

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ УСИЛЕНИЯ ОТВЕТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БИООБЪЕКТОВ *IN VITRO* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Алексеева О.М., Кременцова А.В., Голощапов А.Н.

Институт Биохимической физики РАН им. Н.М. Эмануэля. Россия, 119334, Москва,  
ул. Косыгина д. 4, (495)939-74-09, факс (499)137-41-01, [olgavek@yandex.ru](mailto:olgavek@yandex.ru)

Известно, что физиологически адекватные ответы биологических структур животного происхождения при воздействии биологически активных веществ (БАВ) во многих случаях недоступны для регистрации в связи с незначительным изменением параметров экспериментального объекта. Поэтому при работе *in vitro* с модельными биообъектами были подобраны условия для усиления ответа экспериментального биообъекта для получения регистрируемого результата. В качестве БАВ применяли синтетическое вещество мелафен (меламин бисфосфиновая кислота) - регулятор роста растений, и природный метилксантин кофеин. Как модельные объекты использовали липидные и белок-липидные мембраны, органеллы и клетки. Изучение влияния мелафена на структурные свойства биомембран было проведено с помощью подходов, направленных на усиление чувствительности экспериментальных биообъектов к воздействию. Влияние мелафена на структуру мембраны тестировали с помощью дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК). Липид-липидные взаимодействия под влиянием мелафена регистрировали при плавлении мультиламеллярных липосом из димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ). Варьирование скорости подачи тепла к образцам позволило усилить и выявить эффекты мелафена на перестройку микродоменной организации липидов в бислое. Действие мелафена на белок-белковые взаимодействия регистрировали на свежевыделенных и состаренных мембранах тений эритроцитов. При старении взаимосвязи компонентов цитоскелета ослабляются, и проявление эффектов действующего вещества усиливается. Для мелафена не выявлено деструктурирующего действия в белковых микродоменах тений. Влияние мелафена на целых клетках - эритроцитах тестировали, регистрируя спонтанный гемолиз и гемолиз при экстремальных условиях – в гипо- и гипертонических средах спектральным методом. Другой подход позволил зарегистрировать влияние кофеина, на активность  $Ca^{2+}$ -насоса - АТФ-азы, и  $Ca^{2+}$ -канала в органеллах - фрагментах саркоплазматического ретикулума (СР). Функциональные свойства органелл тестировали потенциометрически при гидролизе АТФ. Методический прием заключался в увеличении кальций аккумулялирующей способности СР. Краткосрочное старение органелл повышает проницаемость бислоя для анионов оксалата. Оксалат проникает в люмен СР и связывает  $Ca^{2+}$ . Постоянно снижая концентрацию свободного  $Ca^{2+}$  внутри СР, оксалат повышает способность поглощать  $Ca^{2+}$ , активируя АТФ-азу значительно выше физиологических значений. Результаты указывают на то, что структурные и функциональные свойства биообъектов меняются *in vitro* при исследовании действия БАВ в специальных методических условиях для получения регистрируемых ответов.