалительные [14,146].

Поскольку антиоксидант ИХФАН-10, отличается от фенозана К наличием длинной гидрофобной цепи, то вероятно он будет проявлять иные эффекты действия на клетки, в том числе на клетки крови.

При проведении эксперимента по изучению действия ИХФАН-10 *in vitro*, антиоксидант в концентрации 10^{-8} моль/л инкубировали в течение 1 часа с гепариновым препаратом крови мышей, затем отделяли сыворотку крови, и методом иммуноблоттинга определяли содержание белка Bcl-2 в контрольных и в опытных образцах. Аналогичные эксперименты проводились также методом дот-блоттинга.

Результаты эксперимента по иммуноблоттингу белков сыворотки крови и детектирование содержания белка Bcl-2 после воздействия препарата ИХФАН-10 (10^{-8} моль/кг) приведены на рисунке 4.11, где приведено сканированное изображение нитроцеллюлозного мембранного фильтра.

Как видно из рисунка 4.12, воздействие 10^{-8} М ИХФАН-10, снижает содержание белка Bcl-2 в сыворотке крови мышей по сравнению с контрольным образцом.

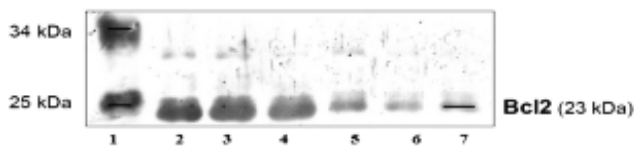


Рисунок 4.11. Иммуноблоттинг белка Bcl-2 в сыворотке крови мышей после введения 10^{-8} моль/кг ИХФАН-10 в препарат крови мышей: 1 колонка – маркер белков с молекулярной массой 25 кДа, 34кДа; 2, 3, 4 колонки – контроль; 5, 6, 7 колонки – 10^{-8} моль/кг ИХФАН-10. Обработка блота проводилась первым антителом “Monoclonal Anti-BCL-2 clone10C4”, и вторым антителом - иммуноглобулин anti-rabbit IgG (“Sigma”), меченый пероксидазой хрена

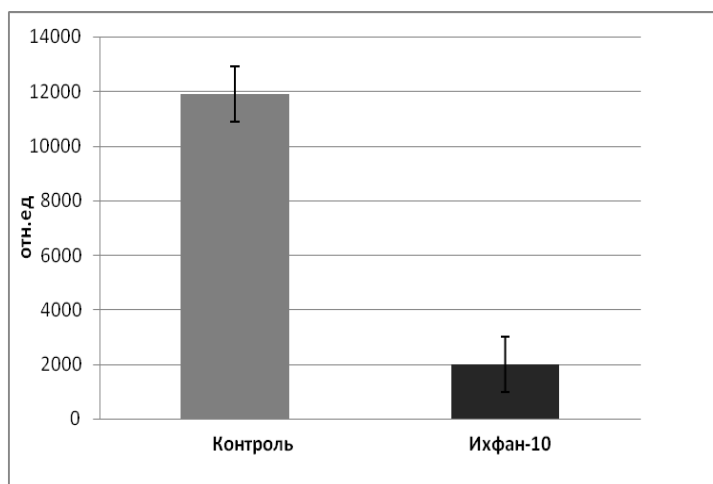


Рисунок 4.12. Содержание белка Bcl-2 в сыворотке крови при действии 10^{-8} моль/кг ИХФАН-10 на препарат крови

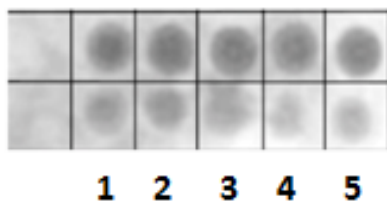


Рисунок 4.13. Определение содержания белка Bcl-2 на нитроцеллюлозной мембране методом дот-блоттинга, в сыворотке крови мышей, после обработки двумя антителами “Monoclonal Anti-BCL-2 clone10C4”, и второго антитела - иммуноглобулин anti-rabbit IgG (“Sigma”), меченый пероксидазой хрена. Верхний ряд – контроль, нижний ряд – после воздействия 10^{-8} моль/кг ИХФАН-10

Снижение содержания белка Bcl-2 было подтверждено также методом дот-блоттинга, результаты которого представлены на рисунке 4.13.

Из полученных данных следует, что действие ИХФАН-10 отличается от действия фенозана К, при этом ИХФАН-10 в концентрации (10^{-8} М) вызывает резкое уменьшение содержания белка Bcl-2 в крови мышей. Это может быть связано с генерализованным ответом клеток на воздействие препарата, приводящее к инициации сигналов, которые могут привести к апоптозу клеток. Таким образом, фенозан К и ИХФАН-10 оказывают разнонаправленное воздействие на содержание антиапоптотического белка Bcl-2 в животных клетках, что может приводить в дальнейшем к инициации эффектов репарации или апоптоза клеток соответственно [151,152]. Нельзя исключить, что различные эффекты действия указанных антиоксидантов могут быть также связаны с их различным действием на редокс-чувствительные факторы транскрипции.

Действие ИХФАН-10 в низкой концентрации может быть обусловлено его способностью встраиваться в липидные слои мембран различных клеток, и существенно изменять их функцию, а также тем, что как сильное гидрофобное соединение он может взаимодействовать с ЛПНП

(липопротеиды низкой плотности), находящимися в крови. Кроме того, важна его способность ингибировать ацетилхолинэстеразу.

Это особенно важно потому, что при применении ИХФАН-10 в качестве терапевтического препарата, который может применяться, в том числе при лечении болезни Альцгеймера, нужно учитывать его действие на мембраны клеток и его возможный проапоптотический эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для обеспечения устойчивости, предсказуемости и повышения урожайности сельскохозяйственных культур учеными Института органической и физической химии им. А.Арбузова предложен препарат “мелафен”, который рекомендован в качестве регулятора роста растений, отвечающий современным требованиям технологий для испытания на ведущих сельскохозяйственных культурах.

Результаты экспериментов, полученные в настоящей работе, согласуются с теми рекомендациями, которые были сделаны при патентовании препарата и введении его в с/х практику. Они продемонстрировали протекторное действие мелафена в малых дозах на митохондрии проростков гороха в условиях стрессового воздействия.

Так методом АСМ было обнаружено, что митохондрии, полученные из 5-ти дневных проростков гороха (*Pisum sativum L*), при стрессовом воздействии (умеренное охлаждение и недостаточное увлажнение) приобретают увеличенные размеры, по сравнению с контрольными препаратами, а также появляются крупные, набухшие митохондрии. При этом в образцах почти не наблюдаются делящиеся митохондрии. Впервые методом АСМ было обнаружено, что предварительная обработка семян гороха мелафеном в малой концентрации 2×10^{-12} М обладает защитным действием и предотвращает изменения морфологии митохондрий

проростков гороха при стрессовом воздействии в период прорастания. При этом вновь наблюдались делящиеся митохондрии, как и в контрольных препаратах митохондрий [153].

Анализ литературных и собственных экспериментальных данных позволил предположить, что эффект действия мелафена может быть обусловлен его антиоксидантными свойствами, которые могут приводить к снижению интенсивности процессов свободнорадикального окисления, предотвращению активации перекисного окисления липидов и сохранению морфологии митохондрий. Кроме того, существует предположение, что мелафен осуществляет свое воздействие на клетку по типу действия фитогормонов (кинетина), и обладает действием, сходным с действием сигнальной АТФ [60,61]. Ранее показано, что в эквимольной концентрации АТФ, кинетин и мелафен оказывают однонаправленное и близкое по величине увеличение роста растительных клеток (хлореллы) и в одинаковой степени стимулируют энергетические процессы в этих клетках [154]. Не исключено, что мелафен может действовать не только как антиоксидант, но и как сигнальная молекула. Это согласуется с нашими данными по эффекту действия мелафена на метаболизм растительных митохондрий в сверхнизкой концентрации, а также обнаруженное в работе на молекулярных моделях сходство размеров и расположения зарядов на поверхности, доступной для молекул воды, для меламиновой части мелафена и адениновыми участками молекулы АТФ и кинетина. Можно предположить, что его действие на растительные клетки может быть обусловлено, в том числе, и взаимодействием с нуклеотид (пурин) связывающими участками рецепторных белков - регуляторов метаболических процессов растительной клетки.

При практическом использовании мелафена важно также было выяснить его действие на животные клетки, на которые он может оказывать как положительное, так и негативное воздействие. Эти различия могут быть

связаны, в частности с тем, что клеточные ответы на пуринергетические раздражители отличаются у растений и животных. Поэтому, важно было ответить на вопрос, влияет ли мелафен в концентрации 10^{-10} М на проведение сигнала апоптоза в животных клетках - клетках мышей АКЭ, обладающих полным набором метаболических регуляторных систем. Методом иммуноферментного анализа впервые было показано, что мелафен (10^{-10} М) в модельной системе, при инкубации с клетками мышей АКЭ, вызывал увеличение содержания белка p53 и снижение количества антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках через 1,5 часа после воздействия, что может явиться инициацией процессов апоптоза клеток.

Механизм действия мелафена на молекулярные пути апоптоза может быть связан с обнаруженным ранее угнетением Ca^{2+} -сигнализации клеток при концентрации 10^{-10} М и выше (путем воздействия через метаболитные пуринорецепторы P2Y) [26], что способно приводить к активации Ca^{2+} -связывающих белков S100, управляющих транскрипционной активностью белка p53.

При попадании мелафена по пищевой цепочке в организм животных и человека, он может транспортироваться эритроцитами по кровеносной системе. Важно было определить, влияют ли малые концентрации мелафена на морфологию эритроцитов в системе *in vivo* и *in vitro*. Методом АСМ с использованием статистических подходов было показано, что, начиная с низких (10^{-11} М) и более высоких концентраций, наблюдается закономерное снижение размерных параметров и объема эритроцитов мышей, которое происходит сходным образом при проведении экспериментов в системе *in vivo* и *in vitro*. Это может быть связано с тем, что мелафен, вероятно влияет на работу АТФ зависимых ионных насосов (в том числе Ca^{2+} - АТФазы и Na^+/K^+ - АТФазы) и ионных каналов в мембране клеток, изменяя осмотическое состояние эритроцитов, приводя к уменьшению его объема, предположительно за счет увеличения внутриклеточного содержания Ca^{2+} .

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при применении мелафена в качестве стимулятора роста растений и при обработке семян растений, надо следовать рекомендации его применения, не превышая рекомендованные концентрации. В этом случае попадание его в организм животных маловероятно.

На эритроцитарной модели методом АСМ было прослежено за изменением архитектоники эритроцитов под влиянием других антиоксидантов: фенозана К и синтезированного на его основе ИХФАН-10, которые предлагаются в настоящее время для терапии нейродегенеративных процессов, а также проведено сравнение с действием мелафена на эритроциты.

В проведенных нами исследованиях мы использовали метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), который позволяет получать непосредственно трехмерный рельеф исследуемой поверхности, проследить за изменениями размерных параметров отдельного эритроцита, и провести статистическую обработку этих результатов.

В то же время, для поставленной цели исследования были разработаны методические подходы при выделении и фиксации эритроцитов, проведен выбор подложки для АСМ исследования, разработана методика приготовления образцов, а также выбраны программы для анализа АСМ имиджей с возможностью дальнейшей статистической обработки.

В настоящей работе было продемонстрировано, что метод АСМ позволяет достоверно определить изменение размерных параметров эритроцитов при гликолитическом голодании эритроцитов, а также при действии антиоксидантов *in vivo* и *in vitro*. Были выявлены статистически достоверные изменения в эритроцитах и митохондриях растений при действии антиоксидантов и регулятора роста растений мелафена.

При исследовании эритроцитов в системе *in vitro*, т.е. при инкубации их с АО в течении часа, обнаружено, что мелафен приводит к снижению

объема эритроцитов, фенозан К не влияет на архитектуру эритроцитов, а ИХФАН-10 приводит к увеличению площади, высоты и объема эритроцитов.

Было показано, что изменение формы эритроцитов при введении фенозана К и ИХФАН-10 *in vivo* отличается от воздействия препаратов в системе *in vitro*. При этом для обоих АО и мелафена *in vivo* наблюдается снижение размерных параметров эритроцитов, что свидетельствует о многоплановом воздействии этих АО на мишени в живом организме, и характеризовало, по-видимому, системный ответ организма на действие антиоксидантов [155].

Различие в действии фенозана К и ИХФАН-10 *in vitro* по-видимому связано с различной гидрофобностью препаратов (фенозан К - амфифильное, а ИХФАН-10 - гидрофобное соединение), и локализацией в мембране эритроцитов. Фенозан К может преимущественно располагаться вблизи поверхности мембраны, в то время как жирнокислотная цепь ИХФАН-10 позволяет встраиваться в липидный бислой пронизывая его и меняя микровязкость клеточной мембраны [13]. При этом АО могут оказывать влияние на липидные компоненты мембраны и мембрано-связанные ферменты, регулирующие ионный обмен. Не исключено также, что действие фенозана К и ИХФАН-10 происходит опосредовано, путем связывания с разными участками мембран вблизи ферментов и каналов, усиливаясь в малых дозах, например, воздействуя через систему рафтов.

Этот вывод согласуется с тем, что ряд синтетических и естественных АО, например, растительные флавоноиды, пирокатехины, L-аскорбиновая кислота и др., действуют на систему перекисного окисления липидов, ингибируя процессы окисления липидов, и при этом одновременно изменяют активность белков регулирующих ионный обмен Ca^{2+} - АТФазы и Na^{+}/K^{+} - АТФазы [156].

Рассматривая антиоксидантные свойства БАВ, следует учитывать, что они могут оказывать как про-, так и антиоксидантное воздействие на

биологические системы, например, как редокс-медиаторы. Но, они могут влиять на молекулярные мишени путей апоптоза, например, на активность и экспрессию транскрипционного фактора, белка регулятора p53, а также содержание антиапоптозного белка Bcl-2. Белок контроллер p53, находящийся в митохондриях, может участвовать как в процессе антиоксидантной защиты, так и в индукции апоптоза путем прямого взаимодействия с белками семейства Bcl-2. Нами показано, что РРР мелафен *in vitro* в суспензии опухолевых клеток мышей АКЭ, вызывал увеличение содержания белка p53 и снижение содержания антиапоптозного белка Bcl-2. Также на модельной системе было обнаружено, что антиоксидант ИХФАН-10 вызывал снижение содержания Bcl-2 в клетках крови, что может приводить к инициации апоптотических сигналов в этих клетках [155]. Сходным образом действовали на мишени пути апоптоза различные флавоноиды растительного происхождения, так некоторые из теафлавинов инициировали повышение экспрессии белка p53 и белки апоптоза BAX, а другие приводили к снижению экспрессии Bcl-XL и Bcl-2 [3].

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что АО фенозан К, ИХФАН-10 и мелафен влияют на систему сигнальной трансдукции, репарации и апоптоза клеток.

В работе было выявлено, что фенозан К (в концентрации 10^{-14} и 10^{-4} М) в системе *in vivo* вызывал индукцию антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках селезенки мышей F1 (СВА×С₅₇В1), как и в сыворотке крови мышей АКЭ [152]. Поскольку антиапоптозный белок Bcl-2 пролонгирует выживаемость клеток, то он может оказывать положительное воздействие на метаболизм животных клеток. Индукция антиапоптозного белка может быть связана с многочисленными положительными эффектами действия фенозана К, такими как адаптационные, противовоспалительные, репарационные, противоожоговые.

Таким образом, полученные с помощью методов АСМ и иммуноферментного анализа результаты, позволяют предложить новые подходы к использованию этих методик для целей изучения механизма воздействия АО и БАВ на клеточном и субклеточном уровне. В работе были получены новые данные по действию очень низких концентраций АО на растительные митохондрии и животные клетки, а также на молекулярные мишени сигнального пути апоптоза. Рассмотрены возможные механизмы их воздействия на растительные и животные клетки.

ВЫВОДЫ

1. Методом атомно - силовой микроскопии выявлены статистически достоверные изменения в клеточных (эритроциты) и субклеточных (митохондрии растений) структурах при различных воздействиях, включая действие антиоксидантов и регулятора роста растений мелафена.

2. Обнаружено, что комбинированное воздействие недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения на прорастающие семена гороха вызывало морфологические изменения митохондрий 5-ти дневных проростков, однако предварительная обработка семян мелафеном (2×10^{-12} М) предотвращала данные изменения.

3. Мелафен в дозах 10^{-11} - 10^{-5} М при применении как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* вызывал достоверное снижение среднего объема эритроцитов, что может оказывать влияние на реологические свойства крови.

4. Действие препаратов фенозана калия и ИХФАН-10 на размерные параметры эритроцитов было сходным в эксперименте *in vivo*, что характеризовало, по-видимому, системный ответ организма на действие антиоксидантов и различалось в системе *in vitro*, что отражало особенности связывания этих соединений, различающихся по гидрофобности, с эритроцитарной мембраной.

5. Фенозан калия (10^{-4} и 10^{-14} М) при последовательном введении мышам в течение 4-х дней вызывал усиление индукции антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках селезенки, что согласуется с известными репарационными и противовоспалительными свойствами указанного препарата.

6. Мелафен (10^{-10} М) вызывал увеличение содержания белка p53 и одновременно снижал уровень антиапоптозного белка Bcl-2 в суспензии опухолевых клеток асцитной карциномы Эрлиха, что может указывать на инициацию апоптотических сигналов в этих клетках.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова, Е.Б. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты / Е.Б. Бурлакова, С.Д. Варфоломеев, Г.Е. Заиков, С.С. Злотский, Д.Л. Рахманкулов, А.Е. Шилов.– Москва: «Химия», 2005. – 704с.
2. Перевозкина, М.Г. Сравнительная активность фенольных радикалов пространственно затрудненных фенолов производных фенозана / М.Г. Перевозкина, Н.М. Сторожок, В.Е. Борисенко // Вестн. Тюмен. гос. ун-та. – 2006. –Т 3. – С. 58–66.
3. Тараховский, Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов, Е.Н. Музафаров // Пушино: Synchronobook. – 2013. – 310с.
4. Шишкина, Л.Н. Определение антиокислительной активности индивидуальных веществ и липидов на метилолеатной окислительной модели / Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo* // –М: Наука, 1992. – С.26–30.
5. Ершов, В.В. Пространственно - затрудненные фенолы / В.В. Ершов, Г.А. Никифоров, А.А. Володькин // М: Химия. – 1972. – 351с.
6. Бурлакова, Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности // Рос. хим. журн. –1999. –Т. 43, № 5. – С.3–11.
7. Пальмина, Н.П. К вопросу о “рецепторном” механизме действия биологически активных веществ в сверхнизких концентрациях / Н.П. Пальмина, Л.В. Кледова, Т.В. Панкова, В.Д. Гаинцева // Радиационная биология Радиоэкология. –2003. – Т.43, №3. – С.310–314.
8. Жигачева, И.В. Пространственно - затрудненные фенолы как адаптогены к стрессовым воздействиям / И.В. Жигачева, Е.Б. Бурлакова, А.Н. Голощاپов // В сб. Фенольные соединения: фундаментальные и

прикладные аспекты: материалы докладов VIII Международного симпозиума.– М: ИФР РАН; РУДН. –2012. – С. 71–74.

9. Часовская, Т.Е. Действие фенозана калия на структуру плазматических мембран клеток печени мышей *in vitro* / Т.Е. Часовская, Е.Л. Мальцева, Н.П. Пальмина // БИОФИЗИКА. – 2013. – Т.58,№. 1. – С. 97–105.

10. Мальцева, Е.Л. Природный (α -токоферол) и синтетический (калиевая соль фенозана) антиоксиданты как регуляторы активности протеинкиназы С в широком диапазоне концентраций (10^{-4} - 10^{-20} М) / Е.Л. Мальцева, Н.П. Пальмина, Е.Б. Бурлакова // Биологические мембраны. – 1998. – Т.15,№2. – С.199–212.

11. Перевозкина, М.Г. Взаимосвязь химической структуры и ингибирующего действия стерически затрудненных фенолов группы Ихфанов / М.Г. Перевозкина, Н.М. Сторожок, Г.А. Никифоров // Биомедицинская химия. –2005. –Т.51,№4. – С.413–423.

12. Киселева, Ю.В. Самоорганизация и физико-химические свойства водных растворов амфифильных производных фенолов и бромида цетилтриметиламмония в области низких концентраций в естественных и гипoeлектромагнитных условиях: автореф. дис. ... д-ра хим. наук // Киселева Юлия Васильевна. –2013. – 24с.

13. Parshina, E.Yu. Effect of Hybrid Antioxidants - Ichphans-on the Surface Architectonics of Eritrocytes / E.Yu. Parshina, L.Ya. Gendel, A.B. Rubin // Chemical and Biochemical Reactions N.Y.: Nova Science. –2011. – P.71–78.

14. Бурлакова, Е.Б. Рентгеновский дифракционный анализ липосом из природных липидов при добавлении синтетических антиоксидантов / Е.Б. Бурлакова, Г.В. Архипова, А.В. Кривандин, И.Л. Погорецкая // Нейрохимия. –1996. – Т.13, №2. – С. 128–133.

15. Бурлакова, Е.Б. Метод скрининга веществ, действующих в сверхмалых концентрациях / Е.Б. Бурлакова, Н.Е. Лебедева, Т.В. Головкина,

Е.Н. Горбатова // Радиационная биология, Радиоэкология. –2003. –Т.3. – С.282–286.

16. Гендель, Л.Я. Изменения поверхностной архитектоники эритроцитов под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана-1 / Л.Я. Гендель, Л.В. Ким, О.Г. Лунёва, В.А. Федин, К.Е. Круглякова // Известия РАН. Сер.биол. –1996, №4. – С.508–512.

17. Прокопов, А.А. Исследование биодоступности лекарственных форм фенозан-кислоты/ А.А. Прокопов, Л.В. Шукиль, А.С. Берлянд // Химико-фармацевтический журнал. – 2006, № 1. – С.3–5.

18. Никифоров, Г.А. Биоантиоксиданты "поплавкового" типа на основе производных 2,6 дитретбутил-фенола / Г.А. Никифоров, И.С. Белостоцкая, В.Б. Вольева, Н.Л. Комиссарова, Д.Б. Горбунов // В сб.: Биоантиоксидант, Научный вестник мед акад. – 2003. – С50–51.

19. Пат. 2071766 Россия, МКИ А61К31/22. Средство, обладающее антивирусной активностью / Т.Г. Орлова, Г.А. Никифоров, В.В. Ершов, Е.Б. Бурлакова, Ф.В. Воронина, Е.М. Молочкина и др.; заявитель и патентообладатель Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. - № 93057894/14; заявл. 29.12.1993; опубл 20.01.1997.

20. Алексеева, О.М. Влияние экранированных фенолов на структуру липидов, а также растворимых и мембранных белков/ О.М. Алексеева, Ю.А. Ким, А.Н. Голощапов, В.А. Рыков, Е.М. Миль // Фенольные соединения. Фундаментальные и прикладные аспекты. –2010. –С.116–126.

21. Паршина, Е. Ю. Особенности взаимодействия новых гибридных антиоксидантов-ихфанов с эритроцитарной мембраной: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / Паршина Евгения Юрьевна. –М. –2006. –120 с.

22. Озерова, И.Б. Новые антиоксиданты - экранированные фенолы как модуляторы активности ацетилхолинэстеразы *in vitro* и *in vivo*: автореф. дис. ... канд. биол.наук / Озерова Ирина Борисовна.–2000. – 21с.

23. Николаев, А.Я. Биологическая химия//Учеб. для мед. Вузов.-М.: Высш. шк., – 1989. –495с.

24. Жигачева, И.В. Влияние мелафена на рост и энергетические процессы растительной клетки / И.В. Жигачева, А.И. Лосева, В.С. Коновалов, В.С. Резник, А.Ю. Алябьев, Л.Х. Гордон, В.И. Трибунская // Доклады РАН. – 2004. – Т. 394. – С. 127–129.

25. Шугаев, А.Г. Выделение интактных митохондрий из корнеплода сахарной свеклы / А.Г. Шугаев, Э.И. Выскребенцева и др. // Физиология растений. –1982. –Т. 29. –С. 799–803.

26. Алексеева, О.М. Влияние мелафена на структурное и функциональное состояние мембран липосом и клеток асцитной карциномы Эрлиха / О.М. Алексеева, Л.Д. Фаткуллина, Ю.А. Ким, Е.Б. Бурлакова, С.Г. Фаттахов, А.Н. Голощанов, А.И. Коновалов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т. 147, № 6. – С.684–688.

27. Бурлакова, Е. Б. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов / Е.Б. Бурлакова, А.А. Конрадов, Е.Л. Мальцева // Хим. физика. –2003 . – Т. 22, № 2. – С. 21-40 .

28. Жигачева, И.В. Морфологические характеристики митохондрий проростков гороха в условиях сочетанного действия недостатка влаги, умеренного охлаждения и обработки препаратом мелафен / И.В. Жигачева, И.П. Генерозова, В.И. Бинюков, Е.М. Миль, А.А. Албантова // Материалы Межд. науч.-практ. конф. Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий». Калининград. – 2014. – С. 221-223.

29. Жигачева, И.В. Функциональное состояние мембран митохондрий корнеплода сахарной свеклы при действии препарата мелафен / Л.Д. Фаткуллина, А.Г. Шугаев, И.П. Генерозова, С.Г. Фаттахов, В.С. Резник, А.И. Коновалов // Физиология растений. – 2007. – Т.54, № 5.– С. 672–677.

30. Жигачева, И.В. Фосфорорганический регулятор роста растений: устойчивость клеток растений и животных к стрессовым воздействиям / И.В. Жигачева, Е.Б. Бурлакова, А.Г. Шугаев, И.П. Генерозова, С.Г. Фаттахов, А.И. Коновалов // Биологические мембраны. –2008. –Т. 25. –С.183–189.

31. Алексеева, О.М. Некоторые аспекты взаимодействия гидрофильных и гидрофобных производных фенозана с клетками животного происхождения / О.М. Алексеева, В.Б. Вольева, Н.Л. Комиссарова, И.С. Белостоцкая, Н.С. Домнина, А.Н. Голощанов, Е.Б. Бурлакова // В сб. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2012. – С.18-22.

32. Сарбаш, В.И. Эритроциты — носители лекарственных препаратов / В. И. Сарбаш, А. Г. Тихонова, Т.А. Вуймо, А.Л. Дербов, Ю.Г. Александрович, А.А. Бутылин, В.М. Витвицкий, Ф.И. Атауллаханов // Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. – 2007. – Т.1, № 1. – С.143-149.

33. Freedman, J.C. Membrane potential and cytotoxic Ca cascade of human red blood cell / J.C. Freedman, E.M. Bifano, L. M. Crespo et. al. // *Physiol. Blood: 41st Annu. Symp. Soc. Gen. Physiol. Woods Hole. N.-Y.* – 1988. – P. 217–231.

34. Атауллаханов, Ф.И. Регуляция объема эритроцитов человека. Роль калиевых каналов, активируемых кальцием / Ф.И. Атауллаханов, В.М. Витвицкий, А.Б. Кияткин, А.В. Пичугин // *Биофизика.* –1993. –Т. 38(5). – С.809–821.

35. Parshina, E. Yu. Interaction of Hybrid Antioxidants – Ichphans with an Erythrocyte Membrane / E.Yu. Parshina, L.Ya. Gendel', A.B. Rubin // *News in Chemistry, Biochemistry and Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development.* –2013. –P. 53–60.

36. Panin, L.E. Interaction Mechanism of Cortisol and Catecholamines with Structural Components of Erythrocyte Membranes/ L.E. Panin, P.V.

Mokrushnikov, V.G. Kunitsyn, B.N. Zaitsev // *J. Phys. Chem. B.* –2010. –V.114, №29. –P. 9462–9473.

37. Войников, В.К. Ядерно-митохондриальные взаимоотношения при редокс-регуляции экспрессии генов растений при стрессах / В.К. Войников // В сб. «Растение и стресс. –М. 2010. –С. 90–91.

38. Bakeeva, L.E. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle / L.E. Bakeeva, Yu.S. Chentsov, V.P. Skulachev // *Biochim Biophys Acta.* –1978. –V. 50, № 3. –P.349–369.

39. Logan, D.C. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells/ D.C. Logan, C.J. Leaver // *J Exp Bot.* –2000. –V. 51. –P. 865–871.

40. Scott, I. Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis/ I. Scott, D.C. Logan // *New Phytol.* –2008. –V. 177. –P. 90–101.

41. Zhang, L. Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that HsfA2 alleviates oxidative damage caused by heat stress in Arabidopsis / L. Zhang, Li. Yinshu, Da-Xing, Caiji Gao// *J. Exp. Bot.* – 2009. –V. 60. –P. 2073–2091.

42. Claypool, S.M. Mitochondrial mislocalization and altered assembly of a cluster of Barth syndrome mutant tafazzins / S.M. Claypool, J.M. McCaffery, C.M. Koehler // *J. Cell Biol.* –2006. –V.174,№. 3. –P.379–390.

43. Грин, Н. Биология / Н/ Грин, У. Стаут., Д. Тейлор // Пер. с англ. Под ред. Р.Сопера. –М.: Мир. –Т.2– 1990. –325с.

44. Nagata, S. Mitochondria catalyze the reduction of NAD by reduced methylviologen / S. Nagata, H. Günther, J. Bader, H. Simon // *FEBS Lett.* –1987. –V.1. –P.66–70.

45. Жигачева, И.В. Антистрессовые свойства препарата мелафен / И.В. Жигачева, Л.Д. Фаткулина, И.Ф. Русина, А.Г. Шугаев, И.П.

Генерозова, С.Г. Фаттахов, А.И. Коновалов // Доклады РАН. –2007. –Т.414, № 2. – С. 263–265.

46. Ерохин, В.Н. Влияние мелафена на развитие солидной карциномы Льюис мышей /А.В. Кременцова, В.А. Семенов, В.Н. Ерохин // Мелафен: механизм действия и области применения. Под ред. С.Г. Фаттахова, В.В. Кузнецова, Н.В. Загоскиной. — Казань: «Печать-Сервис XXI век». –2014. – С. 337–343.

47. Коновалов, А.И. Физико-химическая загадка сверхмалых доз / А.И. Коновалов // Химия и жизнь - XXI век. –2009. – №2. – С.6–9.

48. Коновалов, А.И. Супрамолекулярные системы на основе дигидрата меламиновой соли бис (гидроксиметил) фосфиновой кислоты (мелафен) и поверхностно-активных веществ / А.И. Коновалов, И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, А.П. Тимошева, Р.Р. Шигидуллин, А.В. Чернова, Л.В. Аввакумова, С.Г. Фаттахов // Известия РАН. Сер. хим. –2008, №6. – С.1207–1214.

49. Dulińska, I. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy/ I Dulińska , M Targosz // J Biochem Biophys Methods. –2006. –V.66. – Issue 1.–P. 1–11.

50. Рыжкина, И.С. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ / И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов // Доклады РАН. –2009. – Т. 428, № 4. – С. 487–491.

51. Алексеева, О.М. Исследование взаимодействия мелафена с фосфолипидными мембранами / О.М. Алексеева, А.В. Кривандин, О.В. Шаталова, В.А. Рыков, С.Г. Фаттахов, Е.Б. Бурлакова, А.И. Коновалов // Доклады РАН. – 2009. – Т.427, N 6. – С.837–839.

52. Осипенкова, О.В. Включение двух пластидных сигналов в регуляцию экспрессии ядерного гена хлоропластного белка Elip / О.В./

Осипенкова, М.Г./ Рахимбердиева, Н.В./ Карапетян, Н.П. Юрина // Доклады РАН. – 2007. – Т. 416, № 4. – С. 546–549.

53. Кузнецов, В.В. Мелафен повышает активность РНК-полимеразы I, но не влияет на транскрипцию пластидных генов в растениях ячменя / В.В. Кузнецов, А.К. Кравцов, С.Ю. Селиванкина, Я.О. Зубо, Н.К. Зубкова, О.Н. Кулаева, С.Г. Фаттахов, А.И. Коновалов // Доклады РАН. –2010. –Т. 431. –С. 551–555.

54. Каримова, Ф.Г. Тирозинное фосфорилирование белков / Ф.Г. Каримова / Клеточная сигнализация. Под ред. Гречкина А.Н. –Казань: ФЭН, – 2010. – С.37–45.

55. Войников, В.К. Температурный стресс и митохондрии растений / В.К. Войников // Новосибирск. –1987. –133с.

56. Di Paola, M. Interaction of Free Fatty Acids with Mitochondria: Coupling, Uncoupling and Permeability Transition / Di. Paola M, M. Lorusso // Biochim. Biophys. Acta. –2006. –Vol. 1757. –P. 1330–1337.

57. Belosludtsev, K.N. On the Mechanism of Palmitic Acid-Induced Apoptosis: the Role of a Pore Induced by Palmitic Acid and Ca^{2+} in Mitochondria / K.N. Belosludtsev, N.E. Saris, L.C. Andersson, N. Belosludtseva, A. Agafonov, A. Sharna, D.A. Moshkov, G.D. Mironova //J. Bioenerg. Biomembr. –2006. –V. 38, № 2. –P. 113–120.

58. Дронова, Л.М. Кинетические закономерности развития эритромиелоза у крыс / Л.М. Дронова, Е.И. Белич, В.Н. Ерохин, Н.М. Эммануэль //Известия. РАН. Сер. Биол. –1996, № 5 –С.743–750.

59. Жигачева, И.В. Сверхмалые концентрации препарата «Мелафен» изменяют структурно-функциональные характеристики биологических мембран растительного и животного происхождения / И.В. Жигачева, Л.Д. Фаткуллина, А.Г. Шугаев // М 47 Мелафен: механизм действия и области применения. Под ред. С.Г. Фаттахова, В.В. Кузнецова, Н.В. Загоскиной. — Казань: «Печать-Сервис XXI век». – 2014. –С.136–147.

60. Фаттахов, С.Г. Меламиновая соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (Мелафен) – регулятор роста растений нового поколения/ С.Г. Фаттахов, В.С. Резник, А.И. Коновалов // Матер. 13 Межд. конф. по химии фосфора. СПб. –2002. –С. 80.

61. Фаттахов, С.Г. Меламиновая соль бис(оксиметил) фосфиновой кислоты (мелафен) в качестве регулятора роста и развития растений и способ ее получения / С.Г. Фаттахов, Н.Л. Лосева, В.С. Резник и др. // Патент РФ №2158735 от 10.11.2000. г. Москва.

62. Ralevic, V. Receptors for purines and pyrimidines / V. Ralevic, G. Burnstock // Pharmacological Reviews. –1998. –V. 50. –P.413–492.

63. Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors / G. Burnstock, L. Bolis, R.W. Straub // Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones. Raven Press: New York. –1978. –P.107–118.

64. Zheng, L.M. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death / L.M. Zheng, A. Zychlinsky, C. Liu, D.M. Ojcius, J.D. Young // J. Cell Biol. –1991. –V.112. –P. 279–288.

65. Bours, M.J. Adenosine 50-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation / M.J. Bours, E.L. Swennen, Di. F. Virgilio, B.N. Cronstein, P.C. Dagnelie // Pharmacol. Ther. –2006. –V. 112. –P.358–404.

66. Зиганшин А.У. Роль рецепторов АТФ (P2-рецепторов) в нервной системе / А.У. Зиганшин. // Неврологический вестник. –2005. –Т. XXXVII, №1-2. –С.45–53.

67. Nakazawa, H. Involvement of the nitric oxide–cyclic GMP pathway and neuronal nitric oxide synthase in ATP-induced Ca^{2+} signalling in cochlear inner hair cells / H. Nakazawa, T. Yamashita // Eur.J. Neurosci. –2005. –V. 21. –P 2912–2922.

- 68.** Demidchik, V. Is ATP a signaling agent in plants? / V. Demidchik, C. Nichols, M. Oliynyk, A. Dark, B.J. Glover, J.M. Davies // *Plant Physiol.* –2003. –V. 133. –P. 456–461.
- 69.** Jeter, C.R. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in Arabidopsis / C.R. Jeter, W.Q. Tang, E. Henaff, T. Butterfield, S.J. Roux // *Plant Cell.* – 2004. –V. 16. –P. 2652–2664.
- 70.** Song, C.J. Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in Arabidopsis / C.J. Song, I. Steinebrunner, X.Z. Wang, S.C. Stout, S.J. Roux // *Plant Physiol.* –2006. –V.140. –P.1222–1232.
- 71.** Khakh, B.S. The double life of ATP / B.S. Khakh, G. Burnstock // *Sci Am.* –2009. –V.301, №6. –P.84–92.
- 72.** Jaffe, M.J. The role of ATP in mechanically stimulated rapid closure of the venus's flytrap // *Plant Physiol.* –1973. –V. 51. –P.17–18.
- 73.** Udvardy, J. ATP stimulates the formation of nucleases in excised Avena Leaves / J. Udvardy, G.L. Farkas // *Z. Pflanzenphysiol.* –1973. –V. 69. –P. 394–401.
- 74.** Lüttge, U. Can externally applied ATP supply energy to active ion uptake mechanisms of intact plant cells? / U. Lüttge, E.V. Schöch, E. Ball // *J Plant Physiol.* –1974. –V.1. –P. 211–220.
- 75.** Kim, S.Y. Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling / S.Y Kim, M. Sivaguru, G. Stacey // *Plant. Physiol.* –2006. –V. 142. –P. 984–992.
- 76.** Lew, R.R. Extracellular nucleotide effects on electrical properties of growing Arabidopsis thaliana root hairs/ R.R. Lew, J.D. Dearnaley // *Plant Sci.* – 2000. –V.153. –P.1–6.
- 77.** Reichler, S.A. Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide / S. A. Reichler, J. Torres, A.L. Rivera, V.A. Cintolesi, G. Clark, S.J. Roux // *J. Exp. Bot.* –2009. –V.60. –P. 2129–2138.

- 78.** Wolf, C. Developmental defects and seedling lethality in apyrase AtAPY1 and AtAPY2 double knockout mutants / C. Wolf, M. Hennig, D. Romanovicz, I. Steinebrunner // *Plant Mol. Biol.* –V.64. –P. 657–672.
- 79.** Chivasa, S. Extracellular ATP is a regulator of pathogen defence in plants / S. Chivasa, A.M. Murphy, J.M. Hamilton, K. Lindsey, J.P. Carr, A.R. Slabas // *Plant J.* –2009. –V.60. –P.436–448.
- 80.** Chivasa, S. Proteomic analysis of extracellular ATP-regulated proteins identifies ATP synthase beta-subunit as a novel plant cell death regulator / S. Chivasa, D.F. Tomé, J.M. Hamilton, A.R. Slabas // *Mol. Cell. Proteomics.* –2011. – V.10, №3. –P.1–13.
- 81.** Demidchik, V. Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca²⁺ channels / V. Demidchik, Z. Shang, R. Shin, E. Thompson, L. Rubio1, A. Laohavisit, J.C. Mortimer, S. Chivasa, A.R. Slabas, B. J. Glover, D. P.Schachtman, S.N. Shabala, J.M. Davies // *The Plant Journal* – 2009. –Vol. 58.– P.903–913.
- 82.** Wu, S.J. The signaling role of extracellular ATP and its dependence on Ca²⁺ flux in elicitation of *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures / S.J. Wu , Y.S. Liu, J.Y. Wu // *Plant Cell Physiol.* –2008. –V.49. –P.617–624.
- 83.** Virgilio, F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome / F. Virgilio // *Trends Pharmacol Sci.* –2007. –V.28, №.9. –P.465–472.
- 84.** Tanaka, K. Extracellular ATP signaling in plants / K.Tanaka, S.Gilroy, A. Jones, G. Stacey // *Trends in Cell Biology.* –2010. – V.20,№.10. – P.601–608.
- 85.** Weerasinghe, R. Touch induces ATP release in Arabidopsis roots that is modulated by the heterotrimeric G-protein complex / R. Weerasinghe, R. Swanson, S. Okada , M. Garrett, S.Y. Kim, G. Stacey, R. Boucher, S. Gilroy, A. Jones // *FEBS Letters.* –2009. –V. 583. –P. 2521–2526.

86. Chivasa, S. Proteomic analysis of the Arabidopsis thaliana cell wall. Electrophoresis 23/ S. Chivasa, B.K. Ndimba, W.J. Simon, D. Robertson, X.L. Yu // Electrophoresis. –2002. –V.23. –P. 1754–1765.

87. Ndimba, B.K. Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of Arabidopsis cell suspension cultures induced by fungal elicitors/ B.K. Ndimba, S. Chivasa, W.J. Simon, A.R. Slabas // Proteomics. –2003. –V. 3. –P. 1047–1059.

88. Кашина, О.А. Исследование влияния фосфоорганического соединения мелафена на рост и энергетические процессы клеток хлореллы : автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биолог. наук (03.00.12) /Кашина Ольга Александровна/ / Казанский государственный университет имени В.И. Ульянова-Ленина. Казань. –2007.– С.21.

89. Полевой В.В. Физиологическая роль ауксина и его действие на мембраны растительных клеток / Полевой В.В // Регуляторы роста и развития растений. –М.: Наука. –1982. –С.10.

90. Gottlieb, E. Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of Il-3-dependent hematopoietic cells following Il-3 withdrawal / E. Gottlieb, R. Haffner, T. Rüde, E.F. Wagner, M. Oren // EMBO J. –1994. –V.13. –P.1368–1374.

91. Scotto, C. Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth arrest and apoptosis/ C. Scotto, J.C. Deloulme, D. Rousseau, E. Chambaz, J. Baudier // Mol. Cell. Biol. –1998. –V.18,№ 7. –P.4272–4281.

92. Most, P. Distinct subcellular location of the Ca²⁺-binding protein S100A1 differentially modulates Ca²⁺-cycling in ventricular rat cardiomyocytes / P. Most, M. Boerries, C. Eicher, C. Schweda, M. Volkers, T. Wedel, S. Sollner, H. A. Katus, A. Remppis, U. Aebi, W.J Koch, C.A Schoenenberaer // J Cell Sci. – 2005. –V.118. –P. 421–431.

93. Пальцев, М.А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук / М.А. Пальцев // Вестник российской академии наук. – 2002. –Т. 72, № 1. –С. 13–21.

94. Mayer, B. Mitochondrial regulation of apoptosis / B. Mayer, R. Oberbauer // *News Physiol Sci.* – 2003. –V.18. –P.89–94.

95. Amundson, S.A. Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation / S.A. Amundson, R.A. Lee // *Mol. Cancer.* –2003. –V. 1, № 6. –P.445–452.

96. Nikiforov, M.A. p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis / M.A. Nikiforov, K. Hagen, V.S. Ossovskaya, T.M. F. Connor, S.W. Lowe, G.I. Deichman, A.V Gudkov // *Oncogene.* –V.13. –P. 1709–1719.

97. Shuler, M. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release/ M. Shuler, E. Bossy-Wetzel, J.C. Goldstein, P. Fitzgerald, D.R. Green // *J. Biol. Chem.* –2000. –Vol.275.–P.7337–7342.

98. Бра, М. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели / М. Бра, Б. Квинан, С. А. Сузин // *Биохимия.* – 2005. –Т. 70, №. 2. –С. 284–293.

99. Системная схема старения. Роль гена p53 в клеточном старении и апоптозе человека. – Электрон. текстовые дан. – Режим доступа: <http://sciencevsaging.org/content/свободный--11?page=2>.

100. Susan, E. In Vivo Mitochondrial p53 Translocation Triggers a Rapid First Wave of Cell Death in Response to DNA Damage That Can Precede p53 Target Gene Activation / S. Erster, M. Mihara, R.H. Kim, O. Petrenko, U.M. Moll // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. –V. 24, №. 15. –P.6728–6741.

101. Желтухин, А.О. Повседневные и индуцированные функции гена p53/ А.О. Желтухин, П.М. Чумаков// *Успехи биологической химии.* –2010. –Т.50. –С.447–516.

102. Yu, G.Q. Changes of p53 protein blood level in esophageal cancer patients and normal subjects from a high incidence area in Henan, China / G.Q. Yu, Q. Zhou, D. Ivan, S.S. Gao, Z.Y. Zheng, J.X. Zou, Y.X. Li, L.D. Wang // World J. Gastroenterol –1998. –V. 4, № 4. –P. 365–366;

103. Sobri, R.C. A study on p53 protein and anti-p53 antibodies in the sera of patients with oesophageal cancer / R.C. Sobti, K. Parashar // Mutat Res. –1998. –V. 422, №2. –P. 271–277.

104. Жижина, Г.П. Дефекты вторичной структуры ДНК при опухолевом росте и действии некоторых повреждающих факторов: автореф.дис. ...д-ра хим. наук / Жижина Галина Павловна. –М.–1983.

105. Жижина, Г.П. Изменение структурных характеристик ДНК под влиянием низкоинтенсивной гамма-радиации и фенозана в малых дозах / Г.П. Жижина, Т.М. Заварыкина, Е.М. Миль, Е.Б. Бурлакова // Радиационная биология. Радиоэкология. –2007. –Т.47, №4. – С.414–422.

106. М 47 Мелафен: механизм действия и области применения. Под ред. С.Г. Фаттахова, В.В. Кузнецова, Н.В. Загоскиной. — Казань: «Печать-Сервис XXI век», 2014. — 408с.

107. Жигачева, И.В. Состояние электрон-транспортной цепи митохондрий и физиологические показатели животных и растительных организмов при действии стрессовых факторов и биологически активных соединений: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Жигачева Ирина Валентиновна –М., –2012. – 54с.

108. Бинюков, В.И. Недостаточное увлажнение и мелафен изменяют морфологию митохондрий проростков гороха / В.И. Бинюков, Е.М. Миль, И.В. Жигачева, А.А. Албантова, И.П. Генерозова, А.Г. Шугаев, С.Г. Фаттахов, А.И. Коновалов // Доклады РАН. – 2012. –Т.446, № 2. – С.222–225.

109. Mil, E.M. Melaphen Prevents Mitochondrial Swelling Caused by Stress / E.M. Mil, V.I. Binyukov I.V. Zigacheva, A.A. Albantova, S.G. Fattahov,

A.I. Konovalov // Chemistry and Chemical Biology: Methodologies and Applications. –2014. –V. 8. –P.87–97.

110. Mil, E.M. Melaphen Prevents Mitochondrial Swelling Caused by Stress / E.M. Mil, V.I. Binyukov, I.V. Zigacheva, A.A. Albantova, S.G. Fattahov, A.I. Konovalov // Journal of Nature Science and Sustainable Technology. – 2014. –V.8, №3. –P. 451–459.

111. Binyukov, V.I. Effect of melaphen on a mitochondria of sprouts of peas under stressful influences by AFM method / V.I. Binyukov, E.M. Mil, I.V. Zhigacheva, A.A. Albantova, I.P. Generozova, A.G. Shugaev // Quantitative Chemistry, Biochemistry and Biology. Steps Ahead" Modern Problems in Biochemical Physics: New Horizons, Nova Science Publishers, New York. –2013. –V.18. –P. 195–204.

112. Binyukov, V.I. Effect of Melaphen on a Mitochondria of Sprouts of Peas under Stressful Influences by the AFM Method / V.I. Binyukov, E.M. Mil, I.V. Zhigacheva, A.A. Albantova, I.P. Generozova . A.G. Shugaev // Chemistry Research Summaries. – Ed.: Lucille Monaco Cacioppo. – 2014. –V.15, Ch. 99.–P. 199–200.

113. Миль, Е.М. Изучение влияния мелафена на митохондрии проростков гороха при стрессовых воздействиях методом АСМ / Е.М. Миль, В.И. Бинюков, И.В. Жигачева, А.А. Албантова, С. Г. Фаттахов, А. И. Коновалов, Г.Е. Заиков // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т.3.– С. 141–145.

114. Албантова, А.А. Сравнительное изучение препаратов фенозанового ряда на эритроциты *in vivo* методом АСМ / А.А. Албантова, В.И. Бинюков, Е.М. Миль, О.М. Алексеева, Е.Б. Бурлакова, А.Н. Голощاپов // Труды 54-й научной конференции МФТИ. ”Проблемы фундаментальных и прикладных естественных и технических наук в современном информационном обществе “. – М: МФТИ, 2011. – С.196– 200.

115. Albantova, A.A. Investigation of the influence of phenosan, ichphan-10 on erythrocytes in vivo by AFM method / A.A. Albantova, V.I. Binyukov, O.M. Alekseeva, E.M. Mil // *Modern Problems in Biochemical Physics: – New Horizons*, Nova. Science Publishers. – 2012, № 5. – P.45–48.

116. Бинюков, В. И. Изучение влияния фенозана, Ихфан-10 и мелафена на эритроциты in vivo методом атомно-силовой микроскопии / Бинюков В. И, Алексеева О. М, Миль Е. М, Албантова А.А, Фаттахов С.Г, Голощапов А. Н, Бурлакова Е. Б, Коновалов А. И // *Доклады РАН*. – 2011. – Т.441, № 1. – С. 114–117.

117. Zaitsev, B. N. Atomic Force Microscopy of the Interaction of Erythrocyte Membrane and Virus Particles / B.N. Zaitsev, A.G. Durymanov, V.M. Generalov // *Proc. Intern. Workshop "Scanning Probe Microscopy – 2002"*. Nizhny Novgorod – 2002. – P. 211–213.

118. Нагорнов, Ю.С. Оптимизация формы эритроцита в соответствии с данными атомно-силовой микроскопии [электронный ресурс] / Ю.С. Нагорнов, И.В. Жиляев. // *Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал*. – Т. 12, № 1. – 2013. – URL: <http://www.smolensk.ru/user/sgma/mmorph/titl.htm>

119. Панюшева, Е.С. Исследование структурно-функционального состояния эритроцитов методом атомно-силовой спектроскопии [электронный ресурс] / Е.С. Панюшева, А.М. Бодрягина, М.В. Солина, И.А. Иванова, О.В. Столбовская // URL: [www.scienceforum.ru /2013 /pdf/3697. pdf](http://www.scienceforum.ru/2013/pdf/3697.pdf).

120. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. –М: Наука, 1981. – 288с.

121. Бурлакова, Е.Б. Влияние низкоинтенсивного облучения в малых дозах на возникновение и развитие спонтанного лейкоза у мышей линии AKR / Е.Б. Бурлакова, В.Н. Ерохин. // *Радиац. биология. Радиоэкология*. – 2001. – Т. 41, № 4. – С. 385–388.

122. Миль, Е.М. Сверхмалые дозы фенозана К вызывают активацию белков p53 и Bcl-2 у мышей F1(СВА×С₅₇В1) и АКР / Е.М. Миль, А.А. Албантова, Е.Б. Бурлакова // Тезисы IV Международный симпозиум «Механизмы действия сверхмалых доз» Москва, –2008.

123. Миль, Е.М. Изменение содержания белка p53, L-цепей иммуноглобулинов и комплексов железа при облучении малыми дозами мышей лейкозной линии АКР / Е.М. Миль, В.В. Каспаров, О.А. Борисова //Биофизика. –2001. –Т. 46, № 2. –С. 346–352.

124. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J. M. Gutteridge // Oxford: Clarendon Press. –1989. –215p.

125. Simons, K. Functional rafts in cell membranes / K. Simons, E. Ikonen // Nature. –1997. –V. 387.– P.569–572.

126. Alekseeva, O.M. The fluctuation of animal cellular volume under the melafen-plant growth regulator / O.M. Alekseeva, E.A. Yagolnik, Yu.A. Kim // Biological Motility: Fundamental and Applied Science. – Pushchino: Foton-Vek – 2012. – P. 9–13.

127. Zachée, P. Imaging red blood cells with the atomic force microscope // P. Zachée, J. Snauwaert, P. Vandenberghe, L. Hellemans, M. Boogaerts // British Journal of Haematology. –1996. –V.95. – P.472–481.

128. Скоркина, М.Ю. Сравнительная оценка морфофункциональных характеристик нативных и фиксированных эритроцитов / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, С.Д. Чернявских, И.А. Забинянов, Е.А. Сладкова // Цитология. –2011. –Т.53, №1. –С.17–20.

129. Сабанова, Р.К. Сезонные изменения гематологических показателей у грызунов, отражающие их адаптационные возможности // Сельскохозяйственная биология. –2008, № 4. –С. 117–119.

130. Атауллаханов, Ф.И. Как регулируется объем эритроцита, или что могут или не могут математические модели в биологии / Ф.И

Атауллаханов, Н.О Корунова, И.С Спиридонов // Биологические мембраны. – 2009. –Т. 26, №3. –С. 163–179.

131. Канкожа, М.К. Эритроцитарный транспорт глюкозы при экспериментальной гипоксии // По мат. межд. науч.-практ. конф “Фундаментальные медико-биологические науки и практическое здравоохранение” [электронный ресурс] 2010г.
http://www.rusnauka.com/12_ENXXI_2010/Medecine/64619.doc.htm

132. Слобожанина, Е.И. Исследование Zn-индуцированных изменений в эритроцитарных мембранах методом атомно-силовой микроскопии / Е.И. Слобожанина, Н.М. Козлова, В.М. Ясинский, Д.С. Филимоненко, А.Я. Хайруллина // Сборник докладов VII Международного семинара «Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии». Минск, – 2006. – С.158–161.

133. Алексеева О.М. Действие регулятора роста растений мелафена на мембраны клеток животных / О.М. Алексеева , Л.Д. Фаткуллина, Ю.А. Ким // ДАН. –2008. – Т. 422, № 3. – С. 402–404.

134. Фаттахов, С.Г. Влияние мелафена на рост и энергетические процессы растительной клетки / С.Г. Фаттахов, Н.Л. Лосева, А.И. Коновалов // ДАН. – 2004. – Т. 394, № 1. – С. 127– 129.

135. Трубачева, О.А. Влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов / О.А. Трубачева, Е.В. Шахристова, А.И. Галич, И.В. Петрова // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2011, № 5. – С.69– 71.

136. Arya, R. Hereditary red cell enzymopathies / R. Arya, D.M. Layton, A.J. Bellingham // Blood Reviews. –1995. –V.9. –P.165–175.

137. Орлов, С.Н. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала / С.Н. Орлов, И.В. Петрова, Н.И. Покудин, А.А.

Кубатиев, М.Б. Баскаков, М.А. Медведев // Биологические мембраны. –1992. –Т. 9. – С. 885–903.

138. Новицкий, В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степова // – Томск: Изд-во Томского ун-та, 2004. –202 с.

139. Миль, Е.М. Сравнение концентрации p53 в сыворотке крови у пациентов с выраженным раком молочной железы до и после химиотерапии // Е.М. Миль, Д.Б. Корман, О.В. Мышлякова, С.Г. Микаэлян // Вопр. онкологии. –2006. –Т. 52, № 2. –С.159–162.

140. Миль, Е.М. Содержания белка p53 и иммуноглобулинов в крови после комбинированной химиотерапии больных раком молочной железы в зависимости от возраста // Е.М. Миль, О.В. Мышлякова, С.Г. Микаэлян //Клин. геронтология. –2005. –Т. 11, № 3. –С. 15–20.

141. Тюреева, И.И. Опухолевые антигены // Цитология. –2008. –Т.50, №3. – С.189–204.

142. Албантова, А.А. Биоорганическая химия. Влияние мелафена на содержание белков p53 и Vcl-2 в клетках асцитной карциномы Эрлиха / А.А. Албантова, Е.М. Миль, В.И. Бинюков, О.М. Алексеева, С.Г. Фаттахов, А.И. Коновалов, Е.Б. Бурлакова // В сб. Межд. Научн. конф. по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии. Пущино. – 2009. – С.113–114.

143. Пальмина, Н.П. Дозовые зависимости изменения микровязкости липидов биологических мембран, индуцированные синтетическим антиоксидантом фенозаном калия / Н.П. Пальмина, Т.Е. Часовская, В.В. Белов, Е.Л. Мальцева // Доклады РАН. – 2012. – Т.443, №4. – С. 511–515.

144. Fleck, S.L The chemotherapy of rodent malaria. LIV. Combinations of 'Fenozan B07' (Fenozan-50F), a difluorinated 3,3'-spirocyclopentane 1,2,4-trioxane, with other drugs against drug-sensitive and drug-resistant parasites / S.L. Fleck, D.L. Robinson, W. Peters // Ann. Trop.Med. Parasitol. –1997. –V. 91, № 1. –P. 33–39.

145. Petrykina, Z.M. Antimicrobial and membranolytic activities of anti-burn drug fenozan / Z.M. Petrykina, A.N Polin, L.G. Plekhanova, V.V. Ershov, I.V. Petrov // *Antibiot Khimioter.* –1992. –V. 37, № 3. –P. 15–17.

146. Шишкина, Л.Н. Противолучевые свойства феноксана при низкоинтенсивном γ -облучении в малой дозе / Л.Н. Шишкина, О.Ф. Беспалько, Е.В. Кушнирева, Л.И. Мазалецкая, Н.В. Полякова / *Радиационная биология. Радиоэкология.* –1999. –Т. 39, № 2–3. –С. 322–328.

147. Бурлакова, Е.Б. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно- индуцируемой нестабильности генома / Е.Б. Бурлакова, В.К. Мазурик, В.Ф. Михайлов // *Радиационная биология. Радиоэкология.* –2001. –Т. 41, № 5. –С. 489–499.

148. Бурлакова, Е. Б. Влияние малоинтенсивного облучения на возникновение и развитие злокачественных новообразований / Е.Б. Бурлакова, В.Н. Ерохин, В.А. Семенов // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2006. –Т. 46, № 5. –С. 527–530.

149. Гуценко, К.К. Радиационное поражение системы гемопоэза у мышей носителей вируса лейкоза / К.К. Гуценко, Н.П. Бородина, Т.Д. Кузьмина // *Радиационная биология. Радиоэкология.* –1998. –Т.38, № 3(1) – С.400–404.

150. Ройт, А. Иммунология / Ройт А, Бростофф Дж, Мейл Д. М // *Мир.* –2000. – С.581.

151. Albantova, A.A. Influence of Ichfan-10 and Phenozan on the content of two apoptotic proteins in the blood and the spleen of mice: on the regulator of apoptosis p53 and the antiapoptotic protein Bcl-2 / A.A. Albantova, I. Gößner, E.M. Mil, V.I. Binjukov, O.M. Aleksejeva, E.B. Burlakova // *Modern Problems in Biochemical Physics.* Nova Science Publishers. New York. – 2012. – V.1. – P.1–10.

152. Миль, Е.М. Влияние антиоксиданта фенозана и облучения в малой дозе на содержание белков p53 и BCL-2 у мышей разных линий / Е.М.

Миль, А.А. Албантова, Е.Б. Бурлакова // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2010. – Т.50, № 1. – С. 58–64.

153. Миль, Е.М. Изучение влияния стрессовых воздействий и регулятора роста растений мелафена на митохондрии проростков гороха методом АСМ / Е. М. Миль, В. И. Бинюков, И. В. Жигачева, А. А. Албантова, С. Г. Фаттахов, А. И. Коновалов // Энциклопедия Инженера-Химика. – 2013. – №12. – С. 47–51.

154. Лосева, Н.Л. Обнаружение эффекта стимуляции роста и активизации ряда физиологических процессов у *Chlorella vulgaris* Beijer и некоторых сельскохозяйственных культур при действии препарата «Мелафен» / Н.Л. Лосева, А.Ю. Алябьев, О.А. Кашина // – Казань: «Печать-Сервис XXI век», – 2014. – 408с.

155. Албантова, А.А. Влияние биологически активных веществ фенозана, ИХФАН-10 и мелафена на морфологию эритроцитов и содержание белков апоптозного ряда в клетках, сыворотке крови и селезенке мышей / А.А. Албантова, О.М. Алексеева, Е.М. Миль, В.И. Бинюков, Е.Б. Бурлакова // Физиология и медицина. Исследования, образование, высокие технологии: сборник статей международной научно-практической конференции “Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине”. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та. – 2010. – С.17–23.

156. Kumar, N. Concentration Dependent Effect of (–) Epicatechin on Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase Inhibition Induced by Free Radicals in Hypertensive Patients: Comparison with L-ascorbic Acid / N. Kumar, R. Kant, P.K. Maurya, S.I. Rizvi // Phytotherapy Research. –2012. –V.26, №11–P. 1644–1647.