

# **КОНЦЕНТРАЦИОННЫЙ ОПТИМУМ РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ – МЕЛАФЕНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НА МЕМБРАНЫ ЖИВОТНЫХ.**

**Алексеева О.М., Кременцова А.В., Шибряева Л.С., Кривандин А.В.,  
Шаталова О.В., Миль Е.М., Бинюков В.И., Голощапов А.Н.,  
Бурлакова Е.Б., Ягольник Е.А.(1), Ким Ю.А.(2)  
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,  
(1) Тульский государственный университет,  
(2) Институт биофизики клетки РАН, Пущино.**

**Регулятор роста растений – мелафен  
тестировался, как биологически активное вещество,  
на объектах животного происхождения.**

**Основной целью работы было выяснение  
предельных концентраций мелафена неповреждающих животные клетки.**

Для решения задач продовольственной программы важнейшую роль играют биологически активные вещества, повышающие устойчивость растений к неблагоприятным условиям. Одним из таких веществ является

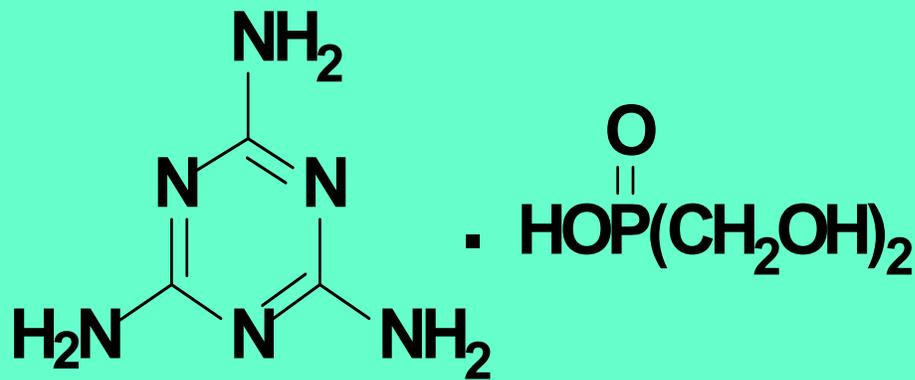
**Мелафен –**

гетероциклическое фосфорорганическое соединение, синтезированное в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова.

**Мелафен**

представляет собой меламиновую соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты и получается в одну стадию с высоким выходом из промышленно доступных продуктов.

### МЕЛАФЕН



В широком диапазоне концентраций ( $10^{-2}$  М -  $10^{-17}$  М) было протестировано действие биологически активного вещества

меламиновая соль  
бис(оксиметил)фосфиновой кислоты

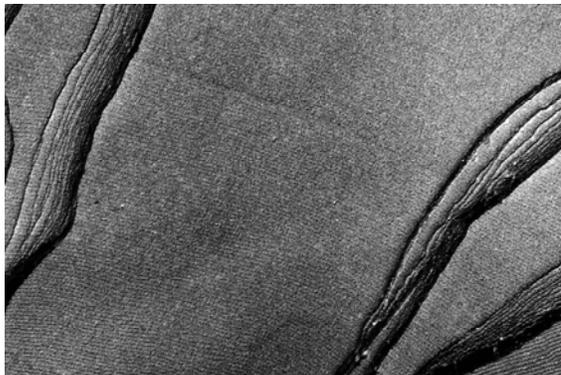
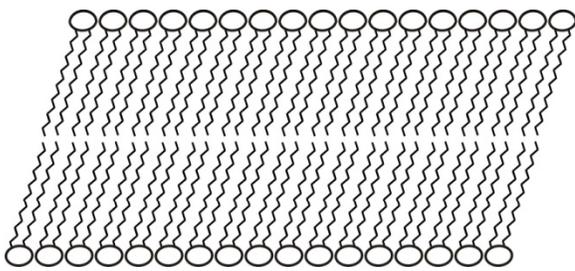
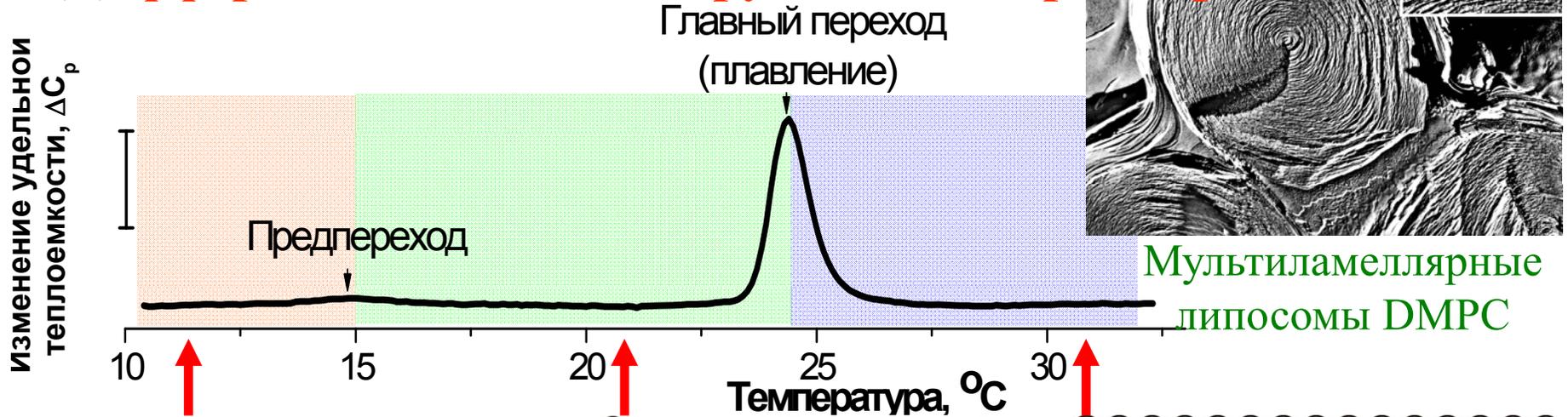
# Исследование биологически активных веществ

## СХЕМА

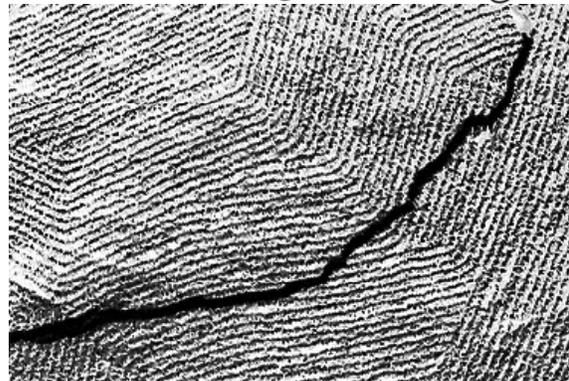
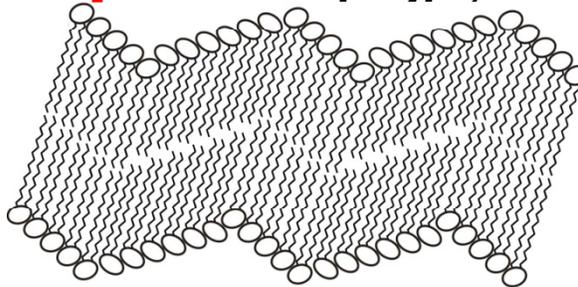


# Фазовые переходы бислоя липидов

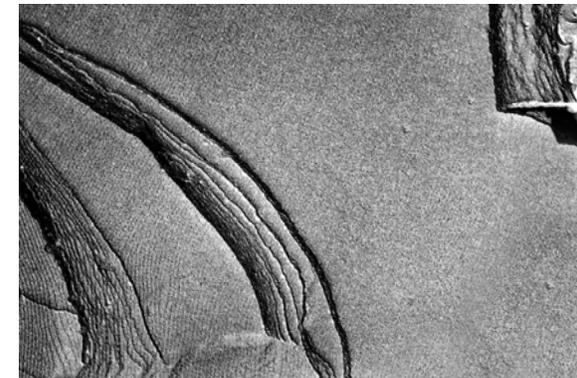
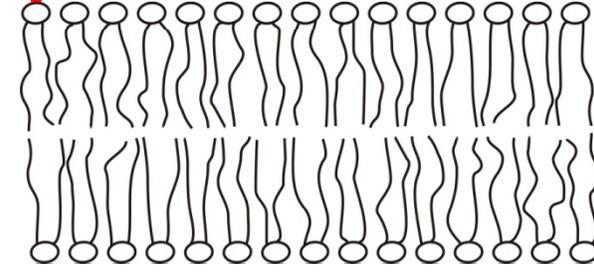
## Дифференциальная сканирующая калориметрия



Гель



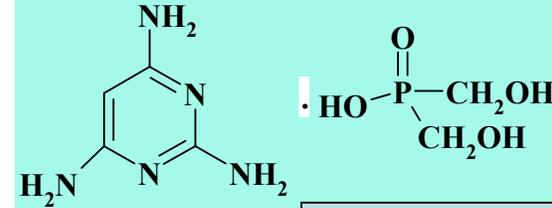
Риппл-фаза



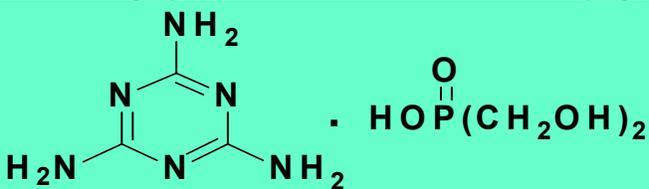
Жидкий кристалл

# Взаимодействие с липидами

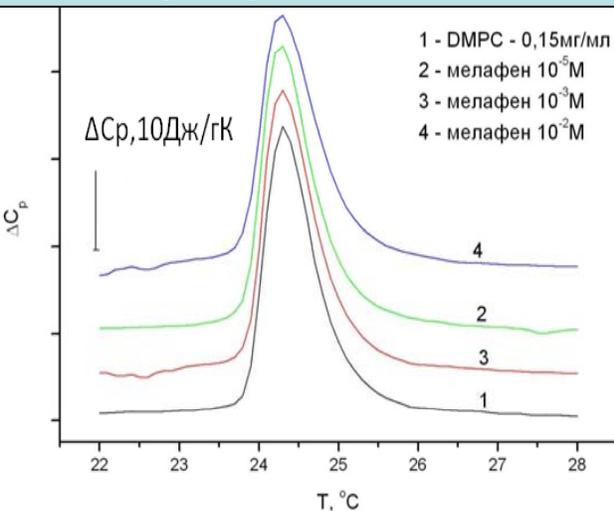
Липосомы из индивидуального фосфолипида ДМФХ



калориметрия

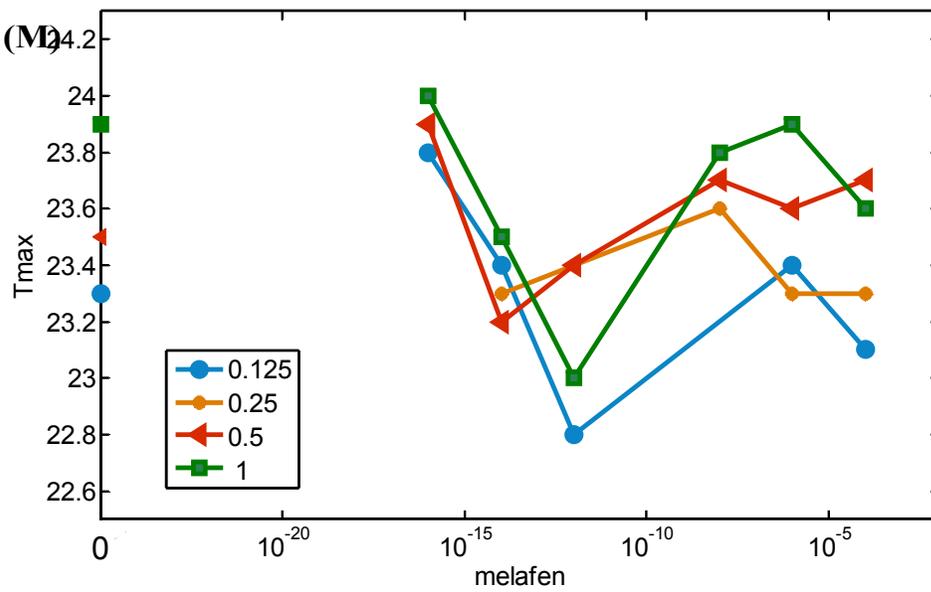
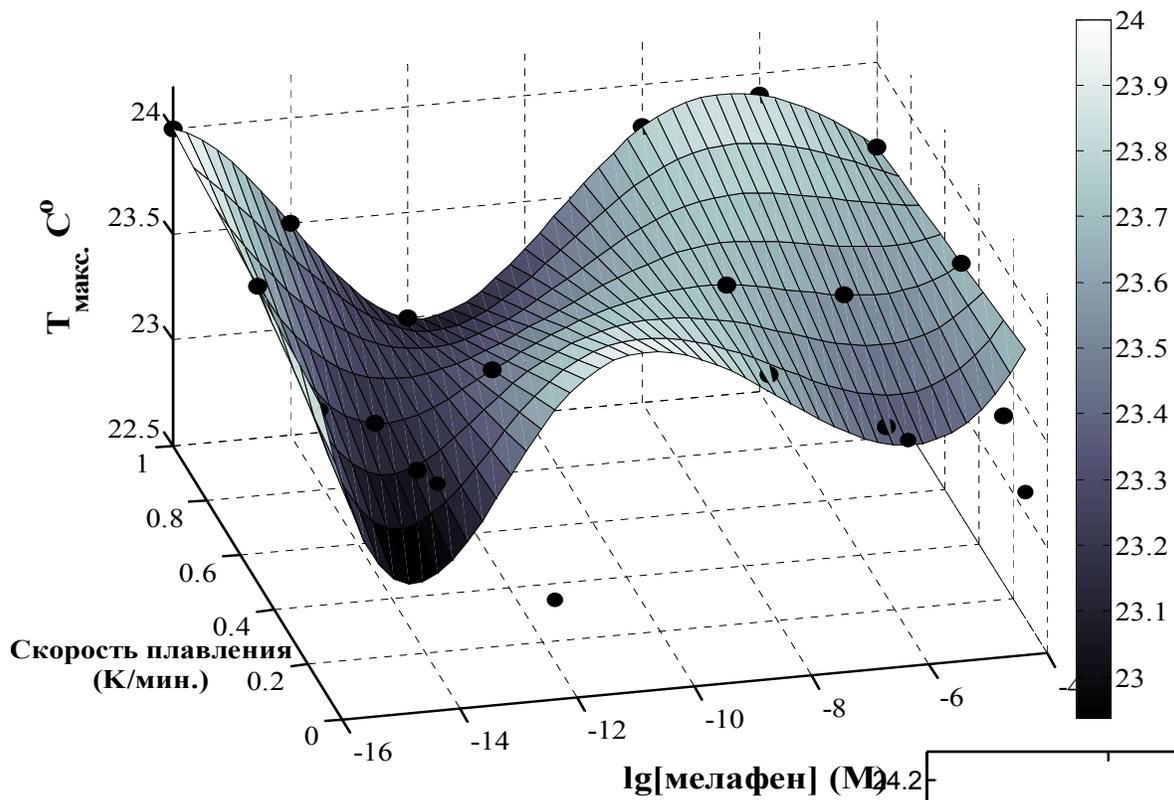


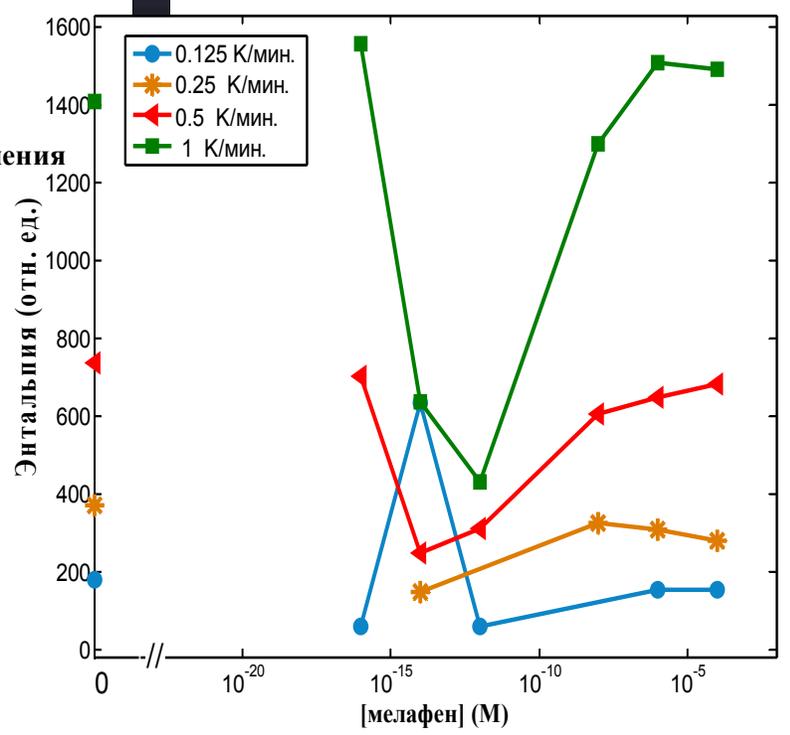
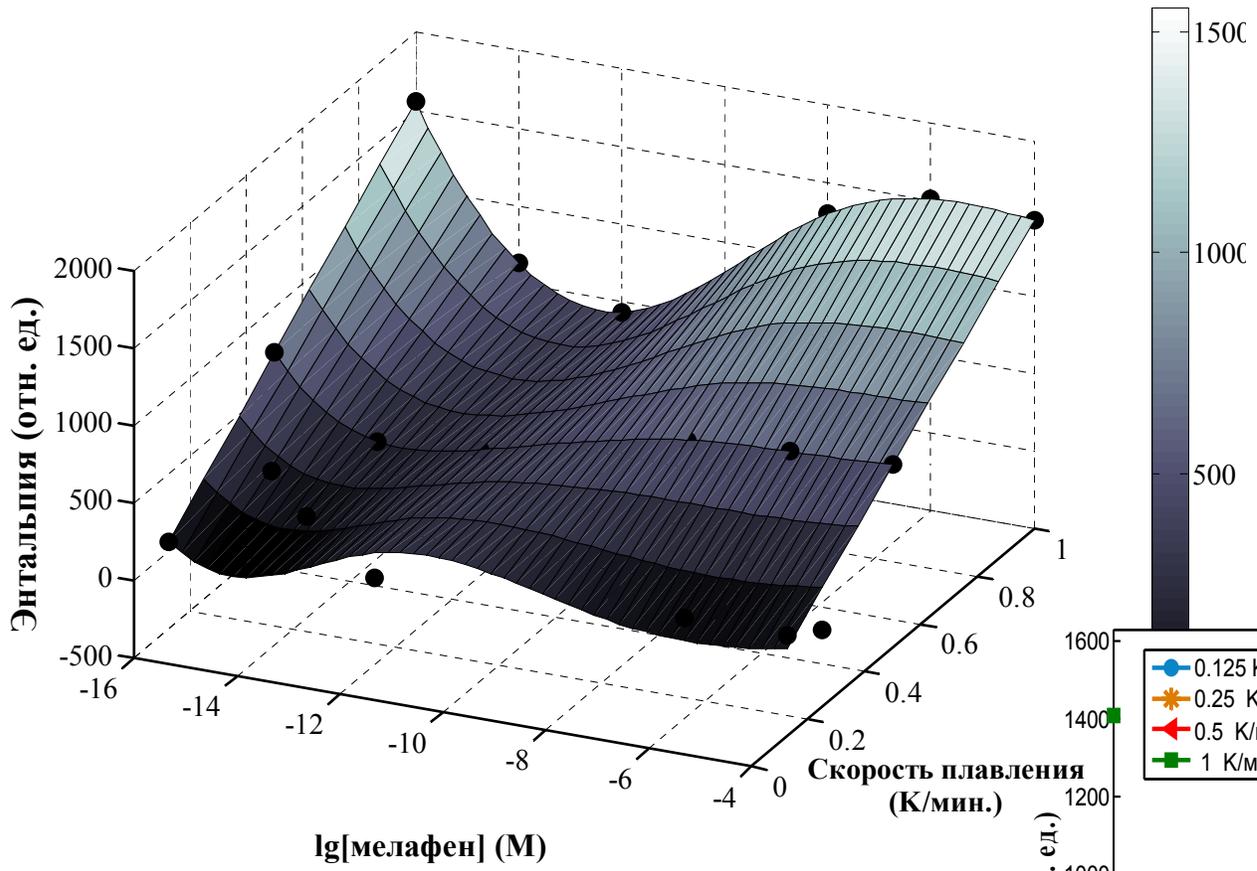
Мелафен – производное меламина и бис (оксиметил) фосфиновой кислоты

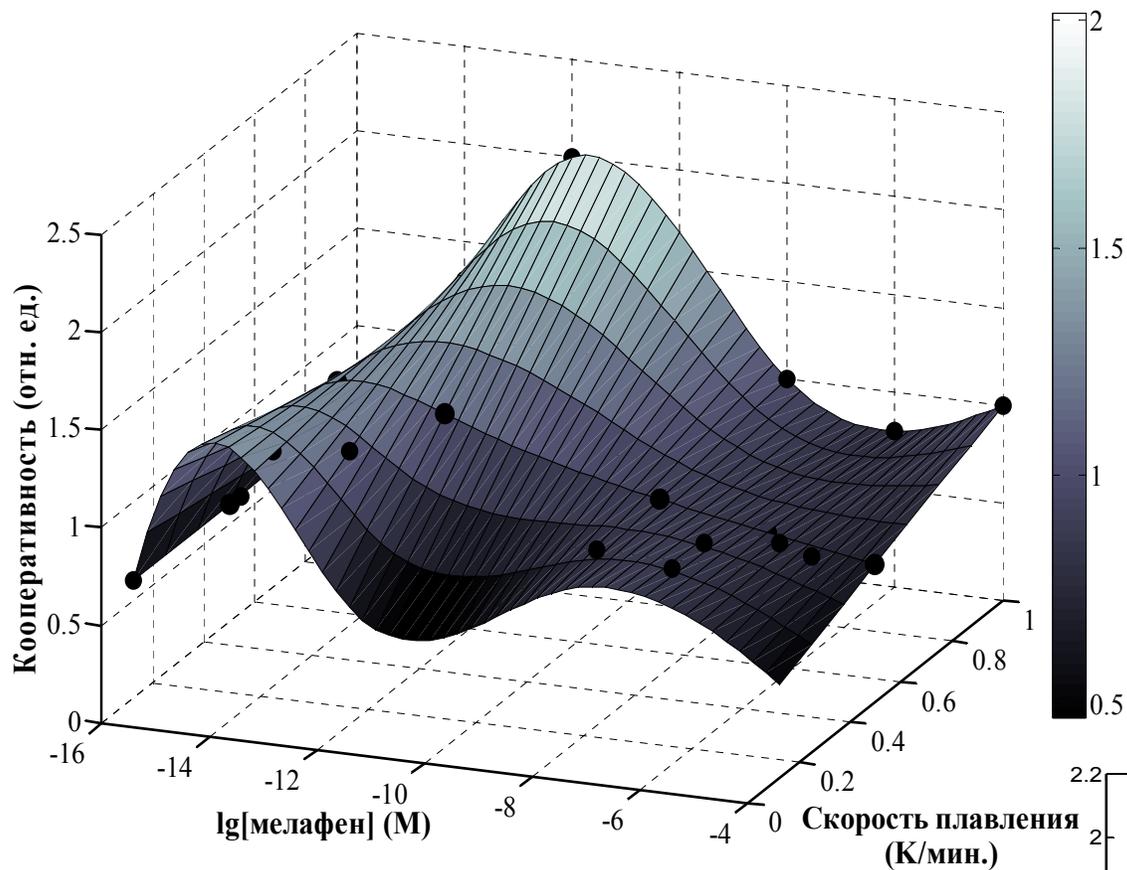


пирарфен

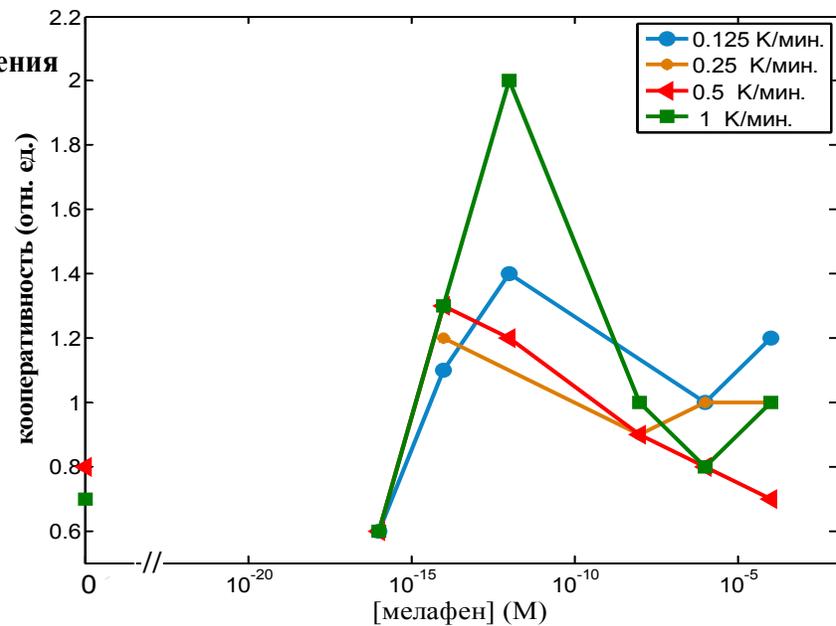
Концентрация мелафена (M)	Максимум температурного перехода (C°)	Полуширина полуперехода (отн.ед.)	Энтальпия (отн. ед)
0	24,1	0,6	358,1
$10^{-21}$	24,1	0,7	351,3
$10^{-19}$	24,1	0,7	370,1
$10^{-17}$	24,2	0,7	363,9
$10^{-15}$	24,2	0,6	379,5
$10^{-13}$	24,2	0,6	370,1
$10^{-11}$	24,2	0,7	375,2
$10^{-7}$	24,2	0,7	366,4
$10^{-5}$	24,2	0,7	372,6
$10^{-3}$	24,2	0,8	385,4





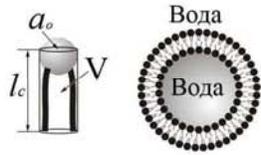


Концентрация мелафена дана  
в логарифмическом масштабе.  
Точка "0" условна



# Форма молекул и фазовое состояние липидов

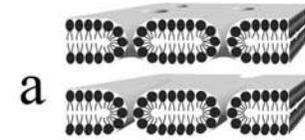
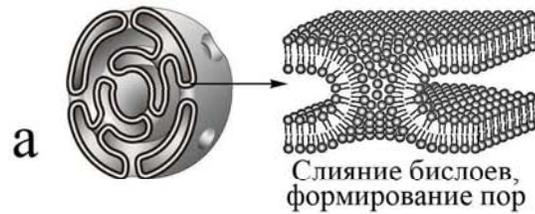
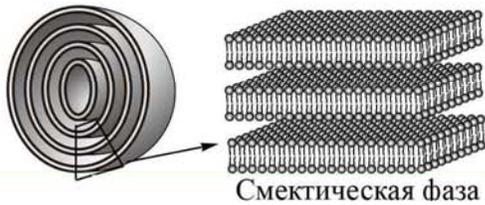
(1)



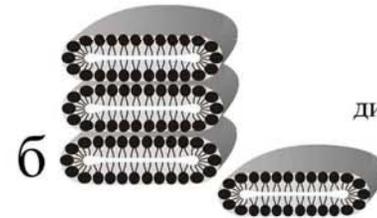
(2)



(3)



Фрагментация бислоев



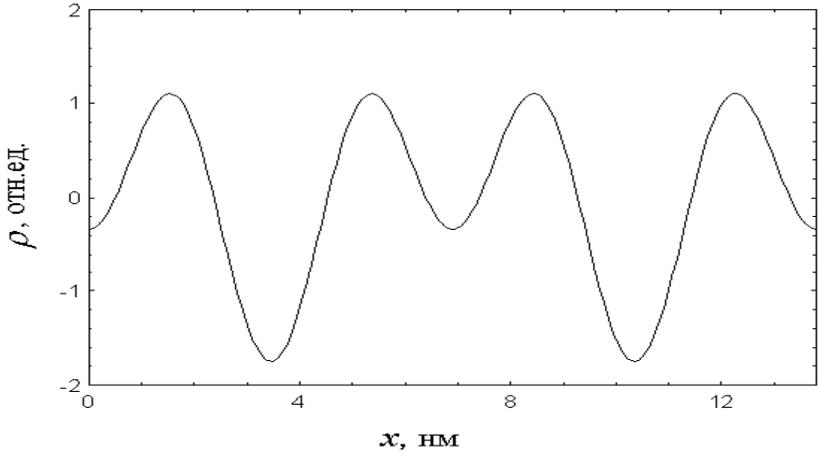
Стопки бислоев и дисковидные мицеллы



# Взаимодействие с липидами

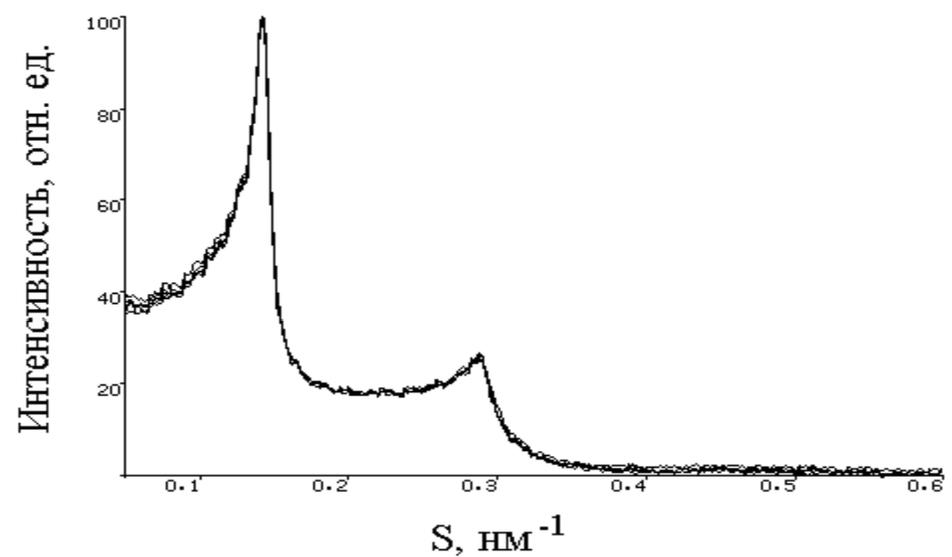
Липосомы из смеси природных фосфолипидов яичного лецитина

Рентгеновская дифракция



Профиль электронной плотности мембран в мультислойной липосоме. Изображены 2 бислойные мембраны.  $x$  – расстояние в направлении, перпендикулярном плоскости мембран.

толщина одной мембраны, вычисляемая, как расстояние между пиками электронной плотности, соответствующими положению полярных групп липидов. Толщина мембраны во всех препаратах составляет около 4 нм.

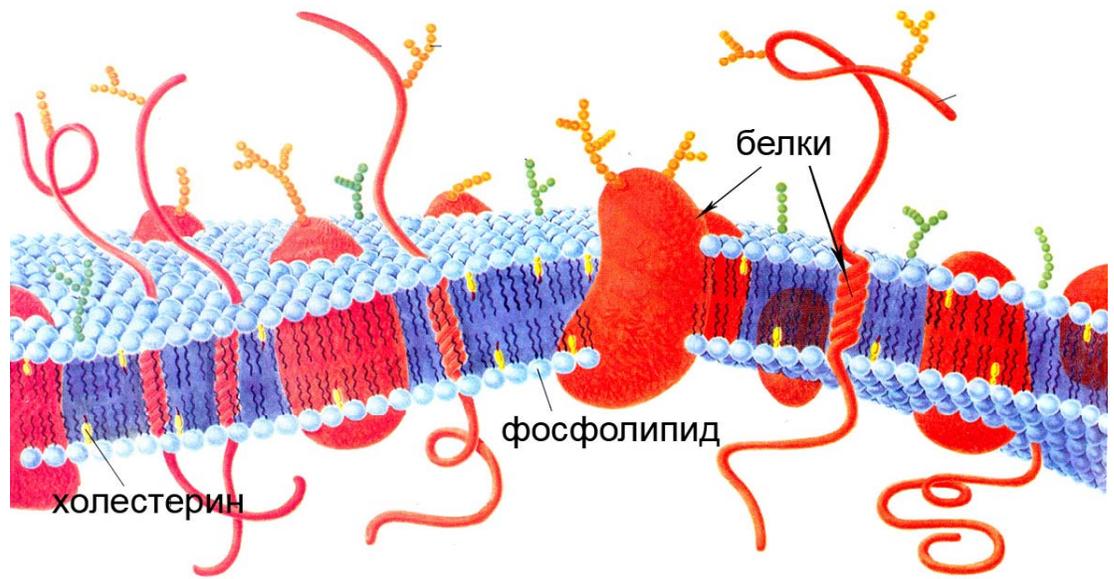
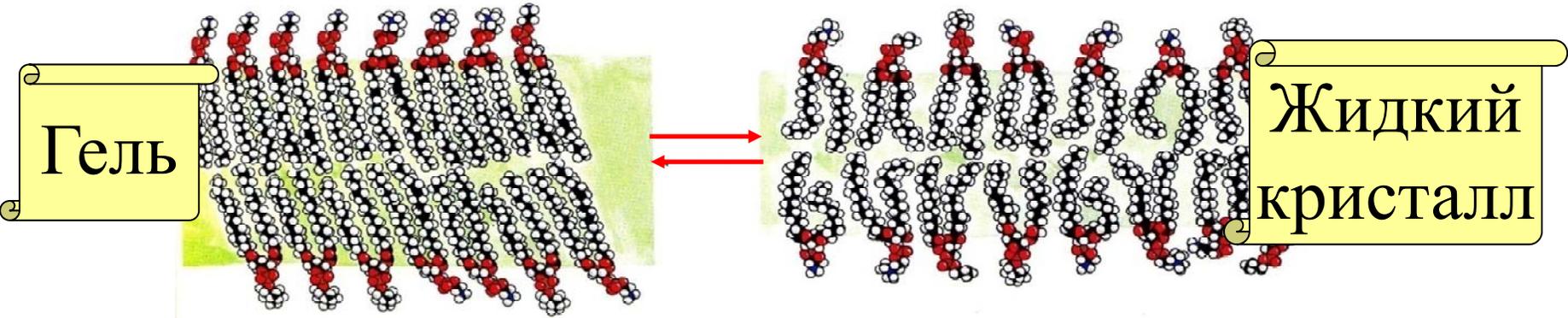


Малоугловые дифрактограммы дисперсий липосом ( $10^{-21}$ ,  $10^{-18}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-6}$  М мелафен и контроль). Вычиталось фоновое рассеяние и нормировались интенсивности. По оси абсцисс модуль дифракционного вектора  $S = (2\sin\theta)/\lambda$ .

наблюдаются два дифракционных максимума, - первый и второй порядки отражения от упорядоченных мультислоев мембран в липосомах. Дифрактограммы совпадают, т.о. структура мембран во всех образцах липосом сходна. Период повторяемости мембран в липосомах  $D$  составляет 6.9 нм.

# Молекулярная организация мембран

## Бислой фосфолипидов



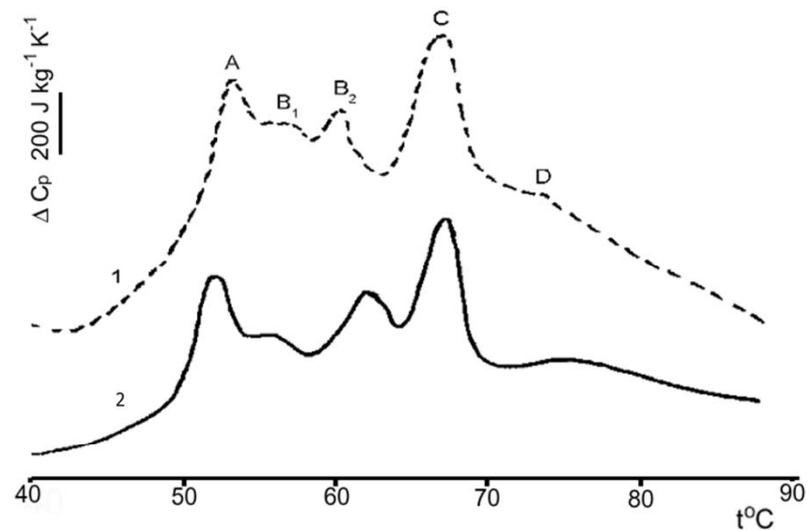
## Мозаичная структура мембран живой клетки

## Взаимодействие с белками

**Мембранные белки:**  
Тени эритроцитов – структурный аналог клеточной мембраны

калориметрия

### Вклад конкретных белков в структуру доменов мембран



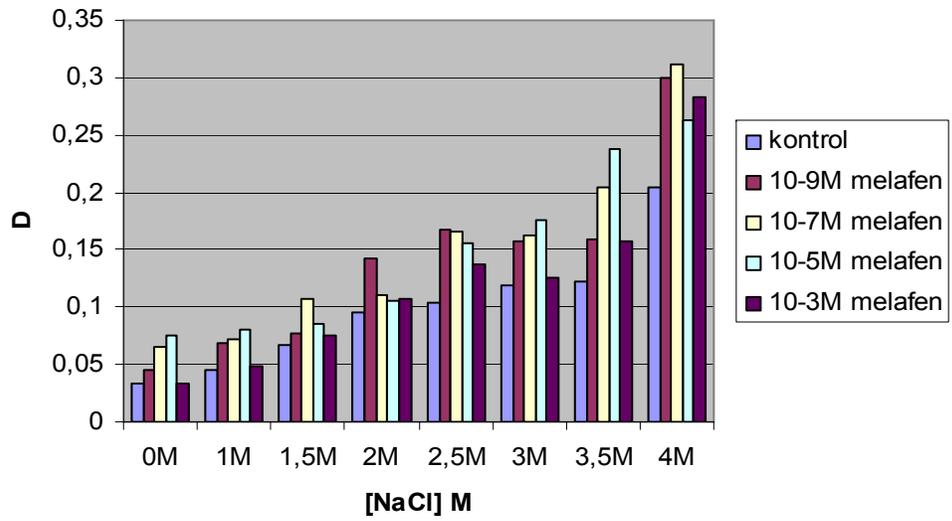
Белки мембранного скелета эритроцитов тесно взаимодействуют друг с другом и образуют мембранные домены, денатурация которых формирует структурные тепловые переходы: **5 идентифицированных структурных переходов (A-, B1-, B2-, C- и D- переходы).**

Модель адекватна, -в мембранах других клеток развиваются такие же изменения,

поскольку белки семейства спектрина, анкирина, белков полос 4,1 и 4,2 и белка полосы 3 представлены в составе мембранного скелета практически всех клеток организма.

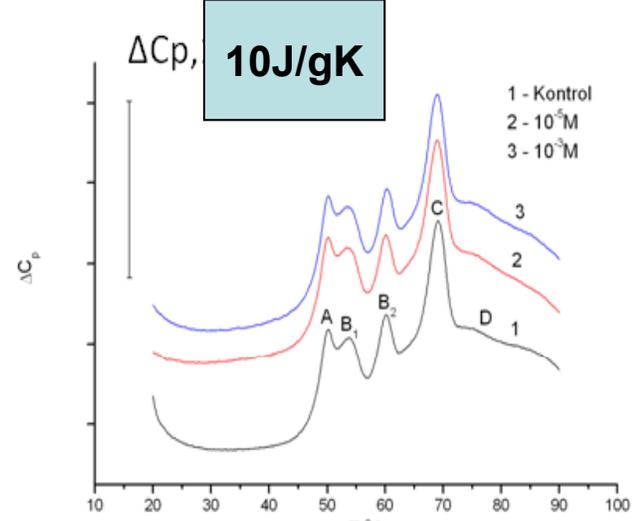
Известно, что свободнорадикальный процесс, вызывает глобальную структурную перестройку мембранного скелета эритроцитов. Структурные домены мембранного скелета эритроцитов обладают разной чувствительностью к окислительному стрессу.

# Гиперосмотический гемолиз



Влияние мелафена также было исследовано на клетки и мембрану в нормальных и стрессовых условиях.

При тестировании в гиперосмотических условиях влияния мелафена ( $10^{-13}$  -  $10^{-3}$  M) на целые клетки эритроцитов – уровень гемолиза, обнаружено увеличение некоторое усиление гемолиза

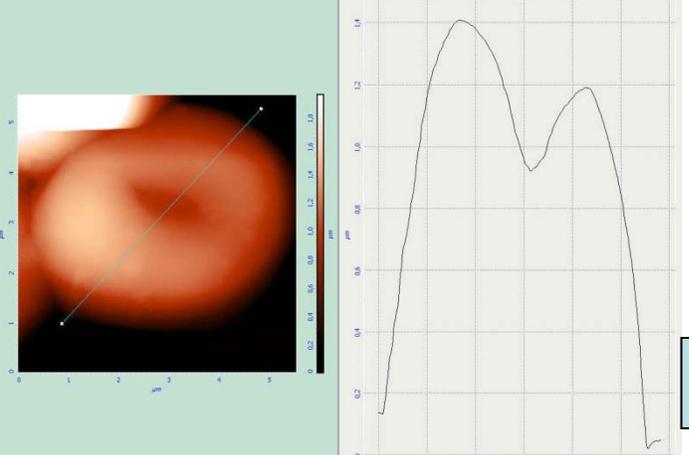


Влияние на белок-липидные домены теней эритроцитов даже больших концентраций мелафена  $10^{-5}$ - $10^{-2}$  M практически нет. На второй день после выделения теней, также влияние мелафена не было. Белок-липидные структуры, в отличие от чисто липидных очень устойчивы к действию мелафена.

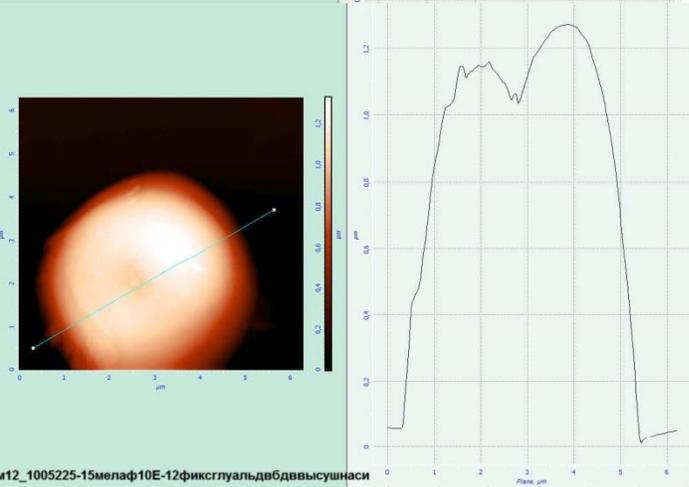
Термограммы дифференциальной сканирующей калориметрии теней эритроцитов

# Влияние мелафена форму эритроцитов (атомно-силовая микроскопия)

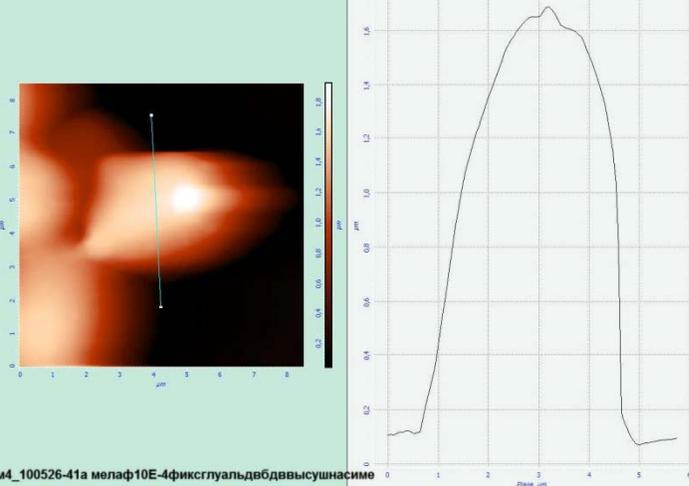
Контроль



$10^{-12}$  М

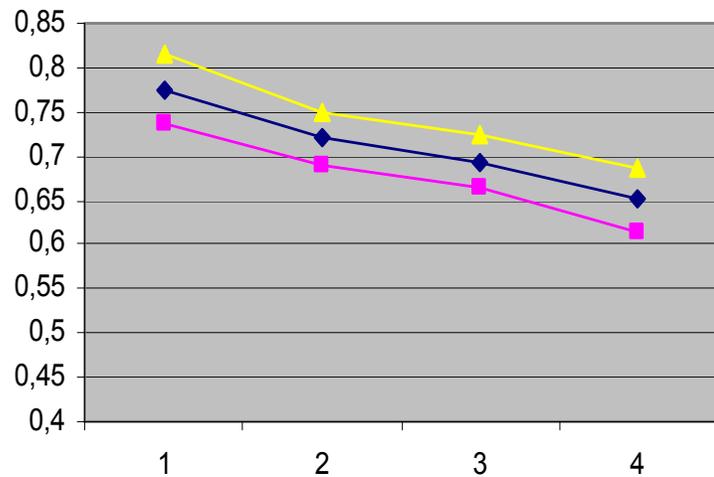


$10^{-4}$  М

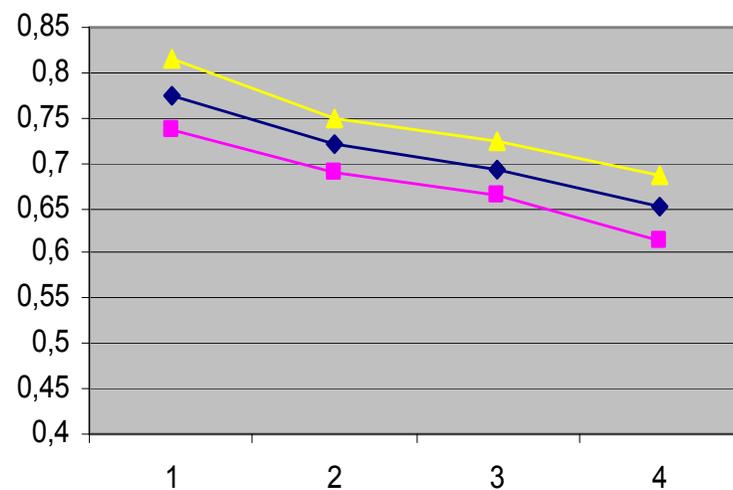


Ярко выраженные морфологические изменения эритроцитов под влиянием  $10^{-12}$  и  $10^{-4}$  М Мелафена

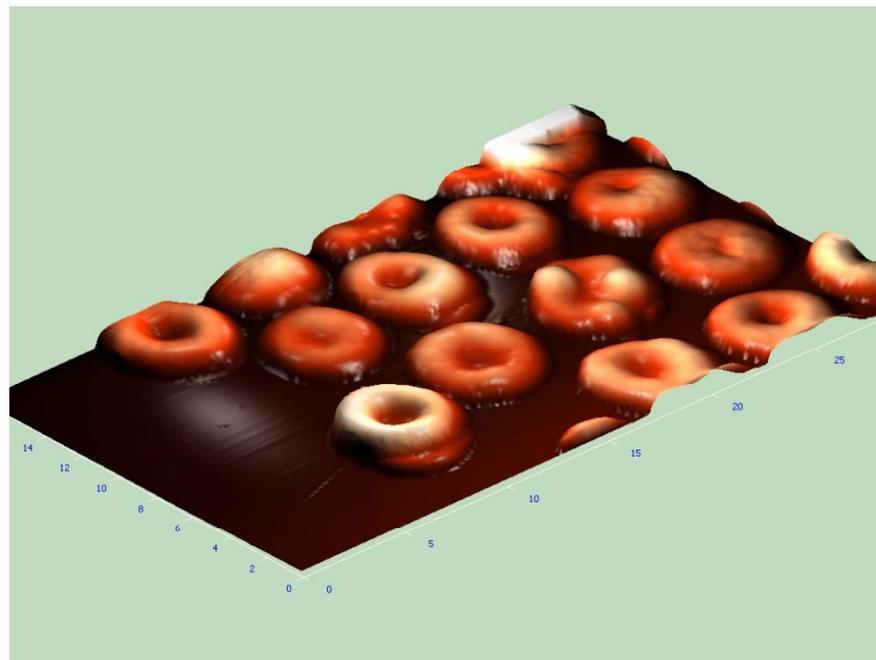
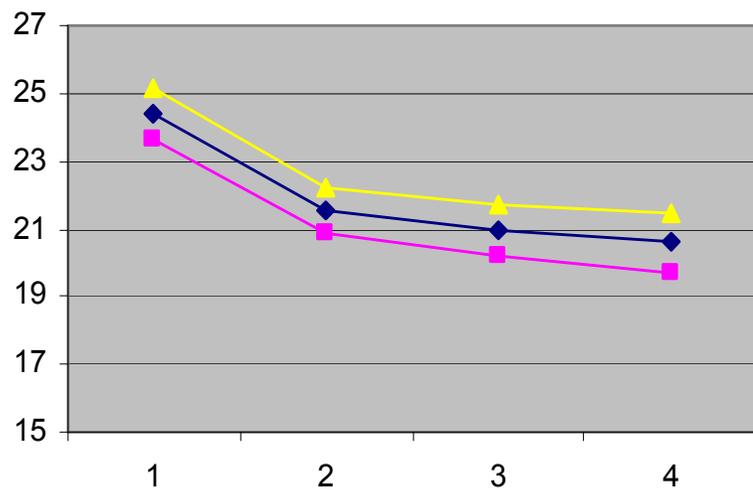
ср. высота эритр.1-к,2-10E-11M,3-10E-7M,4-10E-5M  
мелафен



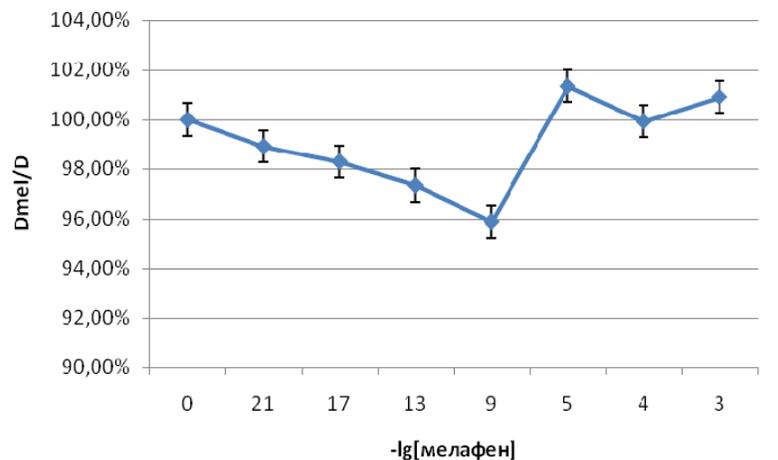
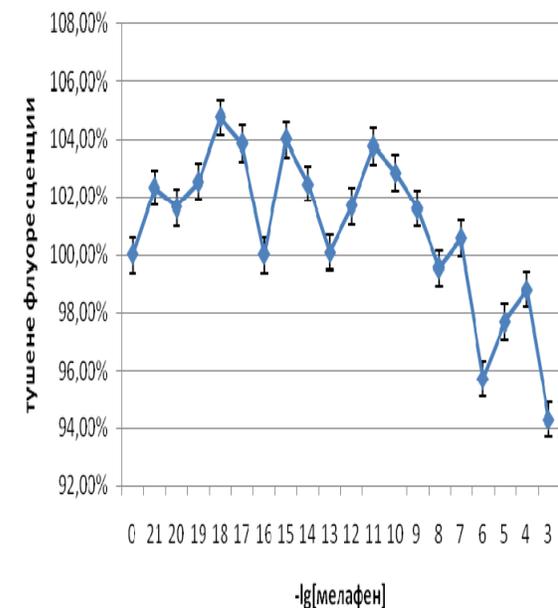
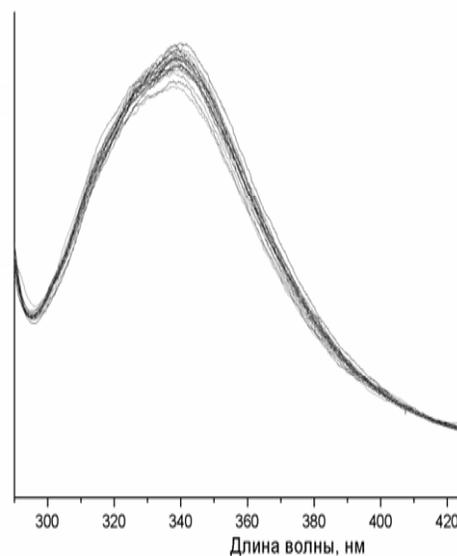
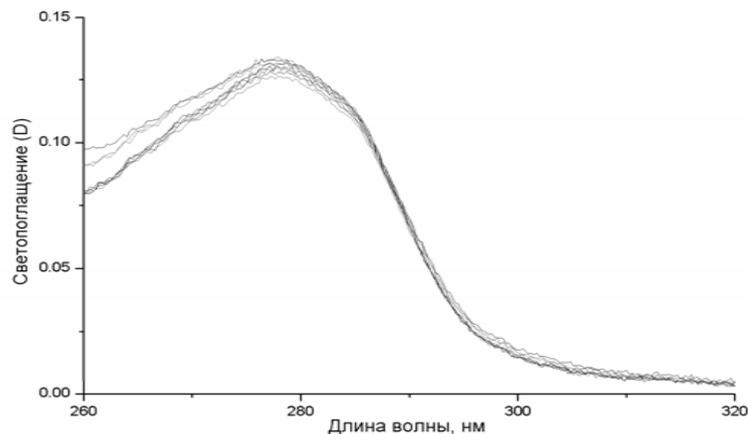
ср. высота эритр.1-к,2-10E-11M,3-10E-7M,4-10E-5M  
мелафен



объем эритр.1-к,2-10E-11M,3-10E-7M,4-10E-5M  
мелафен



# Влияние мелафена на спектральные характеристики бычьего сывороточного альбумина (БСА)



Спектры излучения в значительно степени подобны, однако при построении зависимости Амплитуды в максимуме эмиссии триптофанилов от концентрации мелафена выявляется тенденция к тушению флуоресценции мелафеном в больших Концентрациях и возгорание флуоресценции при малых и сверхмалых.

Зависимость полимодальная, что характерно для веществ, действующих в сверхмалых дозах. Небольшие разнонаправленные конформационные перестройки происходят в БСА

Максимум спектра поглощения БСА не сдвигается, однако происходит Изменение величины поглощения и Формы спектра. Мелафен влияет на конформацию БСА.

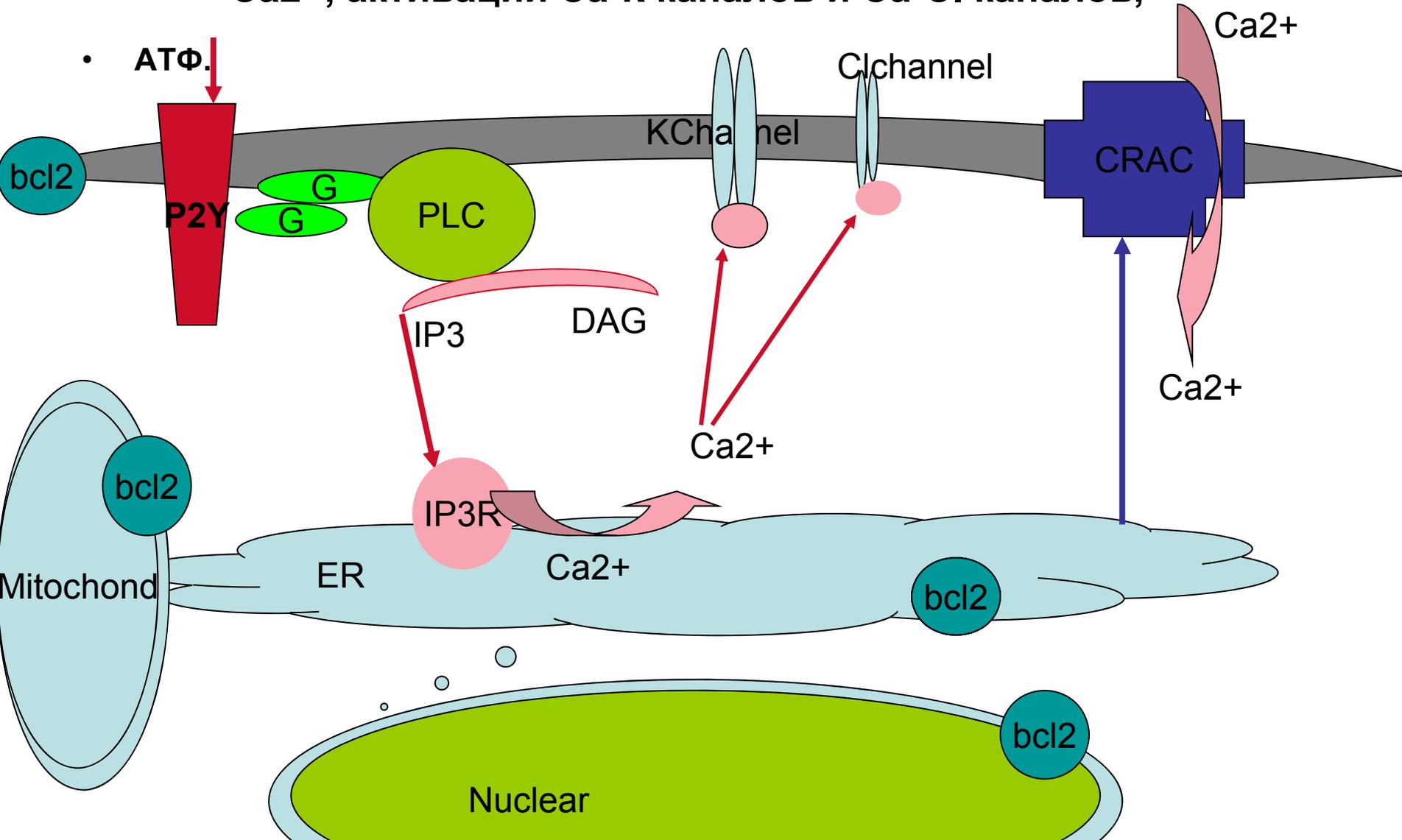


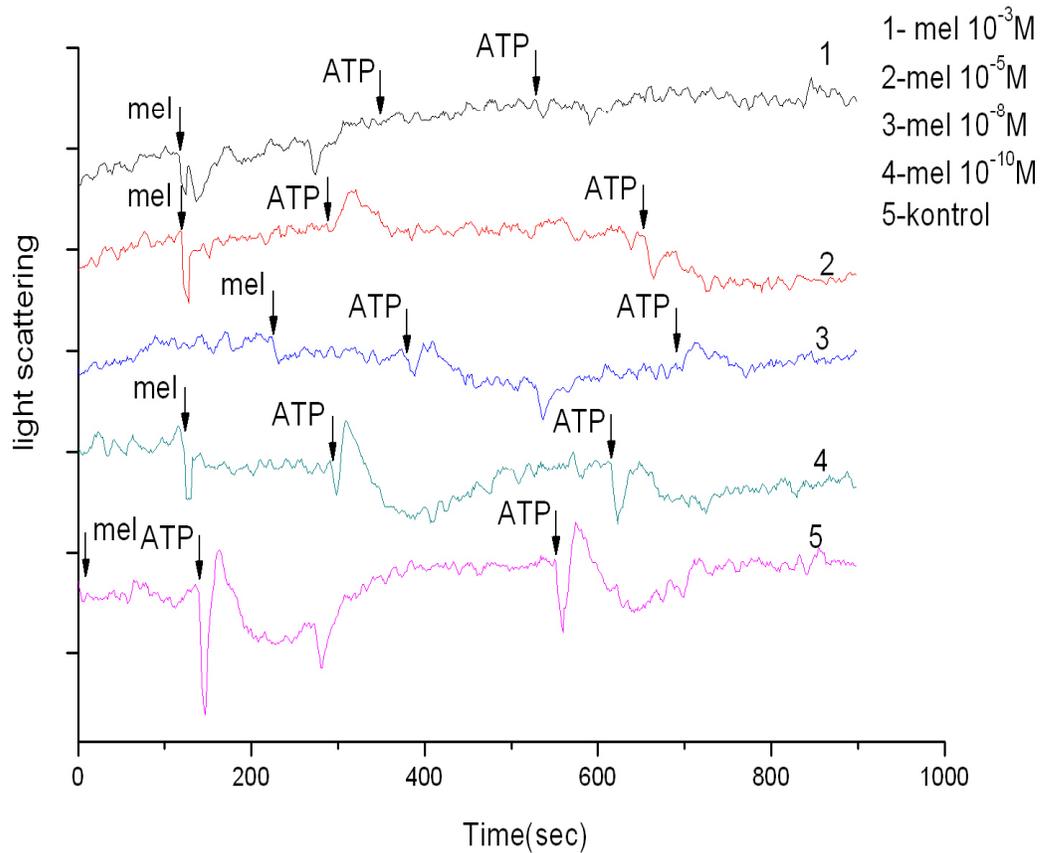
Для того чтобы указать пределы концентраций, при которых не будут проявляться побочные эффекты на животных объектах, было протестировано влияние на клеточные системы трансдукции сигнала. Так как эритроциты лишены такой системы, то были проведены исследования на клетках АКЭ. При активации  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальной системы добавками АТФ происходит набухание клеток и пропорционально изменяется интенсивность светорассеяния в суспензии клеток. Взаимодействие АТФ с пуринорецепторами  $\text{P2Y}$  на поверхности клетки приводит к повышению цитоплазматической концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , активации  $\text{Ca-K}$  каналов и  $\text{Ca-Cl}$  каналов, изменяющей объем клеток. *Зинченко В.П., Касымов В.А., Ли В.В., Каймачников Н.П.* // Биофизика. (2005) 50(5): 1055-1069;

Однако, в случае влияния на функционирование клетки интервал сужается.  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальная система клеток животных – АКЭ подвергается угнетению даже при концентрациях  $10^{-11}$  М. Мелафен влияет сразу на две мишени на поверхности клеток – на метаболитные пуринорецепторы и на  $\text{Ca}^{2+}$ -проводящие каналы емкостного входа (CRAC), значительно снижая их активность. Только при концентрациях  $10^{-13}$  М и ниже  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальная система клеток не угнетается.

# Активация Ca<sup>2+</sup>-сигнальной системы добавками АТФ.

Взаимодействие АТФ с пуринорецепторами P2Y на поверхности клетки приводит к повышению цитоплазматической концентрации Ca<sup>2+</sup>, активации Ca-K каналов и Ca-Cl каналов,





**Реакция клетки на АТР имеет бимодальный характер: первый ярко выраженный пик отражающий резкое повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при освобождении  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо эндоплазматического ретикулума**

**сменяется медленной второй фазой, обусловленной активацией каналов емкостного входа  $\text{Ca}^{2+}$ .**

## Влияние мелафена на ответ клеток АКЭ на добавку АТФ

Образец+мелафен	1пик (отн.ед.)	$\Delta$ (%)	2пик (отн.ед.)	$\Delta$ (%)
контроль	27,5+_0,1	-	20+_0,1	-
+10 <sup>-13</sup> М	35+_0,1	+27+_0,01	19+_0,1	-5+_0,01
+10 <sup>-12</sup> М	33+_0,1	+20+_0,01	19+_0,1	-5+_0,01
+10 <sup>-11</sup> М	27,5+_0,1	0	13+_0,1	-35+_0,01
+10 <sup>-10</sup> М	25+_0,1	-9+_0,01	13+_0,1	-35+_0,01
+10 <sup>-9</sup> М	22+_0,1	-20+_0,01	10+_0,1	-50+_0,01
+10 <sup>-8</sup> М	16+_0,1	-42+_0,01	7+_0,1	-65+_0,01
+10 <sup>-7</sup> М	13+_0,1	-53+_0,01	6+_0,1	-70+_0,01
+10 <sup>-6</sup> М	12+_0,1	-56+_0,01	3+_0,1	-85+_0,01
+10 <sup>-5</sup> М	11+_0,1	-60+_0,01	2+_0,1	-90+_0,01
+10 <sup>-4</sup> М	7+_0,1	-74,5+_0,01	0	-100
+10 <sup>-3</sup> М	0	100	0	100

Увеличение концентрации мелафена приводит к снижению амплитуды обоих пиков

Зависимость величины первого и второго ответа от мелафена имеет доза-зависимый характер.

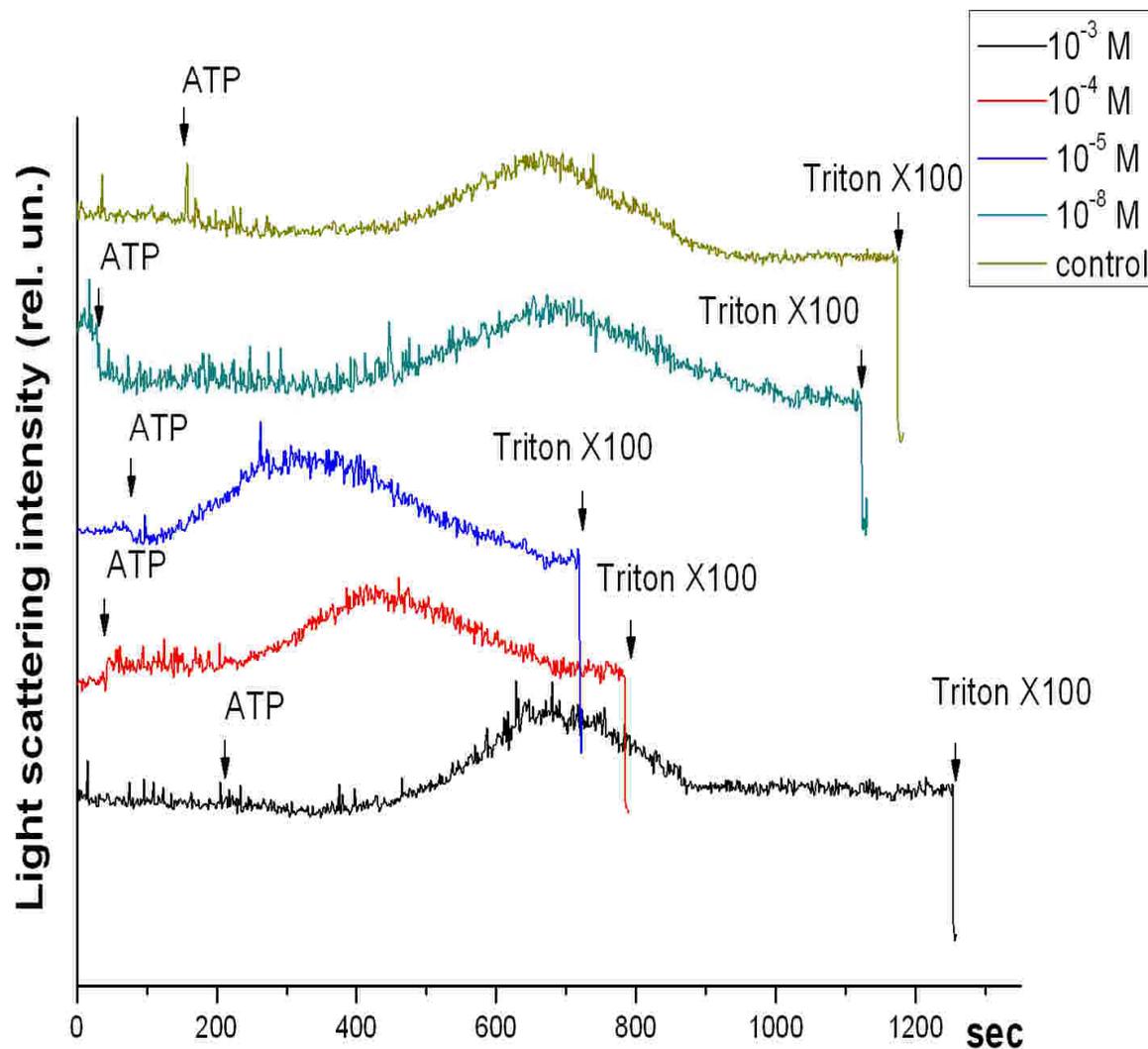
При концентрации  $10^{-12}$  М знак эффекта меняется для первого пика Р2Узависимый выход  $Ca^{2+}$  из ER.

Компенсаторный вход  $Ca^{2+}$  через CRAC повышением концентрации мелафена только ингибируется. Этот ответ более чувствителен к мелафену. Ингибируется при меньших концентрациях

Так  $10^{-7}$  М снижает на 50% первый ответ и на 70% - второй.  $10^{-4}$  М подавляет полностью передачу сигнала пуринзависимой  $Ca^{2+}$ -передачи – оба пика.

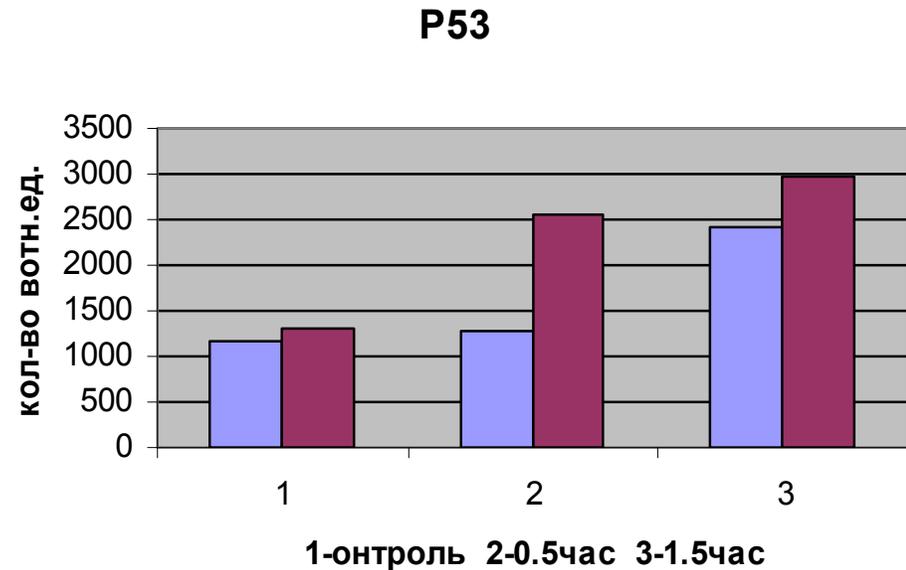
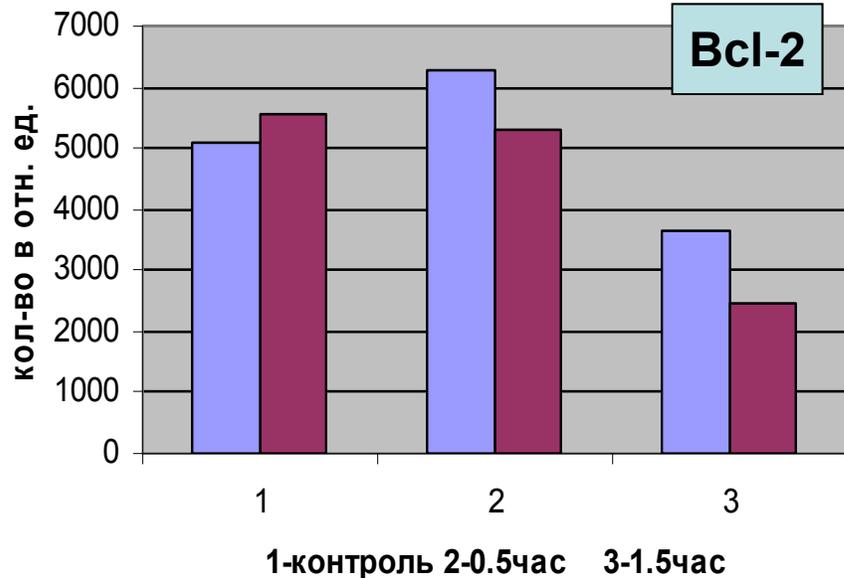
Суммируя полученные данные можно предположить, что Мелафена в концентрации не выше  $10^{-13}$  М будет приводить к наименьшим побочным эффектам.

# Влияние мелафена лаг-фазу освобождения $Ca^{2+}$ из внутриклеточных депо лимфоцитов



Добавки АТР к суспензии лимфоцитов вызывали освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо через активацию метаболитных  $P2Y$  пуриновых рецепторов (в среде измерения  $Ca^{2+}$  нет). Присутствие мелафена укорачивает время лаг фазы до развития ответа. Аналогично ведут себя клетки АКЭ, которые быстрее выходят в стабильный режим в присутствии мелафена. Влияние на канал-образующие  $P2X$  рецепторы предстоит выяснить.

методом иммуноблоттинга изучено влияние мелафена в низкой концентрации  $10^{-10}$  М на содержание белка регулятора р53 и антиапоптозного белка Bcl-2 в клетках АКЭ, в зависимости от времени воздействия.



увеличение количества белка р53 и снижение количества белка Bcl-2 через 1,5 часа после воздействия, в то время как через 0,5 часа существенных изменений не наблюдалось. По-видимому, наблюдаемые эффекты свидетельствуют о развитии апоптоза через 1.5 часа после воздействия мелафена *in vitro*.

# **ВЫВОДЫ:**

В работе представлена подборка методов для выявления механизмов действия на разных уровнях организации клетки при взаимодействии с биологически активными веществами в широком диапазоне концентраций ( $10^{-21}$  □  $10^{-3}$  М). В результате были показаны:

Изменения в структурной организации микродоменов в мультиламеллярных гигантских липосомах из индивидуального фосфолипида.

Отсутствие уширения бислоя и изменения расположения мультислоев в модельной мультиламеллярной липосоме из природной смеси фосфолипидов .

Отсутствие значимых изменений в структурной организации белок-липидных микродоменов в телях эритроцитов, являющихся адекватной моделью клеточной мембраны для большинства клеток.

Изменение структуры растворимого белка - сывороточного альбумина в присутствии Мелафена.

Морфологические изменения эритроцитов в присутствии Мелафена.

Концентрационные пределы подавления  $Ca^{2+}$ -сигнализации в клетках АКЭ в присутствии Мелафена.

Скорость вхождения в апоптоз клеток АКЭ в присутствии Мелафена.

Затормаживающий эффект на неконтролируемый рост клеток.

Представленная комплексная последовательность методов открывает новые возможности для тестирования препаратов, определения механизмов их действия на разных уровнях организации

→искусственная мембрана →изолированная клеточная мембрана →целая клетка→совокупность клеток →организм

и позволяет выявить потенциальные возможности для их применения и концентрационные ограничения.