

**АЛБАНТОВА АНАСТАСИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

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

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва – 2015**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук  
**Миль Елена Михайловна**,  
ведущий научный сотрудник лаборатории  
физико-химических основ регуляции  
биологических систем Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
науки Института биохимической физики им.  
Н.М. Эмануэля Российской академии наук

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук  
**Веселова Татьяна Владимировна**,  
ведущий научный сотрудник кафедры  
биофизики Биологического факультета МГУ  
имени М.В. Ломоносова

кандидат биологических наук  
**Нешев Николай Ильич**, старший научный  
сотрудник лаборатории кинетического  
моделирования Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
науки Института проблем химической  
физики Российской академии наук

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки, Центр теоретических  
проблем физико - химической фармакологии  
Российской академии наук  
(ЦТПФХФ РАН)

Защита состоится « 17 » июня 2015 г. в 12:00 на заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д.4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н.Семенова РАН по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, дом 38 и на сайте: <http://ibcp.chph.ras.ru/2014/>

Автореферат разослан « \_\_\_ » апреля 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 002.039.01,  
кандидат химических наук

Л.И. Мазалецкая

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы.

Биологически активные соединения находят применение во многих областях медицины, биологии и сельском хозяйстве (с/х). Создание таких синтетических соединений и выяснение их биологических свойств открывают новые возможности 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 [1,2]. Синтетические АО и биологически активные соединения, применяются в с/х для стимулирования роста растений, защите от неблагоприятных факторов внешней среды, однако при попадании по пищевой цепочке, и при длительном воздействии, они могут оказывать влияние на организм животных и человека, поэтому представляется важным провести изучение действия АО как на растительные, так и на животные клетки и субклеточные структуры.

Биологически активные вещества (БАВ) при введении в организм могут претерпевать различные метаболические изменения, и их концентрация в месте воздействия на определенные мишени изменяется. В связи с этим представляется крайне важным более детальное исследование воздействия АО, являющихся БАВ, *in vitro* и *in vivo* в широком интервале концентраций на различные клеточные структуры, в том числе эритроциты, которые могут транспортировать их 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 было необходимо 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 АО (мелафена, фенозана К и ИХФАН-10) были зарегистрированы в экспериментах с данными веществами при воздействии на различные биологические системы, в том числе на макромолекулы, структурные свойства мембран разного уровня организации, белок ВСА, митохондрии, эритроциты, клетки асцитной

карциномы Эрлиха (АКЭ), протеинкиназу С, а также на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию клеток [3-11].

Мишенями действия БАВ могут выступать плазматические мембраны клеток, мембраны митохондрий [10], эритроциты и другие структуры [13]. Одним из прямых методов регистрации морфологических изменений биологических объектов 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.

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

**Целью** работы являлось выяснение действия синтетических АО из класса пространственно затрудненных фенолов и регулятора роста растений мелафена 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 (эритроцитах) при действии антиоксидантов фенозана К, ИХФАН-10 и мелафена с помощью метода АСМ.

2. Изучить защитное действие мелафена при низких концентрациях ( $2 \times 10^{-12}$  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 разработаны новые методические подходы, в использовании АСМ метода для морфоструктурного анализа растительных (митохондрии) и животных (эритроциты) объектов в норме и при воздействии биологически активных соединений.

Впервые получены двумерные и трехмерные АСМ-имиджи препаратов растительных митохондрий в состоянии физиологической нормы, при набухании в результате стрессового воздействия, а также при протекторном эффекте мелафена.

На основе количественного анализа АСМ имиджей было обнаружено изменение геометрических параметров эритроцитов (объема, площади и средней высоты) 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 *in vitro* и *in vivo*.

Методом иммуноферментного анализа впервые обнаружено влияние малых доз фенозана калия и мелафена на экспрессию белков p53 и Bcl-2 - ключевых регуляторных элементов сигнальных путей апоптоза клетки.

### **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.

На основании полученных результатов предложена методика приготовления воздушно-сухих препаратов эритроцитов на кремниевой подложке для АСМ исследований.

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.

Важным 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 может быть использован для выявления структурно-морфологических изменений 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 может 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, 2008гг.). 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; конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (2010, 2011, 2012 гг), "МИР БИОТЕХНОЛОГИИ"; 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 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 в подготовке и проведении экспериментов.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, 4 глав, основных выводов и списка литературы. Работа изложена на 128 страницах, иллюстрирована 46 рисунками и 1 таблицей. Библиография включает список из 156 работ.

### **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Во введении** охарактеризована тема работы, обоснована ее актуальность, определены цели и задачи исследований, положения выносимые на защиту, научная новизна работы и ее научно-прикладное значение.

**Глава 1** содержит анализ литературы, посвященный основным направлениям в области изучения антиоксидантов и используемым в работе методам исследования.

**Глава 2** посвящена **материалам и методам исследования**. В качестве объектов исследования использовали митохондрии, выделенные из 5-дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum L.*), сорт Флора-2. Семена гороха были выращены в

трех условиях опыта – в контроле при 22<sup>0</sup>С; в условиях 2х дневного недостаточного увлажнения и умеренного охлаждения с последующим доращиванием при 22<sup>0</sup>С (НУ+14<sup>0</sup>); и при стрессовом воздействии (НУ+14<sup>0</sup>) с предварительной обработкой семян мелафеном, в течение 1 часа (МФ+НУ+14<sup>0</sup>).

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).

Изменение морфологии эритроцитов изучали на изолированных эритроцитах в системе *in vitro*, а также в системе *in vivo*, где препараты вводили прижизненно внутривентриально мышам за 12 часов до взятия крови и последующего выделения эритроцитов. Для приготовления воздушно сухих образцов эритроциты выделяли в среде, содержащей: 0,15М NaCl, 10 мМ глюкозы, фосфатный буфер рН 7,4; затем фиксировали 2% глутаровым альдегидом 30 мин., и трехкратно отмывали дистиллированной водой (в случае исследования митохондрий фиксация проходила 5 мин). АСМ образцы готовили путем высушивания суспензии эритроцитов на кремниевой подложке. Исследование методом АСМ проводили на приборе SOLVER P47 SMENA на частоте 150кГц в полуконтактном режиме, использовался кантилевер NSG11 с радиусом кривизны 10нм. Анализ и статистическая обработка данных осуществлялась методами параметрической и непараметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Image Analysis 1.2.1 и Statistica 6.

В **Главе 3** диссертации рассмотрено:

***Влияние стрессового воздействия и мелафена на морфологию митохондрии проростков гороха.***

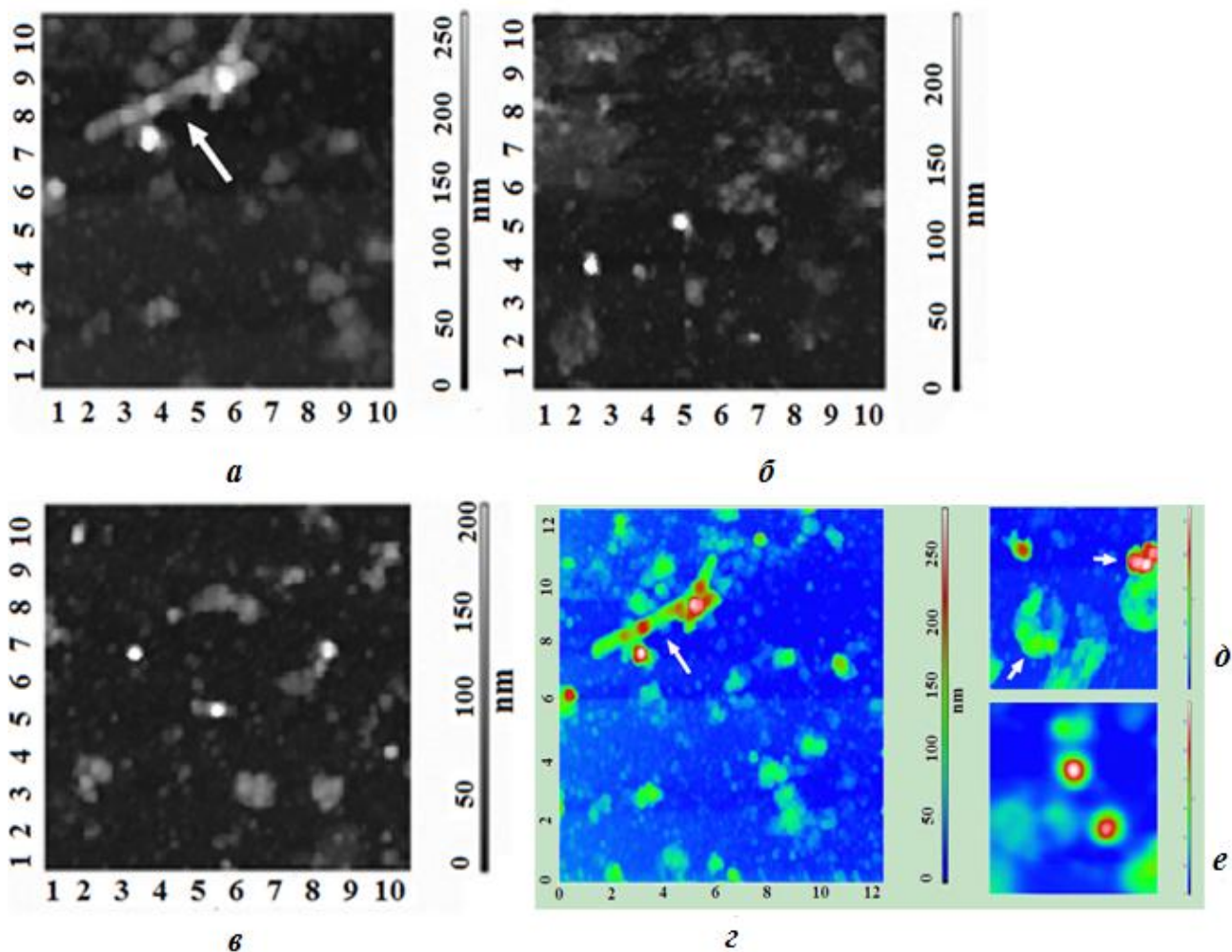
В третьей главе было рассмотрено воздействие стимулятора роста растений мелафена, предложенного для с/х применения, и проведены эксперименты по предварительной обработке семян гороха препаратом мелафен в концентрации  $2 \times 10^{-12}$  М и дальнейшему выращиванию растений в условиях холод-засуха (НУ+14<sup>0</sup>С), моделирующих сочетание неблагоприятных факторов в весенний период (МФ+НУ+14<sup>0</sup>С).

Поскольку митохондрии являются ключевыми звеньями в энергетических, окислительно-восстановительных и метаболических процессах в клетке, в работе методом АСМ были изучены АСМ имиджи митохондрий 5-ти дневных проростков гороха при различных условиях опыта.

В работе было обнаружено, что в контроле, на двумерных АСМ изображениях, наблюдались как отдельные, так и делящиеся митохондрии (Рисунок 1 а, г). Воздействие (НУ+14<sup>0</sup>С) приводило к существенному изменению АСМ имиджей

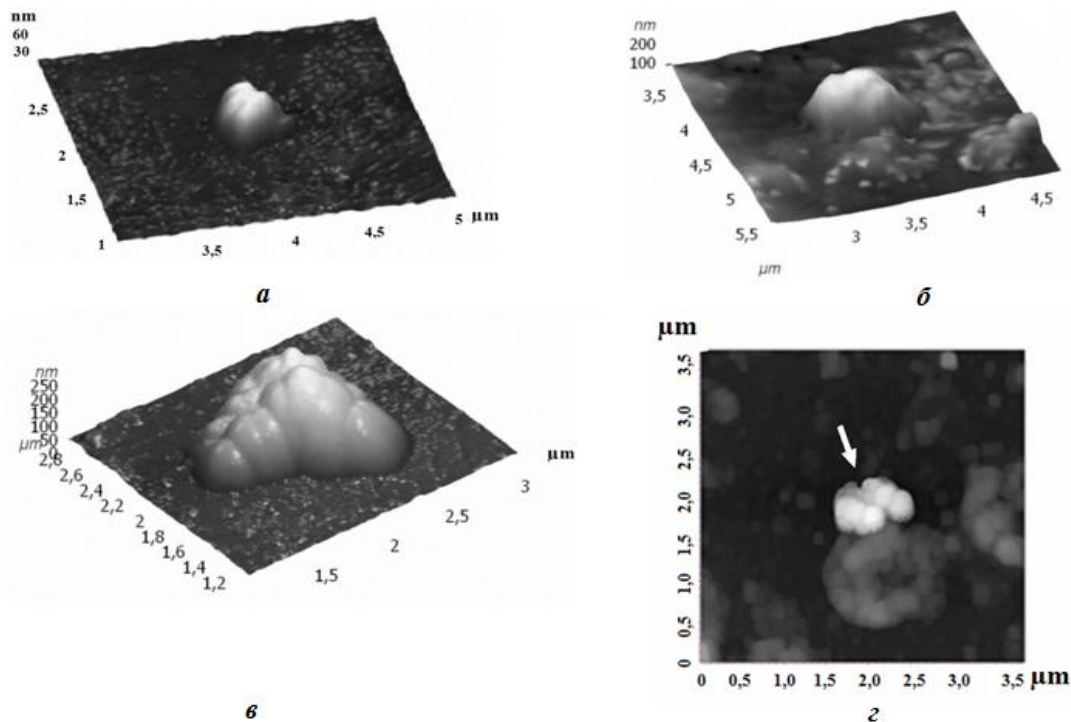


митохондрий 5-ти дневных проростков гороха, часть митохондрий увеличивалась в размерах (Рисунок 1 в, е) и на АСМ изображении присутствовали набухшие митохондрии (Рисунок 2 в), а деление митохондрий не наблюдалось.



**Рисунок 1.** Двумерное АСМ изображение митохондрий из 5-ти дневных проростков гороха в контроле – (а, г), в группе (МФ+НУ+14<sup>0</sup>С) – (б, д), в группе (НУ+14<sup>0</sup>С) – (в, е) (делящиеся митохондрии указаны стрелками) в различных областях сканирования.

Далее было установлено, что при предварительной обработке семян гороха раствором мелафена в низкой концентрации  $2 \times 10^{-12}$  М и последующем воздействии холод-засуха (МФ+ НУ+14<sup>0</sup>С) размеры (объем, площадь) митохондрий 5-ти дневных проростков гороха оставались близкими к контрольным и, кроме того, деление митохондрий возобновлялось (Рисунок 1 д, Рисунок 2 г, Таблица 1).



**Рисунок 2.** АСМ изображение в области сканирования  $2 \times 2 \text{ мкм}^2$  и  $3,5 \times 3,5 \text{ мкм}^2$  (x (мкм), y (мкм), z (нм)), одиночной митохондрии, выделенной из проростков гороха контрольной группы – (а), из группы (НУ+14<sup>0</sup>С) – (б, в) и при воздействии (МФ+НУ+14<sup>0</sup>С) – (г).

**Таблица 1.** Влияние совместного действия дефицита влаги, умеренного охлаждения и мелафена ( $2 \times 10^{-12}$  М) на среднее значение объема АСМ имиджа митохондрий проростков гороха. Примечание. V<sub>ср.</sub> - среднее значение объема, +95% - верхняя и -95% - нижняя граница доверительного интервала для среднего значения.

Варианты опыта	V <sub>ср.</sub> (мкм) <sup>2</sup> × нм	+95% (мкм) <sup>2</sup> × нм	-95% (мкм) <sup>2</sup> × нм
контроль	81,0	92,1	69,9
МФ+ (НУ+14 <sup>0</sup> С)	86,4	94,5	78,4
(НУ+14 <sup>0</sup> С)	115,1	127,2	103,0

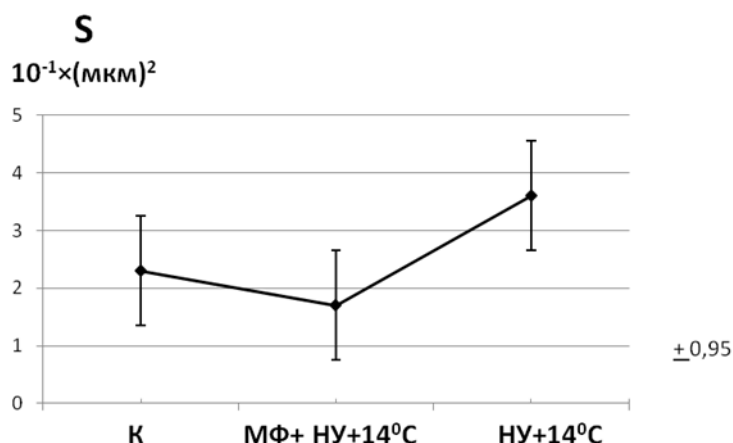
С помощью проведенного в работе статистического анализа трехмерных АСМ изображений митохондрий, выделенных из 5-ти дневных проростков гороха при разных условиях выращивания было показано (Таблица 1), что средний объем АСМ имиджей митохондрий в контроле составил 81,0 (мкм)<sup>2</sup>×нм, воздействие умеренного охлаждения и недостаточного увлажнения приводило к увеличению объема до 115,1 (мкм)<sup>2</sup>×нм, а предварительное замачивание семян в  $2 \times 10^{-12}$  М растворе мелафена и дальнейшее воздействие (НУ+14<sup>0</sup>С) предотвращало изменения морфологии

митохондрий и размеры митохондрий (объем и площадь) приближались к контрольным ( $V_{cp}=86 \text{ (мкм)}^2 \times \text{нм}$ ) (Рисунок 3).

Как было показано ранее, снижение температуры окружающей среды приводит к изменению липидного состава мембран митохондрий, а также к изменению количества и степени насыщенности свободных жирных кислот, при действии стресс фактора. Увеличение количества свободных жирных кислот (СЖК) изменяет редокс-состояние внутренней мембраны митохондрий, что приводит к экспрессии генов первичного ответа (стресс генов) [2]. Недостаточное увлажнение, солевой стресс и тепловой шок являются также причиной смещения антиоксидантно-прооксидантного равновесия и увеличения уровня активных форм (АФК) в клетке. В работе мы проанализировали, происходит ли увеличение генерации АФК, наряду с обнаруженным нами набуханием митохондрий в условиях холод-засуха, и приводит ли обработка семян мелафеном к снижению уровня АФК.

Проведенные в работе эксперименты показали, что в условиях сочетанного действия охлаждения и недостаточного увлажнения, происходит активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах митохондрий, при этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ возрастала в 3 и 2,5- раза по отношению к контролю. Замачивание семян в  $2 \times 10^{-12} \text{ М}$  растворе мелафена приводило к снижению содержания продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ снижалась почти до контрольного уровня. Можно предположить, что защитное действие мелафена на метаболизм митохондрий в низкой дозе может быть обусловлено, в том числе, его антиоксидантными свойствами [14]. Снижение интенсивности процессов свободно-радикального окисления, возможно, находило отражение в предотвращении активации ПОЛ и сохранении морфологии митохондрий.

Существует также мнение [15], что мелафен в малых концентрациях, действует подобно АТФ и некоторым регуляторам роста растений, вызывая активацию ряда сигнальных систем. Полученные впервые методом АСМ экспериментальные данные



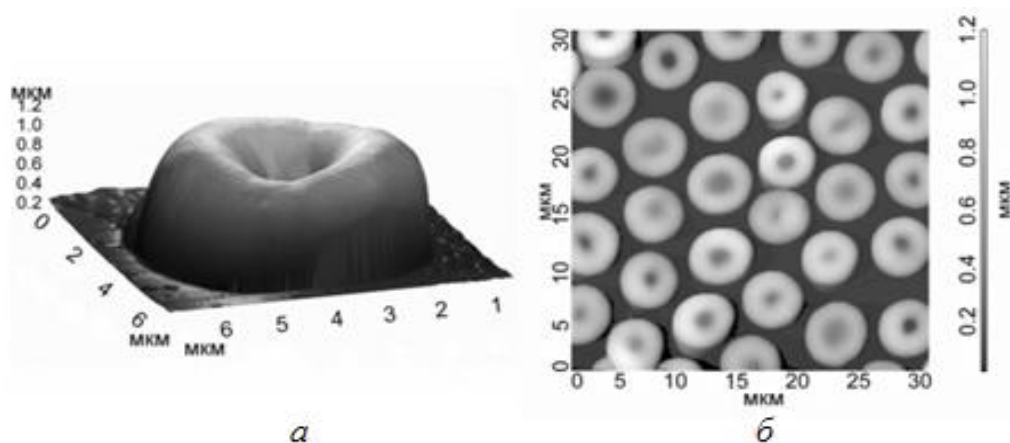
**Рисунок 3.** Изменение площади АСМ имиджа митохондрий проростков гороха в контроле (К), под влиянием совместного воздействия дефицита влаги, и умеренного охлаждения (НУ+14°C) и мелафена ( $2 \times 10^{-12} \text{ М}$ ) (МФ+НУ+14°C).

показывают, что защитное биологическое действие мелафена при обработке семян гороха осуществляется в очень низких концентрациях ( $2 \times 10^{-12}$  М), что не исключает также механизм его защитного действия, близкий к действию фитогормонов.

Следует отметить, что при обработке семян растений мелафеном, в дальнейшем он по пищевой цепочке может попадать в организм животных и человека и оказывать воздействие на структуры и органеллы не только растительных, но и животных клеток. Одной из удобных биологических моделей, которая позволяет проследить за изменением морфологии клетки под влиянием ряда БАВ могут являться эритроциты, основная функция которых состоит в переносе кислорода к тканям и клеткам. Кроме того, эритроциты выполняют транспортные функции, сорбируя на своей поверхности как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные соединения.

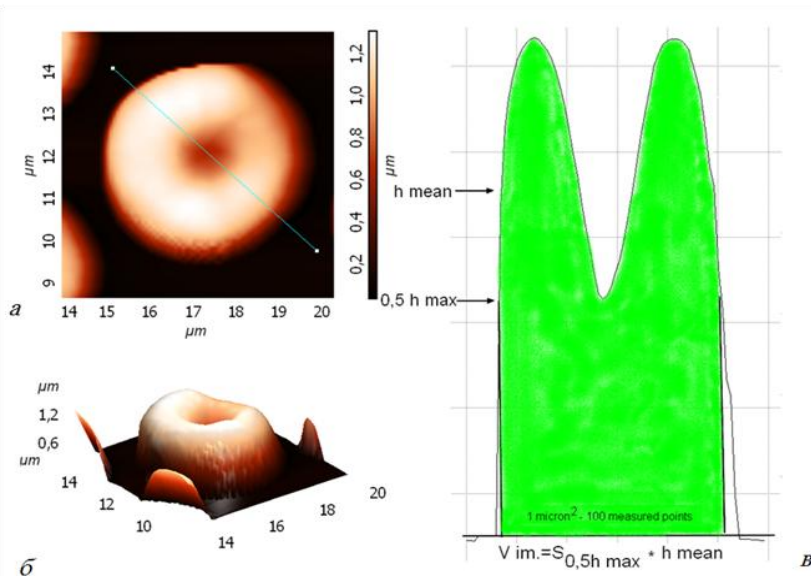
#### ***Применение метода АСМ для обнаружения изменений функционального состояния эритроцитов.***

В проведенных нами исследованиях методом АСМ были изучены непосредственно трехмерные имиджи эритроцитов при различных воздействиях, определены изменения размерных параметров (V, S, Z) отдельного эритроцита и проведена статистическая обработка этих результатов.



**Рисунок 4.** Трехмерное АСМ изображение одиночного эритроцита на кремниевой подложке, фиксированного глутаровым альдегидом – (а) и двумерный участок ( $30 \times 30$  мкм<sup>2</sup>) АСМ имиджей эритроцитов – (б).

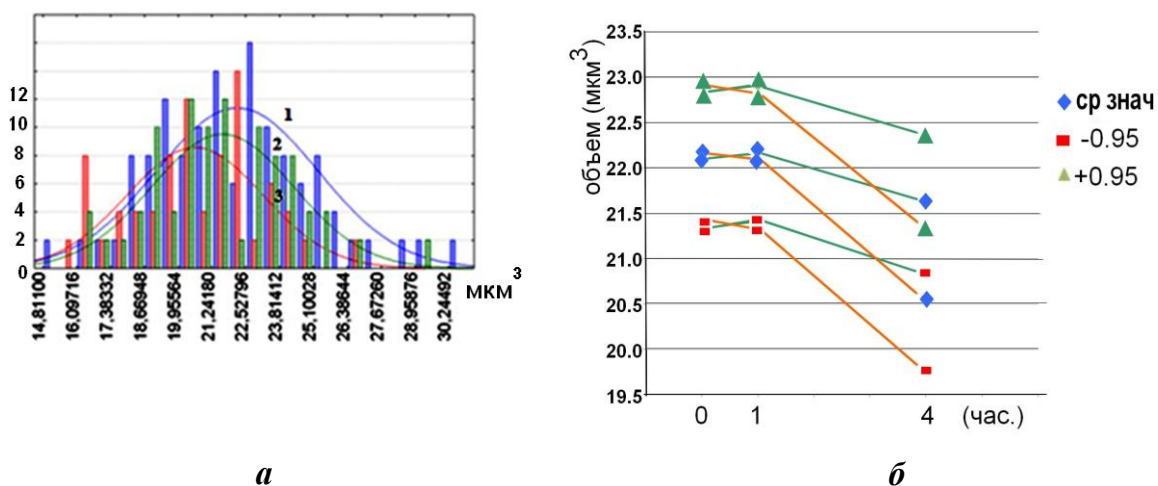
Обнаружено, что в условиях проведения экспериментов при воздушно-сухой фиксации на кремниевой подложке, АСМ изображения отдельных эритроцитов мыши, преимущественно, как и в крови, имели форму дискоцитов (Рисунок 4 а). Были проанализированы АСМ имиджи эритроцитов на различных участках сканирования, в том числе на участке  $30 \times 30$  мкм<sup>2</sup> (Рисунок 4 б). Схема на Рисунке 5 (в) демонстрирует ряд параметров имиджа эритроцитов.



**Рисунок 5.** АСМ имидж эритроцита в D2 (двухмерном) – (а), и D3 (трехмерном) – (б) измерении и схема демонстрирующая ряд параметров имиджа эритроцита – (в): площадь эритроцита на середине высоты ( $S_{0,5h \max}$ ), средняя высота ( $h_{\text{mean}}=Z$ ) и объем ( $V = S_{0,5h \max} \times Z$ ).

Возможность использования метода АСМ при изменении функционального состояния эритроцитов была продемонстрирована на примере гликолитического голодания эритроцитов в системе *in vitro*. При проведении эксперимента эритроциты инкубировали в течение 1-4 часов при комнатной температуре в стандартном фосфатно-солевом буфере в присутствии и отсутствии 10мМ глюкозы.

Известно, что ионно-транспортная система эритроцитов, поддерживающая объем эритроцита, регулируется в том числе АТФ зависимыми  $\text{Ca}^{2+}$ - и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - АТФазами, а при снижении уровня глюкозы (основной источник АТФ в эритроцитах) в инкубационной среде происходит снижение содержания АТФ, что может приводить к структурным изменениям эритроцитов. Статистическая обработка АСМ имиджей позволила построить гистограммы и графики распределения объема (распределение объема эритроцитов было близко к нормальному как в присутствии глюкозы, так и без нее), и определить среднее значение объема ( $V_{\text{cp}}$ ) (Рисунок 6).



**Рисунок 6.** Гистограмма распределения объема ( $V_{\text{cp}}$ ) АСМ имиджа эритроцитов и аппроксимация нормальным распределением через 4 часа инкубации – (а): в контроле (1 - синий), в присутствии глюкозы (2 - зеленый) и без глюкозы (3 -

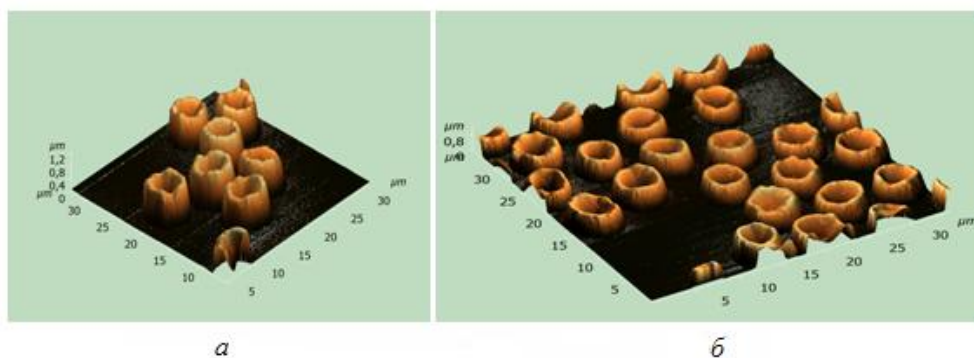
красный); и изменение объема ( $V_{cp}$ ) в зависимости от времени воздействия (показан 95% доверительный интервал) – (б).

Аналогичные данные были получены и для других параметров (средней высоты ( $h_{mean} = Z$ ) и площади эритроцита ( $S_{0,5h\ max}$ )).

Полученные данные позволили установить, что через 4 часа инкубации эритроцитов без глюкозы наблюдалось достоверное снижение размера эритроцитов ( $(V_{cp}), (Z_{cp})$ ), в то время как в течение первого часа отклонения от контроля обнаружено не было. Однако, при инкубации в течение 4 часов с глюкозой, изменение размеров эритроцитов оставалось в пределах ошибки эксперимента. Учитывая эти данные все последующие эксперименты с эритроцитами проводили в присутствии 10мМ глюкозы.

### ***Изменение морфологии эритроцитов под действием мелафена.***

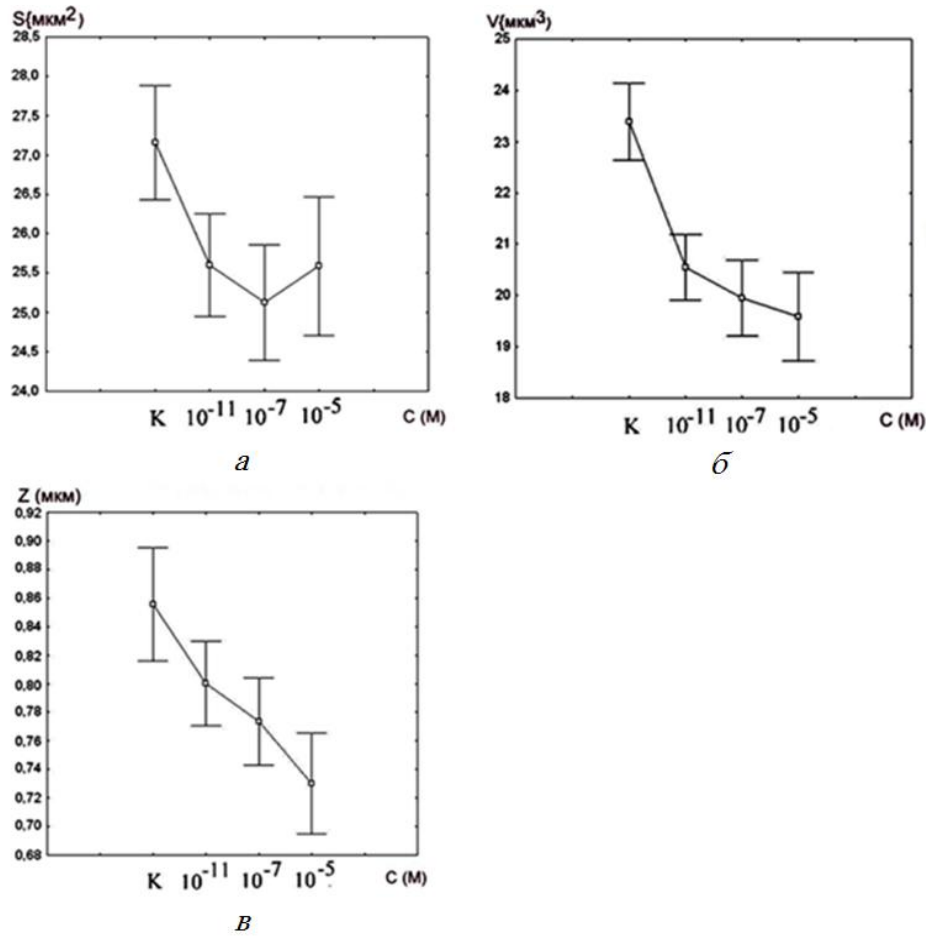
Аналогичный подход и статистическая обработка были применены в экспериментах по изучению действия мелафена в конечной концентрации ( $10^{-11} - 10^{-5}M$ ) на морфологию эритроцитов мышей. При статистической обработке АСМ имиджей выборка составляла около 100 дискоцитов, полученных в результате нескольких сканирований, по ней вычислялась средняя величина изучаемых параметров. Анализ АСМ имиджей эритроцитов показал, что в контрольных образцах присутствовали в основном дискоциты (Рисунок 7), в то же время наблюдалось небольшое количество других форм – стоматоцитов, эхиноцитов и промежуточных форм (менее 3%), которые не анализировались.



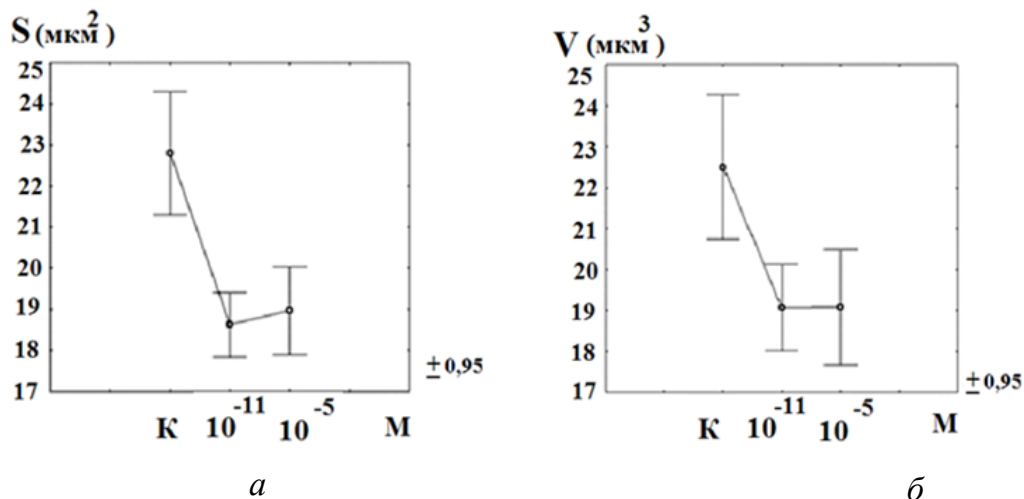
**Рисунок 7.** АСМ имиджи эритроцитов, фиксированного глутаровым альдегидом, на кремниевой подложке, в контроле – (а) и при введении препарата мелафен в концентрации  $10^{-5}M$  – (б).

В результате экспериментов было обнаружено, что мелафен при введении *in vivo* (через 12 часов после введения) в низких ( $10^{-11}M, 10^{-7}M$ ), и более высоких концентрациях ( $10^{-5}M$ ), вызывает изменение морфологии эритроцитов. Как видно из Рисунок 8, наблюдалось уменьшения площади –  $S_{cp}$ , средней высоты –  $Z_{cp}$  и объема

–  $V_{cp}$  АСМ имиджа эритроцита, причем изменения размерных параметров были довольно значительными уже при концентрации  $10^{-11}$ М.



**Рисунок 8.** Изменение площади ( $S_{cp}$ ) – (а), средней высоты ( $Z_{cp}$ ) – (в), объема ( $V_{cp}$ ) – (б), АСМ имиджа эритроцитов в зависимости от концентрации мелафена *in vivo* (Обозначен 95% доверительный интервал).



**Рисунок 9.** Изменение площади ( $S_{cp}$ ) – (а), и объема ( $V_{cp}$ ) – (б), АСМ имиджа эритроцитов в зависимости от концентрации мелафена *in vitro*.

Эксперименты по действию мелафена были проведены также в системе *in vitro* при инкубации мелафена с эритроцитами в течение 1 часа в присутствии 10 мМ глюкозы. В результате работы было показано (Рисунок 8, Рисунок 9), что изменения размерных параметров имиджей эритроцитов под действием мелафена *in vitro* были близки к данным, полученным *in vivo*, что, вероятно, указывает на сходный механизм действия мелафена, и 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 имиджей эритроцитов при действии мелафена происходят в ту же сторону, что и в экспериментах по гликолитическому голоданию (уменьшение  $S_{cp}$ ,  $V_{cp}$  и  $Z_{cp}$ ) по отношению к контрольным образцам. Можно предположить, что действие мелафена на эритроциты, приводящее к изменению осмотического состояния и уменьшению объема, связано с нарушением в ионно-транспортной системе и накоплению  $Ca^{2+}$  внутри эритроцита [16, 17].

#### ***Влияние мелафена ( $10^{-10}$ М) на содержание белков p53 и Bcl-2 в клетках АКЭ.***

Одним из важных свойств мелафена является его способность стимулировать рост растений в малых дозах, а в больших угнетать их рост, т.е. он оказывает разнонаправленное влияние на делящиеся клетки. Ранее на клетках животных было показано, что мелафен также дозозависимо влияет на флуктуацию объема клеток АКЭ и на  $Ca^{2+}$  регуляцию [5], которая 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) [18].

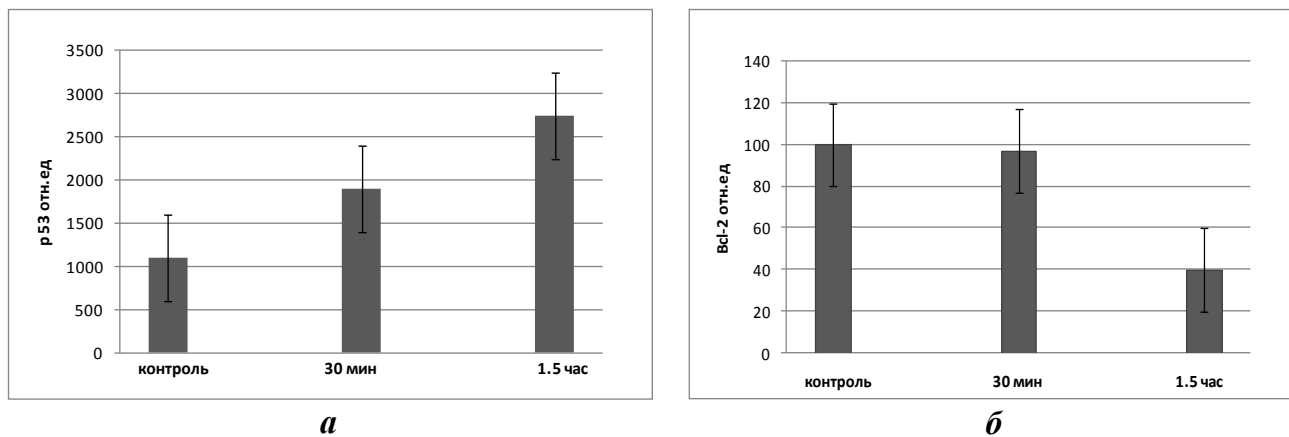
С помощью метода иммуноблоттинга было определено воздействие мелафена на молекулярные мишени апоптоза и показано изменение содержания белка регулятора p53 и антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках мышей лейкозной линии АКЭ.

Для определения содержания ключевых белков апоптоза, мелафен в конечной концентрации  $10^{-10}$ М добавляли в виде раствора к суспензии опухолевых клеток мышей АКЭ, затем контрольные и опытные образцы выдерживали в течение 0 мин, 30 мин и 1,5 часа.

В результате эксперимента (Рисунок 10) было обнаружено, что через 1,5 часа инкубации происходит увеличение количества белка регулятора p53 и снижение количества антиапоптотического белка Bcl-2 по отношению к контролю (в то время как через 0,5 часа существенных изменений не наблюдалось), что может свидетельствовать



о возможной инициации процесса апоптоза клеток АКЭ. Это согласуется с тем [5], 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. Обнаруженное в работе влияние мелафена на молекулярные мишени апоптоза, могло способствовать торможению развития перевивной солидной опухоли – карциномы Льюиса мышей, обнаруженное параллельно в работе [4].



**Рисунок 10.** Изменение содержания белка-регулятора p53 – (а) и антиапоптозного белка Bcl-2 – (б) в асцитных клетках мышей АКЭ при введении мелафена в низкой концентрации  $10^{-10}$  М в зависимости от времени воздействия. Для определения белка p53 использовали антитела FL-393 (“Santa Cruz”, США), и меченый пероксидазой хрена “sc-6243” (фирмы “Sigma-Aldrich”). Для белка Bcl-2 - “Monoclonal Anti-BCL-2 clone10C4”, иммуноглобулин anti-rabbit IgG (“Sigma”). Использовали проявляющий набор АЕС Staining Kit (“Sigma-Aldrich”).

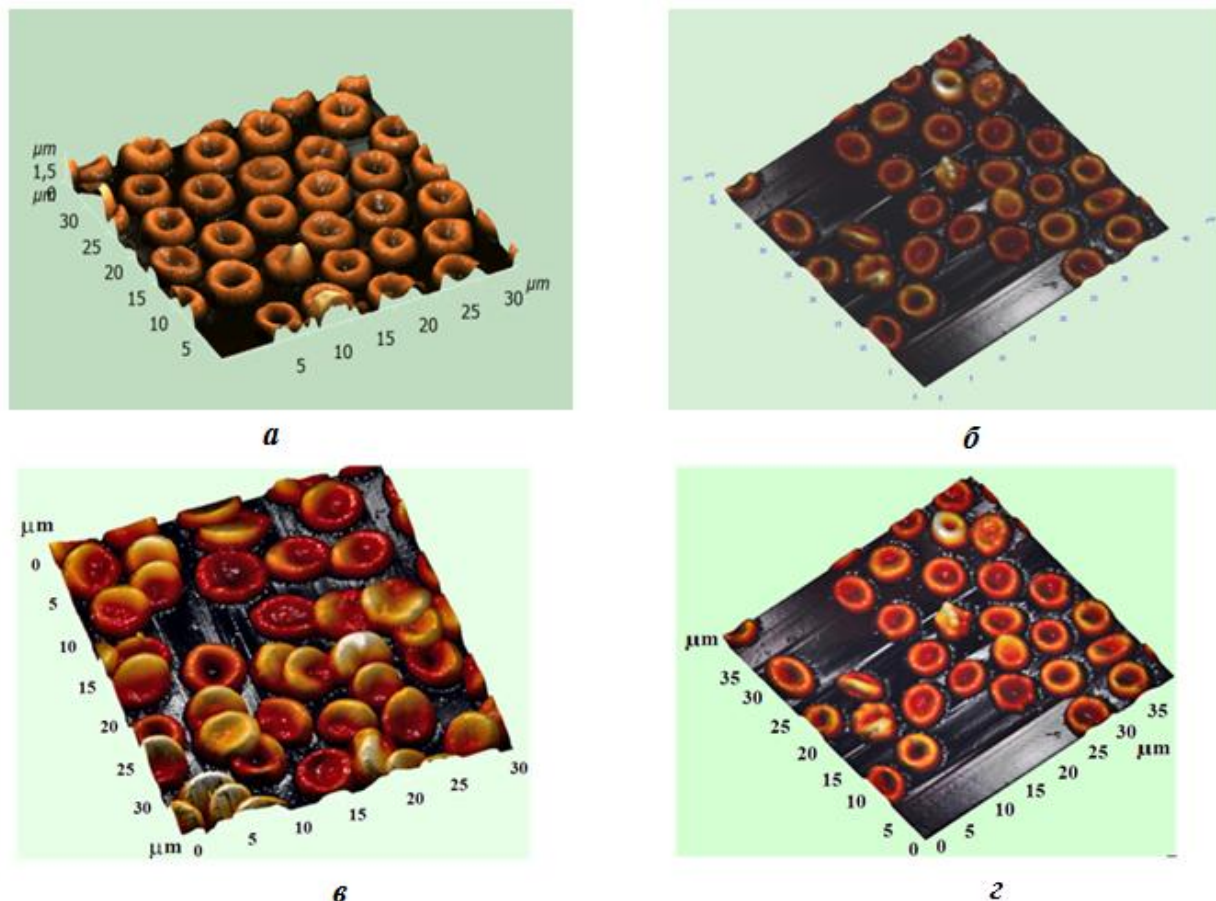
Таким образом, в работе обнаружено множественное влияние мелафена на растительные и животные клетки. При этом мелафен оказывает защитное действие на морфологию митохондрий проростков гороха в стрессовых условиях и иное воздействие на животные клетки, в том числе приводил к изменению морфологии эритроцитов в системе *in vivo* и *in vitro* и показал возможность инициации процессов апоптоза в системе *in vitro*. Проведенное исследование подтвердило, что при применении мелафена в качестве стимулятора роста растений и при обработке семян растений, надо следовать рекомендации его применения, не превышая указанные концентрации ( $1 \cdot 10^{-8}$  -  $1 \cdot 10^{-10}$  М) [19]. В этом случае попадание его в организм животных маловероятно.

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

На эритроцитарной модели методом АСМ было проведено сравнительное изучение структурно модифицирующего действия синтетических фенольных АО: фенозана К (ФК) и ИХФАН-10 в широком диапазоне концентраций. Ранее

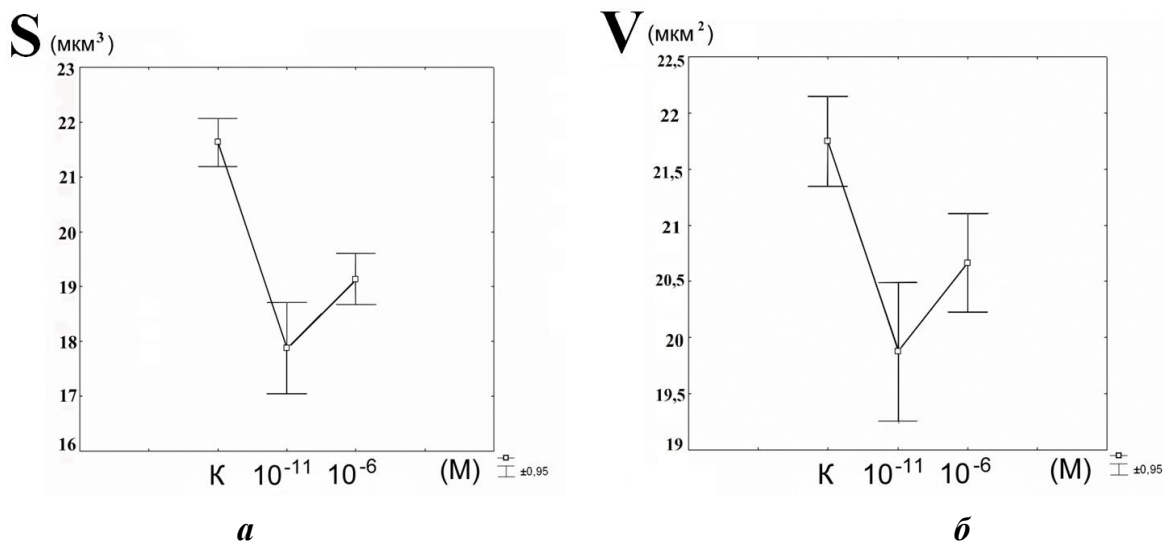
морфологическая трансформация эритроцитарной мембраны была обнаружена при введении ИХФАН-10 в больших дозах  $10^{-4}$  М [13] *in vitro*, а также обнаружена флуктуация объема клеток АКЭ при введении этих АО в широком диапазоне концентраций [5].

Результаты экспериментов и статистическая обработка АСМ имиджей эритроцитов показали (Рисунок 11), что в системе *in vivo* АО оказывают влияние на архитектуру эритроцитов уже при концентрации  $10^{-11}$  М.



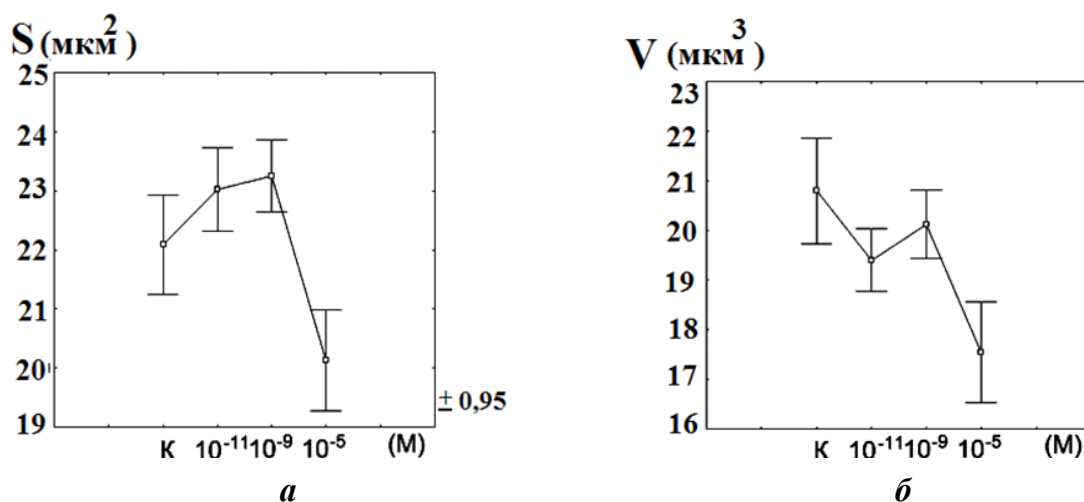
**Рисунок 11.** АСМ имиджи эритроцитов, предварительно фиксированные глутаровым альдегидом, на кремниевой подложке, в системе *in vitro* – (а, б) и *in vivo* – (в, г) в контроле – (а, в) и при действии ИХФАН-10 в концентрации  $10^{-11}$  М – (б, г).

Было продемонстрировано, что фенозан К ( $10^{-11}$ ,  $10^{-6}$  М) при введении *in vivo* приводил к уменьшению площади и объема АСМ имиджа эритроцитов (Рисунок 12), в то время как *in vitro* при инкубации с эритроцитами в течении 1 часа, фенозан К не вызывал изменения морфологии эритроцитов. Это различие может быть, в том числе, связано с возможностью превращения фенозана К в коричную кислоту в организме животных, обнаруженное в работе [20].



**Рисунок 12.** Изменение объема (V) – (б) и площади (S) – (а) АСМ имиджей эритроцитов при введении фенозана К (*in vivo*) в зависимости от его конечной концентрации (М/кг).

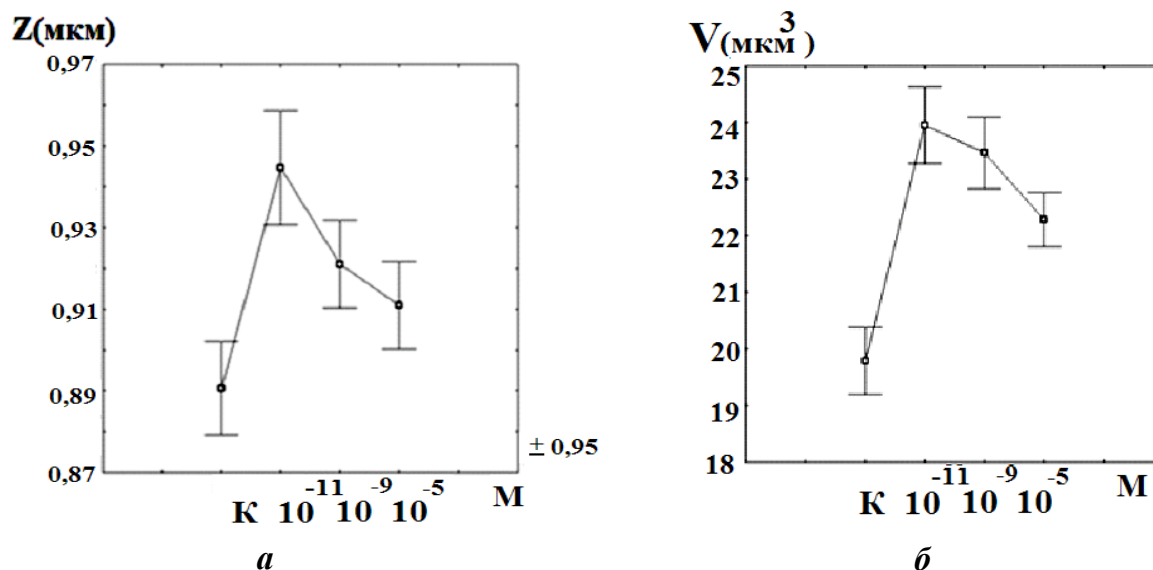
ИХФАН-10 в системе *in vivo* также приводил к изменению архитектоники эритроцитов, которое зависело от концентрации. Так, при низких концентрациях (10<sup>-11</sup>-10<sup>-9</sup>М) наблюдается снижение высоты и тенденция к увеличению площади, при сохранении среднего объема, т.е. наблюдается некоторое «расплющивание» эритроцитов, а при концентрации 10<sup>-5</sup> М/кг уменьшение всех измеряемых параметров. Иные закономерности были обнаружены при введении 10<sup>-11</sup>М - 10<sup>-5</sup>М ИХФАН-10 в суспензию эритроцитов в системе *in vitro*, где наблюдалось увеличение объема, площади и высоты эритроцита.



**Рисунок 13.** Изменение площади (S) – (а) и объема (V) – (б) АСМ имиджей эритроцитов в зависимости от концентрации ИХФАН-10 (*in vivo*). Показан 95% доверительный интервал.

Это согласуется с данными работы [21], в которой методом электронной микроскопии и спиновых меток было показано, что большие дозы 10<sup>-4</sup> 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 до стоматоцитов и эхиноцитов.



**Рисунок 14.** Изменение средней высоты (Z) – (а) и объема (V) – (б) АСМ имиджей эритроцитов в зависимости от концентрации ИХФАН-10 (*in vitro*). Показан 95% доверительный интервал.

Различие в действии фенозана К и ИХФАН-10 *in vitro* может быть обусловлено различием в гидрофобности препаратов, и их локализацией в мембране. Это согласуется с тем, что амфифильный АО фенозан К располагается преимущественно близко к поверхности мембраны эритроцитов, в то время как гидрофобный ИХФАН-10, может закрепляться на поверхности мембраны и частично проникать в липидную часть мембраны [21], что может приводить к изменению осмотического состояния клетки и к увеличению объема эритроцитов.

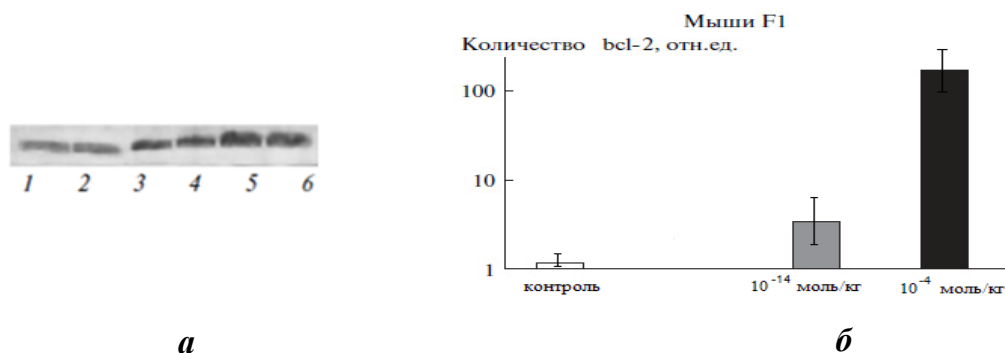
Проведенные методом атомно-силовой микроскопии эксперименты позволили выявить статистически достоверные изменения в морфологии эритроцитов, которые происходят при действии малых доз антиоксидантов, а также продемонстрировали различие в действии фенозана К и ИХФАН-10 в условиях *in vivo* и *in vitro*. В то же время в экспериментах *in vivo* действие фенозана К и ИХФАН-10 в дозе 10<sup>-5</sup>М было сходным, что характеризовало, по-видимому, системный ответ организма на действие АО, что согласуется с тем, что синтетические и естественные АО, например, растительные флавоноиды, пирокатехины, L-аскорбиновая кислота и др., изменяют активность ион-регулирующих белков, таких как Ca<sup>2+</sup>- АТФазы и Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - АТФазы [22].

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

В работе была продемонстрирована способность синтетических антиоксидантов фенозана К и ИХФАН-10 влиять на механизмы модуляции апоптоза и репарации клеток.

Известно, что при введении в организм, фенозан К проявляет широкий спектр положительного воздействия, обладает антимикробными и противоэпилептическими свойствами, обнаруживает антиожоговое и радиопротекторное действие, а также предотвращает возникновение инфарктов и инсультов [23]. Учитывая, что фенозан К (ФК) и ИХФАН-10 различаются по гидрофобности, они могут иметь различную локализацию в мембранах клеток и оказывать как про-, так и антиоксидантное воздействие на биологические системы, действовать как редокс-медиаторы, а также влиять на молекулярные мишени путей апоптоза. При изучении действия ФК, мышам гибридов первого поколения F1 (СВА×С<sub>57</sub>В1) внутрибрюшинно вводили ФК в конечной концентрации 10<sup>-14</sup> и 10<sup>-4</sup> М в течении 4-х дней, затем методом иммуноблоттинга и дот-блоттинга определяли содержание антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках селезенки мышей F1 (СВА×С<sub>57</sub>В1).

В результате экспериментов (Рисунок 15), было обнаружено, что ФК вызывает индукцию антиапоптозного белка Bcl-2 как в сверхмалой дозе 10<sup>-14</sup> М/кг, так и в большей степени в дозе 10<sup>-4</sup>М/кг в клетках селезенки мышей низкорактовой линии F1(СВА×С<sub>57</sub>В1) при 4-х дневном последовательном введении.

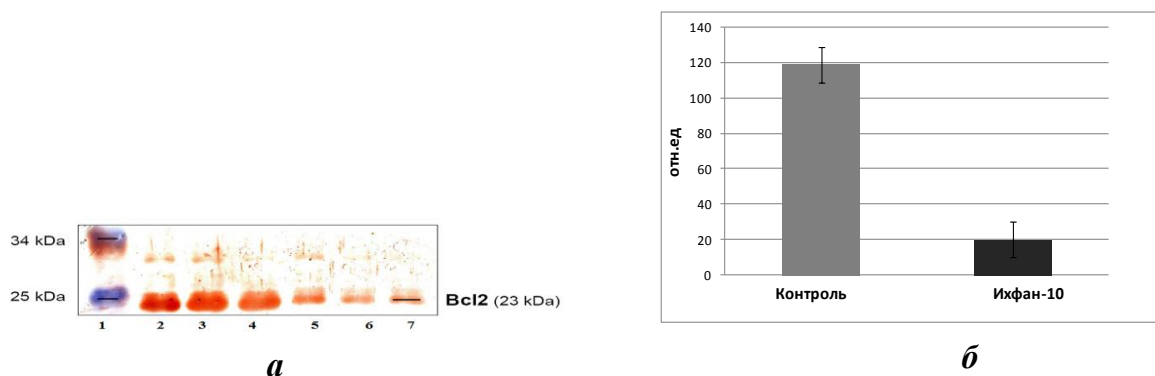


**Рисунок 15.** Определение содержания белка Bcl-2 в клетках селезенки мышей F1(СВА×С<sub>57</sub>В1) при действии ФК методом иммуноблоттинга; полосы белка Bcl-2 на нитроцеллюлозной мембране – (а) и количество Bcl-2 в зависимости от концентрации ФК – (б): К – (1, 2), 10<sup>-14</sup> моль/кг ФК – (3,4), 10<sup>-4</sup> моль/кг ФК – (5,6).

Ранее в нашей лаборатории была обнаружена индукция белка Bcl-2 в крови мышей F1 при аналогичном введении ФК и одновременно снижение двунитевых разрывов ДНК клеток селезенки, что свидетельствует об усилении процессов репарации клеток [24]. Поэтому мы полагаем, что обнаруженное в работе увеличение содержания белка Bcl-2 в экстрактах селезенки мышей-гибридов F1 (СВА×С<sub>57</sub>В1) под действием ФК может

способствовать усилению выживаемости клеток и вызывать многие положительные эффекты ФК, в том числе репарационные и противоожоговые и т.п. [23].

Эксперименты по изучению действия ИХФАН-10 на молекулярные мишени апоптоза проводили в системе *in vitro*. Гепариновый препарат целой крови мышей линии F1 инкубировали с  $10^{-8}$  М ИХФАН-10 в течение 1 часа, затем методом иммуноблоттинга определяли содержание белка Bcl-2 в сыворотке крови контрольных и опытных образцов. Результаты иммуноблоттинга продемонстрировали, что инкубация ( $10^{-8}$ М) ИХФАН-10 (Рисунок 16), приводит к снижению содержание белка Bcl-2 в сыворотке крови мышей линии F1 по сравнению с контрольным образцом.



**Рисунок 16.** Определение содержания белка Bcl-2 в сыворотке крови при действии  $10^{-8}$  моль/кг ИХФАН-10 – (б) и полосы белка Bcl-2 на нитроцеллюлозной мембране: 1 – белковый маркер, (2, 3, 4) – контроль, (5, 6, 7) – ИХФАН -10 – (а).

Было обнаружено, что ИХФАН-10 в концентрации ( $10^{-8}$ М) вызывает уменьшение содержания белка Bcl-2 в крови мышей. Это может быть связано с генерализованным ответом клеток на воздействие препарата и, привести к инициации сигналов апоптоза клеток. Действие ИХФАН-10 в крови, по-видимому, обусловлено его связыванием с различными мишенями, в том числе он способен встраиваться в липидные слои мембран различных клеток, и существенно изменять их функцию, взаимодействовать с ЛПНП (липопротеиды низкой плотности), находящимися в крови, а также показана его возможность ингибировать ацетилхолинэстеразу [25]. При применении ИХФАН-10 в качестве терапевтического препарата, в том числе при лечении болезни Альцгеймера, необходимо учитывать его возможный проапоптозный эффект.

## 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 ( $2 \times 10^{-12}$  М) предотвращала данные изменения.

3. Мелафен в дозах  $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  М при применении как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* вызывает 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 работ, опубликованных по материалам диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. 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. Радиоэкология. – 2010. – Т.50. – № 1. – С. 58–64.
2. Бинюков, В. И. Изучение влияния фенозана, Ихфан-10 и мелафена на эритроциты *in vivo* методом атомно-силовой микроскопии / В.И. Бинюков, О.М. Алексеева, Е.М. Миль, А.А. Албантова, С.Г. Фаттахов, А.Н. Голощапов, Е.Б. Бурлакова, А.И. Коновалов // Доклады РАН. – 2011. – Т.441, № 1. – С. 114–117.
3. 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.
4. 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.

**Другие издания:**

1. **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 // In: Modern Problems in Biochemical Physics: New Horizont. – Ed.: G. E. Zaikov, S. D. Varfolomeev, E.B. Burlakova and A. A. Popov. – Nova Science Publ., Inc. New York. – 2012, Ch. 5. –P. 45–48.
2. **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 // In: Modern Problems in Biochemical Physics: New Horizont. – Ed.: G. E. Zaikov, S. D. Varfolomeev, E.B. Burlakova and A. A. Popov. – Nova Science Publ., Inc. New York. – 2012, Ch.1. –P. 1–10.
3. 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 // Quantitative Chemistry, Biochemistry and Biology: Steps Ahead, Nova Science Publisher. – 2013. –V.18. – P. 195–204.
4. 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.
5. 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.
6. 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. – Ed.: Roman Joswik, Andrei A. Dalinkevich – 2014. –V.8. –P. 87–97.
7. 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.



## **СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В ТЕКСТЕ**

АО – антиоксидант

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БАВ – биологически активное вещество

ПОЛ – пероксидное окисление липидов

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

АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха

PPP – регулятор роста растений

АФК, ROS – активные формы кислорода

### **Список литературы**

1. Эмануэль, Н.М. Антиоксиданты в пролонгировании жизни / Биология старения.– Л: Наука, 1982. – С. 569 – 585.
2. Войников, В.К. Ядерно-митохондриальные взаимоотношения при редокс-регуляции экспрессии генов растений при стрессах // В сб. “Растение и стресс”. – М., 2010. – С. 90–91.
3. Бинюков, В.И. Изучение влияния фенозана, ИХФАН-10 и мелафена на эритроциты *in vivo* методом атомно-силовой микроскопии / В.И. Бинюков, О.М. Алексеева, Е. М. Миль, А.А. Албантова, С.Г. Фаттахов, А. Н. Голощاپов, Е.Б. Бурлакова, А.И. Коновалов // Доклады РАН. – 2011. – Т.441, № 1. – С.114-117.
4. Ерохин, В.Н. Влияние мелафена на развитие солидной карциномы Льюис мышей/ В.Н. Ерохин, А.В. Кременцова, В.А. Семенов // 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.
5. Алексеева, О.М. Влияние экранированных фенолов на структуру липидов, а также растворимых и мембранных белков / О.М. Алексеева, Ю.А. Ким, А.Н. Голощاپов, В.А. Рыков, Е.М. Миль // Фенольные соединения. Фундаментальные и прикладные аспекты. – 2010. – С.116–126.
6. 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.
7. 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. Голощاپов, А.И. Коновалов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. –Т. 147. № 6. – С.684–688.

8. 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. Радиоэкология. – 2010. – Т.50, № 1. – С. 58–64.

9. 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 // ДАН. – 2012. –Т.446, № 2. – С.222–225.

10. Albantova, A.A. The Investigation Influence of Phenozan, ICHPHAN-10 and Melafen on the 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.

11. 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.

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

13. 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.

14. Жигачева, И.В. Состояние электронтранспортной 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. – 52 с.

15. 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. – 408 с.

16. 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.

17. 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.

**18.** 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. Rüdé, E.F. Wagner, M. Oren // *EMBO J.* –1994. –Vol.13. –P.1368–1374.

**19.** Фаттахов, С.Г. Меламинавая 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.

**20.** 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.

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

**22.** Тараховский, Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов, Е.Н. Музафаров // Пущино: Synchronobook. – 2013. – 310 с.

**23.** Бурлакова Е.Б. // *Рос. хим. журн.* –1999. –Т. 43, № 5.

**24.** 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.

**25.** 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.