

О. М. Алексеева, А. А. Кременцова, Л. С. Шибряева,
С. Ю. Софьина, Э. Р. Мухамедзянова, Г. Е. Заиков

ДЕЙСТВИЕ МЕЛАФЕНА НА ОБЪЕКТЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Ключевые слова: мелафен, липосомы, тени эритроцитов, ДСК, БСА.

Необходимость исследования влияния регулятора роста растений – мелафена, на объекты животного происхождения обусловлена все более нарастающим применением в сельском хозяйстве. Показано его значительное влияние на доменную организацию липидов в мембранах мультиламеллярных липосом, сформированных из ДМФХ, отсутствие эффектов в белок-липидных микродоменах в мембранах теней эритроцитов и изменение конформации водорастворимого белка. Подтверждается необходимость строгих концентрационных ограничений при применении мелафена.

Keywords: melafen, liposomes, ghost of erythrocytes, DSC, BSA.

We tested the action of Melafen in animal cells and its components under a wide range of concentrations (10^{-17} - 10^{-3}). The changes in structural organization of microdomains in multilamellar liposomes from individual phospholipid DMPC were found. The lipid phase in membrane is susceptible to Melafen influence. However in structural organization of protein-lipid microdomains - in erythrocyte ghosts, being by the adequate model of cell membrane for most of cells, significant effects were absent. The structural change of soluble protein – bovine serum albumin in the presence of large concentrations of Melafen (10^{-8} - 10^{-4} M) were found, the structure BSA was loosened. However, when we tested the influence of Melafen on the cell functioning, the concentration non-destructive interval was being narrowed. Changes are seen already at concentrations of 10^{-11} - 10^{-13} M.

Введение

Одним из БАВ, повышающим устойчивость растений к неблагоприятным условиям является мелафен – меламинавая соль бис (оксиметил)фосфиновой кислоты, синтезированная в ИОФХ им. А.Е. Арбузова [1]. Мелафен увеличивает стрессоустойчивость в условиях переохлаждения и засухи, усиливая эффективность энергетического обмена, при этом меняется жирнокислотный состав и микровязкость микросомальных и митохондриальных мембран в растительной клетке [2, 3].

В настоящей работе было продолжено исследование действия регулятора роста растений – мелафена, на объекты животного происхождения. Основной целью работы было обнаружение мишеней его воздействия и выяснение предельных концентраций, не повреждающих животные клетки. Для этого были отобраны модели, имитирующие наиболее вероятные мишени, и изучено воздействие мелафена на них в широком диапазоне концентраций (10^{-21} - 10^{-3} M).

Методика исследования

Используемые реактивы: ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин, БСА – бычий сывороточный альбумин (“Sigma”); NaCl, KCl, CaCl₂, KN₂PO₄, Na₂HPO₄.

Методы: Выделение эритроцитов и теней эритроцитов крыс линии Wistar проводили по методу [4, 5, 6]. Перед измерениями тени эритроцитов преинкубировали в течение 45 или 90 мин при 37°C с мелафеном или без него.

Для получения мультиламеллярных липосом 1 мг DMPC в мл растворяли в хлороформе, под аргоном высушивали до тонкой пленки на стенках колбы. Колбу помещали под вакуум на 12

часов для полного удаления растворителя. Затем добавляли 10мМ фосфатный буфер pH 7,4, 60 мин нагревали на водяной бане при температуре выше фазового перехода (45-50°C). Гидратировали на шейкере 30 мин при комнатной температуре. По данным электронной микроскопии полученные липосомы имеют мультиламеллярную структуру размером до 2000Å [7].

Термограммы плавления мембран липосом и теней эритроцитов регистрировали с помощью дифференциального адиабатного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (Россия) [4, 6, 8].

Флуоресцентные измерения растворов БСА в фосфатном буфере в присутствии и отсутствии мелафена проводили на спектрофлуориметре Perkin-Elmer-44В в области флуоресценции триптофанилов λ_{ex} .286 нм и λ_{em} .334 нм.

Результаты исследования

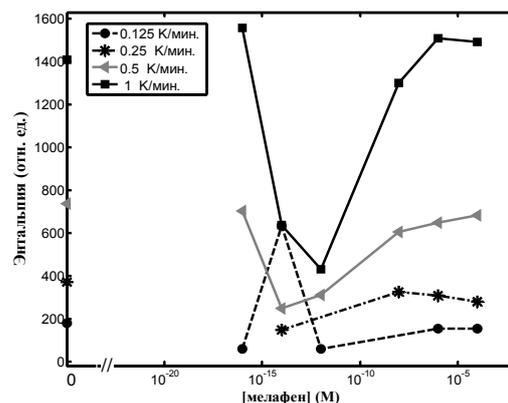
Структурные эффекты изучались на трех моделях: 1) липидная искусственная мембрана – мультиламеллярные липосомы, сформированные из индивидуального нейтрального фосфолипида – ДМФХ; 2) природная клеточная мембрана – тени эритроцитов; 3) растворимый белок – БСА.

Функциональные изменения тестировали в предыдущих работах на 2-х видах клеток: эритроцитах и клетках АКЭ [9, 10]. Обнаруженные изменения микровязкости мембран эритроцитов и угнетение Ca²⁺ сигнальной системы в клетках АКЭ указывают на восприимчивость организмов животного происхождения к мелафену в области больших и средних концентраций.

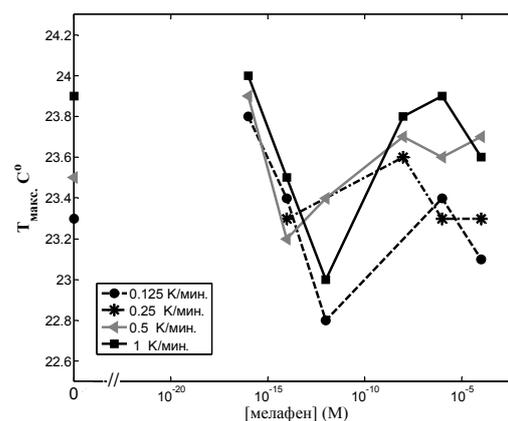
В настоящей работе методом ДСК, используя прием разной скорости подачи тепла к ячейке (1; 0,5; 0,25; 0,125 град./мин.), было выявлено, что липидные микродомены ДМФХ значительно изменяют свою организацию в

зависимости от присутствия мелафена в широком диапазоне концентраций. В предыдущих исследованиях методом ДСК при одной скорости подачи тепла к ячейке (1 град./мин.) изменения термодинамических параметров ДМФХ в присутствии мелафена были незначительны [10]. Разная скорость подачи тепла к ячейке с образцом сама по себе вызывает изменения организации микродоменов в контрольном образце мультисамельных липосом ДМФХ: при уменьшении скорости прогрева снижается величина энтальпии, падает температура максимума перехода, незначительно меняется полуширина полуперехода, являющаяся величиной, обратной кооперативности перехода. При высоких и сверхмалых концентрациях мелафена зависимость изменений термодинамических параметров ДМФХ от скорости прогрева были близки к контрольным. Однако в диапазоне малых и средних его концентраций (10^{-14} – 10^{-8} М) микродомены ДМФХ максимально изменяют свою организацию в зависимости от скорости прогрева (Рис.1А, Б, В). Это диапазон концентраций мелафена, который используется в сельском хозяйстве. Представленная модель хорошо иллюстрирует воздействие БАВ, применяемого для растительных объектов, на структуру мембраны, близкой к мембранам животного происхождения. Таким образом, единообразная липосомальная мембрана, сформированная из индивидуального нейтрального насыщенного фосфолипида, подвержена значительным структурным перестройкам в области средних и малых концентраций мелафена.

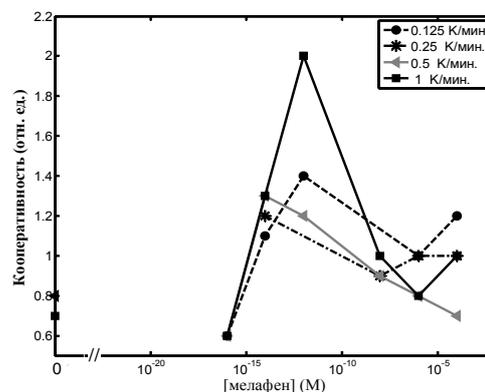
Помимо липидного бислоя наиболее уязвимыми структурными мишенями оказались водорастворимые белки. Тестирование действия мелафена на БСА по его собственной флуоресценции, имеющего в своем составе триптофаны заглубленные в белке и близкие к поверхности, было обнаружено значительное тушение триптофановой флуоресценции при 10^{-4} М и возгорание флуоресценции при 10^{-17} М - 10^{-10} М (Рис.2А, Б). Спектры излучения в значительной степени подобны, однако, при построении зависимости амплитуды в максимуме эмиссии триптофанов 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. Молекулы мелафена воздействуют на альбумин так, что в малых и сверхмалых концентрациях защищают триптофаны белка от тушения водой, а в больших - меняют конформацию белка таким образом, что и заглубленные триптофаны становятся более доступными для воды, на что указывает тушение флуоресценции. Происходит «разрыхление» структуры молекулы БСА. Т.е. неинтегральный незащищенный липидами мембраны белок подвер-



А



Б



В

Рис. 1 – Влияние мелафена на термодинамические характеристики мультисамельных липосом, сформированных из ДМФХ. Изменение (А) температуры максимума, (Б) энтальпии и (В) полуширины эндотермического полуперехода в термограммах при разной скорости подачи тепла к ячейке измерения в зависимости от концентрации мелафена

жен воздействию мелафена. Учитывая то, что мелафен гидрофильное вещество, можно предполагать, что водное окружение как около молекул БСА, так и около мембран липосом ДМФХ изменяется в зависимости от концентрации присутствующего в окружающем растворе мелафена.

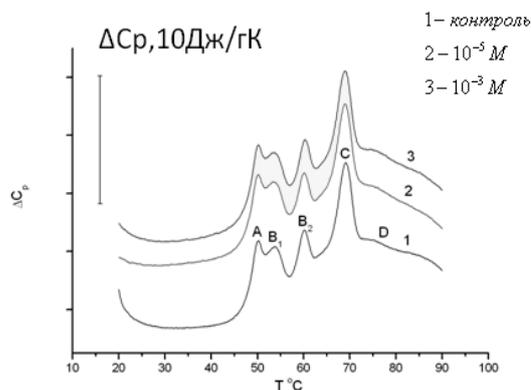
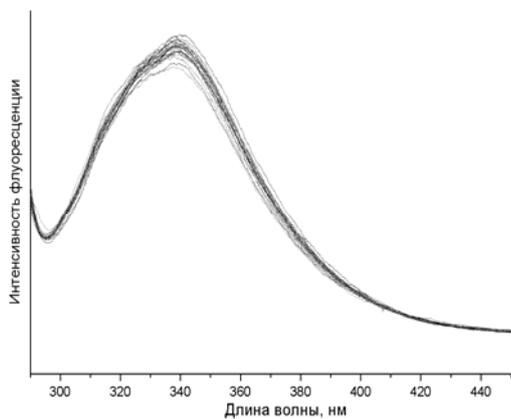


Рис. 3 – Влияние мелафена на организацию микродоменов (A, B₁, B₂, C, D) в тенях эритроцитов

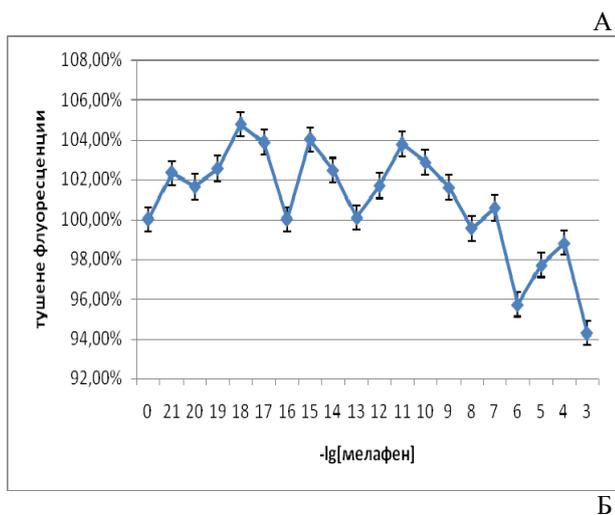


Рис. 2 – Влияние мелафена на флуоресценцию триптофанилов в БСА

Следующей структурной моделью, максимально из представленных моделей имитирующей клеточные мембраны животных, были тени эритроцитов. При стандартном ДСК тестировании термодинамических параметров теней эритроцитов влияние мелафена при больших концентрациях 10^{-5} - 10^{-2} М на белок-липидные микродомены было незначительным (Рис.3). При старении теней эритроцитов также не проявлялось воздействие больших концентраций вещества на структуру. Вероятно, белок-липидные мембранные структуры, в отличие от чисто липидных и чисто белковых, более устойчивы к воздействию мелафена. Остается необходимость дальнейших исследований влияния мелафена на белок-липидные домены в широком диапазоне концентраций, а также с использованием метода разной скорости подачи тепла к ячейке.

Исходя из настоящих и ранее полученных результатов [9, 10], можно заключить, что средние и малые концентрации мелафена изменяют структуру модельных объектов, имитирующих или являющимися объектами животного происхождения. Учитывая огромную разницу в строении клеточных оболочек, набора рецепторов в плазмалемме, метаболических путей и т.п. растительных и животных организмов, предлагается с большой осторожностью использовать БАВ, предназначенные для стимуляции растений, т.к. для животных организмов они могут играть угнетающую роль.

Литература

1. Фаттахов С.Г., Лосева А.И., Коновалов А.И., Резник В.С. и др. *ДАН* 2004. 394, 127-129.
2. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.И. и др. *ДАН* 2006. 409 (1), 123-125.
3. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Бурлакова Е.Б., Шугаев А.И. и др. *Биологические мембраны* 2008. 25 (2), 128-134.
4. Акоев В.Р., Щербинина С.П., Матвеев А.В., Тараховский Ю.С., Деев А.А., Шныров В.Л. *Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины*. 1997. 123 (3), 279-284.
5. Руденко С. В., Нипот Е.Е., Павлюк О.М. *Биохимия*. 1995. 60 (5) 723-733.
6. Yu.A.Kim, V.R. Akoev, A.V. Matveev, T.V. Belyaeva. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998. 1371, 284-294.
7. Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Васильева Н.А., Егорочкин М.А., Ким. Ю.А. *Биофизика* 2008. 53 (1), 78-83.
8. Privalov, P.L., Plotnikov, V.V. *Therm. Acta*. 1989. 139, 257-277.
9. Алексеева О.М., Ерохин В.Н., Кременцова А.В., Миль Е.М., Бинюков В.И., Фаттахов С.Г., Ким Ю.А., Семёнов В.А., Голощаров А.Н., Бурлакова Е.Б., Коновалов А.И. *ДАН* 2010. 431 (3), 408-410.
10. Алексеева О.М., Фаткуллина Л.Д., Ким Ю.А., Бурлакова Е.Б., Фаттахов С.Г., Голощаров А.Н., Коновалов А.И. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2009. 147 (6), 684-688.