

На правах рукописи

Соколов Алексей Владимирович

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТОВ ЗРИТЕЛЬНОГО ЦИКЛА НА  
БИСЛОЙНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

Специальность 03.00.02 – «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2009

Работа выполнена на кафедре Биофизики Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и в лаборатории биоэлектрохимии Института Физической Химии и Электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН.

**Научные руководители:**

кандидат физико-математических наук,

ведущий научный сотрудник

В.С. Соколов

член-корреспондент РАН, доктор химических наук,

профессор

Ю.А. Чизмаджев

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор

Ю.Н. Антоненко

кандидат химических наук

А.В. Лебедев

**Ведущая организация**

Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН

Защита диссертации состоится 9 апреля 2009 г. в 14 час. 00 мин. на заседании Диссертационного совета Д.501.001.96 Биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Воробьевы горы, МГУ, Биологический факультет, кафедра Биофизики, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В.Ломоносова

Автореферат разослан «6» марта 2009 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор биологических наук, профессор

Т.Е. Кренделева

**Актуальность проблемы.** В настоящее время стремительно растет количество людей, страдающих заболеваниями зрения, обусловленными нарушениями цикла зрительного родопсина (называемого также зрительным циклом) и накоплением его побочных продуктов в сетчатке глаза. Под зрительным циклом подразумевается последовательность биохимических реакций, в ходе которой молекула родопсина, основного светочувствительного белка сетчатки глаза человека, восстанавливает свою способность к фоторецепции после поглощения кванта света. В результате фотолиза родопсина его хромофорная группа, 11-*цис*-ретиналь, изомеризуется в полностью-*транс*-ретиналь (далее сокращенно обозначается «ретиналь», либо «ATR»), отсоединяется от белковой части молекулы и оказывается в свободном состоянии в мембране диска фоторецепторной клетки. При нормальном функционировании зрительного цикла свободный ретиналь сразу же восстанавливается до ретинола, транспортируется в клетки пигментного эпителия сетчатки, там снова превращается в 11-*цис*-ретиналь и возвращается обратно в фоторецепторную клетку для соединения с молекулой родопсина.

В патологических ситуациях механизм удаления ретиналя из фоторецепторной мембраны нарушается, и он может накапливаться в липидном бислое. Там он способен связываться с одним из мембранных фосфолипидов – фосфатидилэтанололамином, образуя сначала N-ретинилиден-этанолламин, а затем – бис-ретинилиден-этанолламин (A2E). В конечном итоге это приводит к гибели клеток и развитию возрастной дегенерации сетчатки глаза, болезни Штаргардта, различных ретинопатий и других опасных заболеваний зрения. Помимо этого, A2E и другие продукты взаимодействия ретиналя с белками и липидами мембран дисков фоторецепторных клеток в ходе их обновления фагоцитируются клетками пигментного эпителия сетчатки, но перерабатываются лишь частично и накапливаются в виде гранул так называемого «пигмента старости», или липофусцина.

Известно, что гибель клеток в ходе развития заболеваний сетчатки в первую очередь обусловлена разрушением их мембран. По этой причине наибольший интерес представляют исследования воздействия ретиналя и компонентов липофусцина на биологические мембраны в темновых условиях и при освещении.

Полученные на сегодняшний день данные о воздействии продуктов зрительного цикла на мембраны в большинстве своем носят качественный характер и свидетельствуют, как правило, только о наличии деструктивного эффекта и гибели клеток сетчатки. В то же время, механизмы разрушения мембран можно изучать на модельной системе. Наиболее удобной моделью является бислоенная липидная мембрана (БЛМ). Преимущество такой системы – контролируемый состав и набор методов, позволяющих изучать физические механизмы разрушения, что и составило предмет данной работы.

**Цель и основные задачи исследования.** Целью работы было исследование физических механизмов воздействия A2E и полностью-*транс*-ретиналя на свойства бислоенных липидных мембран. Были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить влияние А2Е на стабильность и физические свойства мембран различного липидного состава в темновых условиях
2. Изучить воздействие ретиналя на электростатические и механические свойства мембраны. Сравнить влияние ретиналя и А2Е на распределение электрического поля внутри БЛМ и ее структурные свойства.
3. Изучить фотодинамическое разрушение мембран под действием ретиналя и А2Е и влияние на эти процессы липидного состава мембраны.
4. Изучить механизм фотодинамического воздействия А2Е и ретиналя на мембранные белки на примере встроенного в БЛМ грамицидинового канала.
5. Изучить способность ретиналя к автоокислению по изменениям в его спектре поглощения, возникающим при облучении видимым светом, в водном растворе и в липосомах различного липидного состава.

**Научная новизна.** В данной работе впервые используется БЛМ как модель биологической мембраны для исследования воздействия побочных продуктов зрительного цикла на липидный бислои. Ранее исследования токсичности этих соединений проводились только на живых клетках, либо изучались их фотохимические свойства в различных растворителях, и только в нескольких работах были получены данные об их воздействии на липосомы.

Впервые было изучено влияние А2Е на стабильность мембран методом электрического пробоя, что позволило количественно оценить изменение таких параметров, как поверхностное натяжение мембраны, линейное натяжение спонтанно образующихся пор, количество дефектов и скорость изменения радиуса дефекта при наличии в составе мембраны бис-ретинилиден-этанолamina.

Впервые было измерено изменение граничного потенциала, возникающего на БЛМ при встраивании в нее ретиналя, и проведено сравнение влияния А2Е и ретиналя на профиль распределения электрического поля в мембране.

Впервые было показано влияние липидного состава мембраны на количество ретиналя, накапливающегося в БЛМ, а также на его патогенное воздействие на мембрану.

Используемый в работе метод фотоинактивации грамицидинового канала использован впервые для исследования фотореакционной способности А2Е и ретиналя.

**Достоверность результатов.** Достоверность результатов работы и обоснованность выводов обеспечивается тем, что использованные методики и модели успешно использовались ранее для исследования свойств БЛМ и воздействия на них различных биологически активных веществ – ионофоров, фотосенсибилизаторов, липофильных ионов.

Теория необратимого электрического пробоя БЛМ, взятая за основу для оценки влияния А2Е на микроскопические структурные параметры мембраны, была разработана еще в 80-е годы и неоднократно проверялась экспериментально в нашей и других лабораториях.

Применяемый в работе метод фотоинактивации грамицидинового канала успешно применялся ранее в лаборатории, возглавляемой Ю.Н.Антоненко, в

исследованиях активности фотосенсибилизаторов и кинетики формирования самих каналов.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты данного исследования важны для понимания механизмов воздействия ретиналя и А2Е на мембраны клеток сетчатки. Полученная новая информация о процессах, лежащих в основе гибели клеток и патогенеза заболеваний зрения, может быть использована для поиска более эффективных способов их профилактики и лечения. Разработанные в ходе выполнения работы методики при исследовании деструктивного воздействия ретиналя и А2Е могут быть полезны в дальнейшем для изучения взаимодействия других соединений с БЛМ.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на VIII Международном Фрумкинском Симпозиуме (Москва, 2005), 15 Международном Конгрессе Европейского Биофизического Общества (Montpellier, 2005), III Съезде Биофизиков России (Воронеж, 2004), семинарах кафедры Биофизики Биологического факультета МГУ (Москва, 2004, 2005, 2007), семинарах лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ им. Фрумкина РАН (Москва, 2006) и на Конференции Молодых Ученых в ИФХЭ им. Фрумкина РАН (Москва, 2007).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них три статьи в российских и зарубежных журналах (из списка ВАК).

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), полученных результатов с их обсуждением (главы 3 и 4), выводов и списка цитируемой литературы из \_\_ наименований. Работа изложена на \_\_ страницах, иллюстрирована \_\_ рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Введение**

Рассмотрена актуальность выбранной темы, кратко описан объект и перечислены основные методы исследования, обоснованы научная новизна работы, достоверность результатов и выводов, а также теоретическая и практическая значимость.

### **Глава 1. Обзор литературы**

В первой части литературного обзора (раздел 1.1) кратко изложены сведения о строении зрительной системы, ее функциональных и структурных элементах и о структуре основного фоторецепторного белка человека – зрительного родопсина, расположенного в мембранах дисков наружного сегмента светочувствительных клеток. Описана структура родопсина (белковой части родопсина, лишённой ретиналя), выделенного из наружных сегментов палочек быка.

Далее приведено описание последовательности фотохимических процессов, происходящих в зрительном родопсине в результате поглощения кванта света, кратко описаны конформационные перестройки белковой части родопсина и

процесс фототрансдукции, который представляет собой каскад ферментативных реакций, обеспечивающих усиление первичного светового сигнала в  $10^5$ – $10^6$  раз.

Вторая часть обзора (раздел 1.2) посвящена описанию цикла зрительного родопсина и путей образования его побочных продуктов, один из которых, бис-ретинилиден-этаноламин (A2E), является объектом исследования в данной работе. Описан процесс накопления липофусцина в клетках зрительного эпителия. Кратко охарактеризованы другие компоненты липофусцина, являющиеся, как и A2E, производными ретиналя.

В третьей части литературного обзора (раздел 1.3) приведены имеющиеся на сегодняшний день данные о возможных механизмах патогенного воздействия продуктов зрительного цикла на сетчатку. Рассмотрены результаты работ по изучению свойств ретиналя как фотосенсибилизатора, его способности генерировать активные формы кислорода и оказывать фотоокислительное воздействие на ненасыщенные липиды и некоторые белки.

В завершение обзора (раздел 1.4) формулируется основная цель работы - изучение механизмов воздействия A2E и ретиналя на мембраны и встроенные в них полипептиды. Выбор задачи исследования обусловлен тем, что предполагаемые механизмы развития заболеваний зрения, сопровождающихся появлением в фоторецепторных клетках полностью-*транс*-ретиналя и A2E, во многом связаны с их разрушительным воздействием на мембраны клеток. В качестве объекта предлагается бислойная липидная мембрана как модель биологической мембраны. Описаны основные преимущества этого объекта для решения проблемы патогенного воздействия ретиналя и A2E, а также проведенные ранее исследования электростатических изменений, возникающих в липидном бислое под действием биологически активных веществ. Перечислены задачи, которые представляется возможным решить с помощью электрических измерений на БЛМ.

## Глава 2. Материалы и методы

**Формирование БЛМ.** Искусственные бислойные липидные мембраны формировались по методике Мюллера-Рудина (Mueller, 1963). Для получения БЛМ применяют ячейку из инертного гидрофобного материала (тефлон), разделенную перегородкой на две равные по объему камеры, в которые добавляется буферный раствор. Бислойная мембрана формируется на круглом отверстии (диаметр 0.8 мм) в центре перегородки, которое предварительно смачивается мембранообразующей смесью и высушивается для увеличения гидрофобности. После этого отсеки ячейки заполняются буфером, а на отверстие в перегородке наносят каплю мембранообразующей смеси. Под действием расклинивающего давления формируется липидный бислой, в то время как растворитель (декан) вытесняется к краям отверстия – уходит в «мениск».

В каждом из отсеков находился хлорсеребряный электрод, контактирующий с буферным раствором через солевые мостики, изготовленные из наконечников для микропипеток. Нижнюю часть наконечника заполняли агаром, приготовленным с 0,1 М КСl, а сверху наливали водный раствор 0,1 М КСl, в который погружали электрод. Сопротивление электродов с мостиками составляло не более 40 – 50 кОм. К одному электроду подключали генератор переменного пилообразного напряжения (выход ЦАП платы L780, Lcard, Россия), а ко второму - усилитель тока Keithley-427 (США), выход которого связан со входом АЦП той же платы. Для контроля формирования БЛМ измеряли ее емкость. Емкость рассчитывалась компьютерной программой как отношение амплитуды скачка тока к скорости изменения приложенного к мембране потенциала, а проводимость – как наклон вольт-амперной характеристики в точке нулевого напряжения. Типичные значения емкости БЛМ в экспериментах составляли 1,5-2,5 нФ.

Буферный раствор готовили на дважды дистиллированной воде из КСl (х.ч. «Реанал», Россия) и НЕРЕС («Calbiochem», США). В работе использовали буфер следующего состава: 10 мМ КСl, 1 мМ НЕРЕС, рН 7,5. Для подведения рН использовали КОН (х.ч., «Реанал»). Препараты А2Е были синтезированы и очищены в Институте Биохимической Физики РАН с помощью методов, описанных в работе (Parish, 1998).

Для формирования мембраны использовались дифитаноилфосфатидилхолин (DPhPC) диолеилфосфатидилхолин (DOPC), кардиолипин (CL), дифитаноилфосфатидилэтаноламин (DPhPE) и дифитаноилфосфатидилсерин (DPhPS), растворенные в декане в различных концентрациях (15-40 мг/мл).

**Встраивание А2Е в БЛМ.** А2Е встраивали в мембрану двумя различными способами. В экспериментах по изучению детергентного эффекта А2Е (электрический пробой, измерение поверхностного натяжения) его вводили непосредственно в мембранообразующую смесь в концентрации 5-10 мольных процентов от общего количества липидов. Во всех остальных опытах (опыты с фотоэффектами) спиртовой раствор А2Е добавляли в водный раствор с одной стороны БЛМ– противоположный по отношению к источнику света. После этого наблюдали за процессом адсорбции по изменению разности граничных потенциалов, измеряемой методом КВП. Адсорбция А2Е на мембране длилась в среднем 40-60 минут в условиях непрерывного перемешивания водного раствора в отсеках ячейки. Второй способ (добавление в водный раствор) оказался гораздо более эффективным, поскольку позволял встроить пигмент в мембрану в значительно более высокой концентрации, чем при его предварительном добавлении в мембранообразующую смесь.

**Встраивание ретиналя в БЛМ.** Проникновение ретиналя в БЛМ регистрировали по изменению либо проводимости бислоя в присутствии ионофоров, либо по разности граничных потенциалов методом компенсации внутримембранного поля (КВП). В первом случае проводимость БЛМ индуцировалась нонактином (N), который является переносчиком катионов, или пентахлорфенолом (PCP), переносящим анионы. В этих опытах ионофоры добавлялись симметрично в оба отсека ячейки. Концентрации нонактина и

пентахлорфенола в водном растворе составляли по 50 мкМ. В опытах с ионофорами ретиналь добавлялся симметрично в оба отсека ячейки. В экспериментах по наблюдению фотоэффектов и изменений разности граничных потенциалов его добавляли только в *цис*-отсек ячейки.

### **Методы изучения фотодинамического воздействия ретиналя и А2Е.**

Бислойная липидная мембрана освещалась через прозрачное окошко ячейки с помощью ртутной лампы видимого света мощностью 250 Вт. Ее свет проходил через водный тепловой фильтр и стеклянный светофильтр СЗС-20, ограничивающий спектр синей областью (ниже 550 нм). С помощью линзы свет фокусировался на отверстии тефлоновой ячейки. Интенсивность освещения БЛМ, измеренная с помощью калориметра РТН-31С, составляла 340 Вт/м<sup>2</sup>. Опыты по фотоинактивации грамицидина проводились по той же методике, что и в работах с другими фотосенсибилизаторами (Рокицкая, 1993, 1996). В оба отсека ячейки добавлялся грамицидин А (“Sigma-Aldrich Corp.”, США) так, чтобы его концентрация в ячейке составляла 10<sup>-10</sup> М. В опытах с тушителем синглетного кислорода в оба отсека добавлялся водный раствор азиды натрия NaN<sub>3</sub> (“Sigma-Aldrich Corp.”). Концентрация азиды в ячейке составляла 20 мМ. Супероксиддисмутаза (Cu-Zn, лиофилизированный порошок, “Sigma-Aldrich Corp.”) добавлялась тоже в оба отсека ячейки, так что ее концентрация в буферном растворе составляла 0.25 мг/мл. Флорицин, в отличие от грамицидина, добавляли асимметрично, либо в *цис*-, либо в *транс*-отсек, и в течение 40-60 минут перед началом освещения наблюдали за его адсорбцией по изменению разности граничных потенциалов, измеряемой методом КВП.

### **Метод компенсации внутримембранного поля по амплитуде второй гармоники (КВП)**

основан на способности мембран сжиматься в электрическом поле, тем самым увеличивая свою емкость (Соколов, 1980). Минимальное значение емкости наступает, когда электрическое поле внутри мембраны равно нулю, поэтому напряжение, при котором оно достигается, равно разности граничных потенциалов БЛМ. К мембране прикладывали сумму синусоидального (с выхода генератора ГЗ-118, Россия) и постоянного напряжений. Величина постоянного напряжения автоматически подбирается такой, чтобы достичь минимального значения емкости мембраны. Момент, когда мембрана достигает минимальной емкости, регистрируется по отсутствию второй гармоники емкостного тока. Регулирование постоянного напряжения, обеспечивающего нулевую амплитуду сигнала второй гармоники, осуществляется автоматически с помощью обратной связи. Для этого вторая гармоника емкостного тока с выхода преобразователя ток-напряжение (Keithley-427, США) усиливается селективным усилителем (Ф582, Россия) и подается на плату АЦП (L-card), встроенную в компьютер.

Программа, разработанная в лаборатории биоэлектрохимии, осуществляет синхронное детектирование сигнала второй гармоники, превращая переменное напряжение в постоянное, которое подается на мембрану в сумме с синусоидальным напряжением, замыкая петлю отрицательной обратной связи. В результате наступает устойчивое равновесие, при котором амплитуда второй гармоники поддерживается равной нулю. Соответствующая этому условию



постоянная составляющая напряжения на мембране, равная разности граничных потенциалов, непрерывно регистрируется и записывается в память компьютера.

### **Эксперименты на липосомах. Получение спектров поглощения ретиналя.**

Липосомы изготавливались из тех же липидов, которые использовали для формирования БЛМ – DPhPC и DOPC. Липид растворяли в хлороформе (10 мг/мл), который после растворения высушивали в пробирке под струей аргона, так чтобы липид оставался в виде тонкого слоя на ее стенках. Пробирку интенсивно встряхивали с буферным раствором (10 mM KCl, 1 mM HEPES, pH 7.5, 1 мг сухой массы липида на 1 мл буфера) в течение 5-10 минут для получения взвеси мультиламеллярных липосом. После встряхивания полученную суспензию 19 раз пропускали через экструдер “LiposoFast” (Avestin Inc., Канада) с диаметром фильтра 100 нм для получения суспензии моноламеллярных липосом, которую впоследствии разбавляли еще в 200 раз для снятия спектров поглощения.

Для получения спектров использовали флюориметр «Флюорат 02 Панорама» («Люмэкс», Россия), работающий в режиме снятия спектров поглощения и подключенный к компьютеру. В кварцевую кювету наливали 1 мл буферного раствора, снимали спектр его поглощения (нулевую линию), после чего вместо буферного раствора ту же кювету заполняли суспензией липосом, в которую впоследствии добавляли 1-5 мкл спиртового раствора ретиналя (конечная концентрация ретиналя в кювете составляла 16 мкМ в буфере). Нулевая линия (спектр поглощения исходного буферного раствора без добавок) вычиталась из полученного спектра ретиналя с липосомами. Для освещения кюветы использовали ту же ртутную лампу, что и при наблюдении фотоэффектов в опытах с БЛМ.

## **Глава 3. Изучение воздействия бис-ретинолиден-этанолamina на бислойные липидные мембраны.**

### **3.1 Детергентное воздействие А2Е на БЛМ.**

Целью первого этапа работы было исследование механизма «детергентного» (темнового) воздействия А2Е на бислойные липидные мембраны различного липидного состава. В первую очередь было исследовано влияние бис-ретинолиден-этанолamina на время жизни мембран во внешнем электрическом поле. К БЛМ прикладывалось постоянное напряжение и измерялся ток через мембрану (рис.1). Момент лавинообразного увеличения тока свидетельствовал о разрушении мембраны в результате ее электрического пробоя. Время жизни БЛМ измерялось с момента включения напряжения до момента ее разрушения, и строилась зависимость среднего времени жизни либо десятичного логарифма среднего времени жизни, от приложенного напряжения (каждая точка – результат усреднения по 5-10 измерениям),.

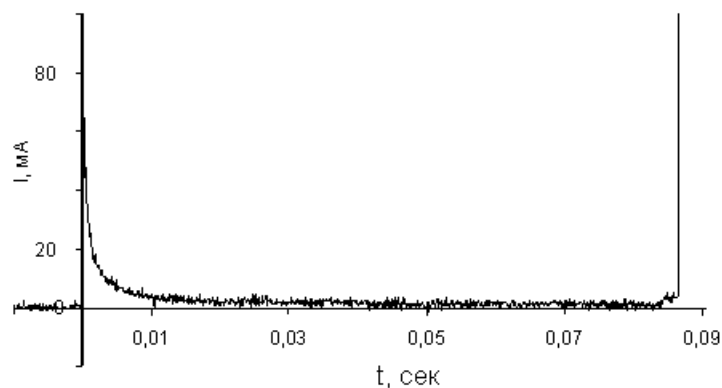


Рис.1. Зависимость величины регистрируемого тока от времени (данная кривая была получена для мембраны из DPhPC), находящейся в постоянном электрическом поле. Лавинообразное увеличение тока свидетельствует об электрическом пробое БЛМ.

Была получена зависимость среднего времени жизни мембран, сформированных из насыщенного незаряженного липида DPhPC (рис.2а) и из ненасыщенного незаряженного липида DOPC от приложенного напряжения (рис.2б), без А2Е (кривая 1) и в его присутствии (кривая 2). Бис-ретинилиден-этаноламин добавлялся предварительно в раствор липида в декане, так что мольная доля пигмента от общего количества липида составляла 5%.

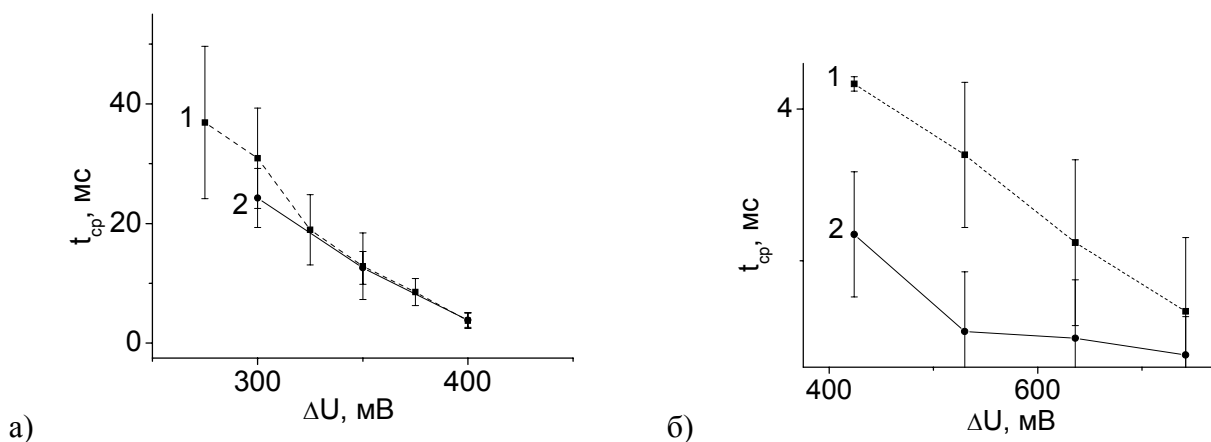


Рис.2. Зависимость среднего времени жизни БЛМ, сформированных из DPhPC (а) либо DOPC (б), в отсутствие А2Е (контрольная кривая 1) и после предварительного добавления 5% А2Е в мембранообразующую смесь.

Из полученных кривых видно, что присутствие А2Е не вызывало уменьшения стабильности мембран, сформированных из DPhPC, и приводило лишь к незначительному уменьшению времени жизни мембран из DOPC.

Аналогичные измерения проводились и со смесью заряженных липидов, близкой по составу к мембранам дисков наружного сегмента - DPhPC/DPhPE/DPhPS (липиды в массовом соотношении 45:45:10). На рис.3а приведены зависимости десятичного логарифма среднего времени жизни мембран от приложенного напряжения, построенные при разной концентрации А2Е в мембранообразующей смеси - 0%:, 5% и 10% по массе от общего количества липидов.

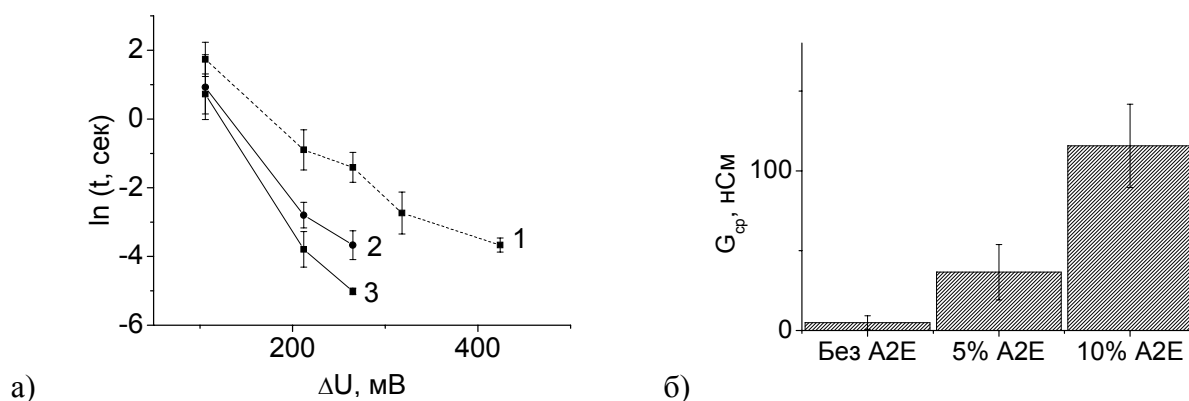


Рис.3. Детергентное воздействие А2Е на мембраны, содержащие фосфатидилсерин

а) Зависимость логарифма среднего времени жизни БЛМ, сформированных из смеси липидов DPhPC/DPhPE/DPhPS в весовом соотношении 45:45:10, от приложенного напряжения. Кривая 1 – контроль (без А2Е), кривая 2 – 5% А2Е, кривая 3 – 10% А2Е

б) Проводимости БЛМ, сформированных из DPhPC/DPhPE/DPhPS (45:45:10) с разным количеством А2Е. Каждый столбец иллюстрирует среднюю проводимость по 15-20 мембранам. В качестве погрешности взята стандартная ошибка. Различные столбцы соответствуют разному количеству А2Е, добавленного в раствор липидов: «Контроль» (без А2Е); «5% А2Е» – мольная доля А2Е в липидной смеси 5%; «10% А2Е» – мольная доля А2Е в липидной смеси 10 %.

Было обнаружено значительное (на 1-2 порядка) уменьшение времени жизни БЛМ, сформированных из смеси DPhPC/DPhPE/DPhPS, которое зависело от количества введенного в мембрану пигмента. Обнаруженное детергентное воздействие А2Е на мембраны такого состава, предположительно, обусловлено электростатическим взаимодействием его положительно заряженных молекул с отрицательно заряженными молекулами фосфатидилсерина. В результате такого взаимодействия может образоваться комплекс А2Е с DPhPS, дестабилизирующий мембрану. Поскольку в мембранах клеток зрительного эпителия фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин содержатся примерно в таком же соотношении (45:45:10), естественно предположить, что А2Е может оказывать детергентное воздействие и на эти мембраны.

Метод электрического пробоя позволяет не только зафиксировать уменьшение стабильности БЛМ, но и выяснить, на какие именно физические параметры бислоя воздействует встроенный в него А2Е. Для этого зависимость среднего времени жизни БЛМ от приложенного натяжения, полученная экспериментально для смеси DPhPC/DPhPE/DPhPS, была аппроксимирована теоретической функцией зависимости среднего времени жизни мембраны от приложенного напряжения (Чизмаджев и др., 1982):

$$t_{cp} = \frac{(kT)^{3/2}}{4\pi\epsilon_0 A_m D\gamma(\sigma + \frac{CU^2}{2})^{1/2}} \exp\left[\frac{\pi\gamma^2}{kT(\sigma + \frac{CU^2}{2})}\right] \quad (1)$$

Зависимость среднего времени жизни мембраны  $t_{cp}$  от приложенного напряжения  $U$  определяется несколькими параметрами: поверхностным натяжением  $\sigma$ , линейным натяжением спонтанно образующихся пор  $\gamma$ , площадью мембраны  $A_m$  (которая считается постоянной), концентрацией дефектов на единицу площади  $c_0$  и скоростью изменения радиуса дефекта (коэффициент диффузии поры  $D$  в пространстве радиусов). Поверхностное натяжение мембраны  $\sigma$  было измерено с помощью метода выдувания (Benz, 1975) и составило  $4.1 \pm 0.5$  эрг/м<sup>2</sup> и  $3.5 \pm 0.5$  эрг/м<sup>2</sup> для мембран в отсутствие А2Е и в присутствии 10% А2Е, соответственно. Экспериментальные кривые аппроксимировали теоретическими по формуле (1), подбирая значения двух параметров - линейного натяжения поры  $\gamma$  и произведения  $C_0 A_m D$ . Результаты представлены в *таблице 1*.

	$\gamma$ , Н	$C_0 A_m D$ , м <sup>2</sup> /сек
Контроль	$(6,5 \pm 0,13) \times 10^{-12}$	$(5,7 \pm 1,52) \times 10^{-18}$
5% А2Е	$(7,1 \pm 1,37) \times 10^{-12}$	$(1,4 \pm 0,47) \times 10^{-16}$
10% А2Е	$(8,0 \pm 0,83) \times 10^{-12}$	$(1,3 \pm 0,31) \times 10^{-15}$

Таблица 1. Рассчитанные значения параметров  $\gamma$  (линейное натяжение спонтанно образующихся пор) и  $C_0 A_m D$  (произведение общего количества дефектов в мембране на коэффициент диффузии дефекта в пространстве радиусов) для мембраны, сформированной из смеси липидов DPhPC:DPhPE:DPhPS с добавлением А2Е: 0 (контроль), 5 и 10 % от общей массы липидов.

Из значений параметров, полученных в результате аппроксимации, следует, что при увеличении количества А2Е в мембране происходит незначительное увеличение линейного натяжения спонтанно образующихся пор (левая колонка в *табл. 1*) и гораздо более значительное (на 2-3 порядка) увеличение количества дефектов либо коэффициента их диффузии в пространстве радиусов (правая колонка в *табл. 1*).

Помимо уменьшения времени жизни, было обнаружено, что мембраны из смеси DPhPC/DPhPE/DPhPS, содержащие А2Е, обладают значительно более высокой проводимостью по сравнению с контрольными «чистыми» мембранами. На *рис.3б* показаны средние стационарные проводимости БЛМ, которые достигались через 10-15 минут после их формирования. Увеличение проводимости зависело от мольной доли А2Е в смеси липидов, используемой для формирования БЛМ. Так, средняя проводимость мембран, содержащих 10% А2Е, составила около 110 нСм, а с 5% А2Е в мембранообразующей смеси – только 30 нСм. Проводимость «чистых» мембран, не содержащих А2Е, не превышала 5 нСм. Проводимость мембран, сформированных из незаряженных липидов (DPhPC либо DOPC), не зависела от наличия в составе мембраны А2Е и не превышала 20-30 нСм (не показано на рисунке). Обнаруженное увеличение интегральной проводимости БЛМ в присутствии А2Е подтверждает гипотезу об увеличении числа спонтанно образующихся пор, предложенную выше.

Таким образом, было показано, что нарушение стабильности мембран в темноте в присутствии А2Е сильно зависит от их липидного состава. При этом решающую роль играет наличие в мембране липидов с отрицательно заряженными полярными группами. Это подтверждает полученные в других работах данные об увеличении детергентного эффекта А2Е при наличии в составе мембраны фосфатидилсерина (De, 2002). В соответствии с теорией электрического пробоя БЛМ, уменьшение времени жизни при наличии в мембране А2Е обусловлено локальными искривлениями бислоя, которые в конечном итоге приводят к увеличению вероятности появления в мембране спонтанно образующихся пор и росту скорости изменения их радиуса.

### 3.2. Фотодинамическое воздействие А2Е на мембраны и встроенные в них полипептиды

#### 3.2.1. Фотодеструктивное воздействие А2Е на мембраны

С целью изучения фотодинамического воздействия А2Е на БЛМ, измеряли ее время жизни в темноте и при освещении. Встраивание А2Е и эксперименты по измерению времени жизни проводилось в условиях компенсации внутримембранного поля (КВП). Это позволило не только исключить возможность пробоя мембраны под действием внутримембранного поля, улучшив тем самым воспроизводимость измерений, но и контролировать изменения граничного потенциала (а значит, и процесс адсорбции А2Е) на протяжении всего эксперимента.

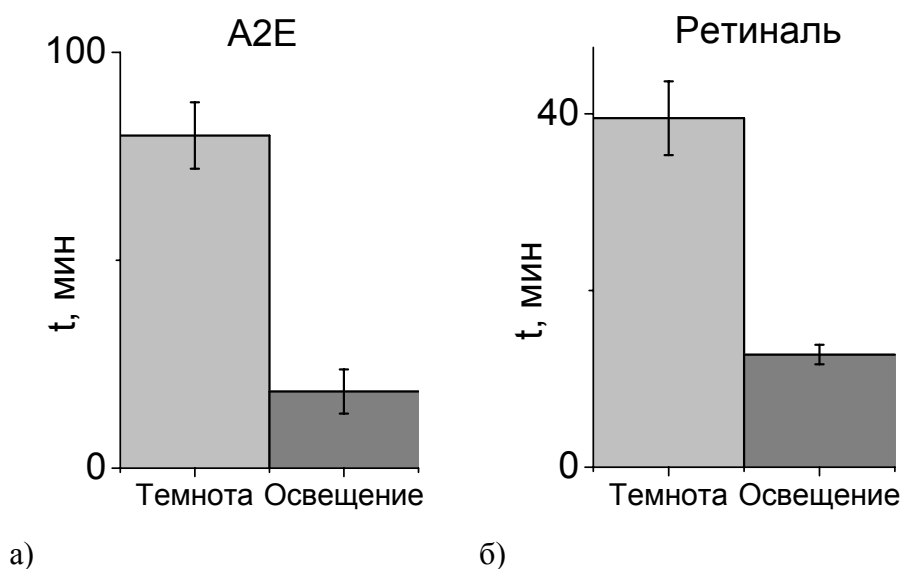


Рис.5. Средние времена жизни мембран, сформированных из DOPC, в присутствии А2Е (а) и ретиналя (б), в темновых условиях («темнота») и при освещении видимым светом («освещение»)

После формирования БЛМ из DPhPC либо DOPC в декане, в один из отсеков добавляли спиртовой раствор А2Е (начальная концентрация А2Е в ячейке – 4 мкМ). Достижение разности граничных потенциалов стационарного уровня (60-80 мВ) свидетельствовало об окончании адсорбции А2Е. Мембраны, сформированные из DPhPC, практически не разрушались в присутствии А2Е ни

в темноте, ни при освещении – их время жизни всегда составляло более 2 часов и не зависело от добавления пигмента (не показано на рисунках). В случае DOPC время жизни мембраны с А2Е при освещении значительно уменьшалось. Если в отсутствие освещения время жизни таких БЛМ составило в среднем около 80 минут, то при освещении видимым светом – 18 минут (*рис.5а*), то есть в 4 раза меньше. В отсутствие А2Е время жизни мембран из DOPC от освещения не зависело (на рисунках не показано). Обнаруженное уменьшение стабильности мембран, сформированных из ненасыщенных липидов, в присутствии А2Е при освещении согласуется с существующими литературными данными о фототоксичности компонентов липофусцина (Sparrow, 2000; Sparrow, 2002). Таким образом, А2Е может проявлять свойства слабого фотосенсибилизатора, вызывая фотоокисление двойных связей углеводородных «хвостов» DOPC в составе БЛМ.

### 3.2.2. Фотоинактивация встроенных в БЛМ грамицидиновых каналов в присутствии А2Е

Грамицидин А является удобной моделью мембранного белка (ионного канала), подвергающегося разрушению (инактивации) при освещении в присутствии фотосенсибилизаторов (Rokitskaya, 1993). В данной части работы было проведено исследование фотодеструктивного воздействия А2Е на грамицидиновый канал, встроенный в БЛМ. Это позволило количественно оценить эффективность этого воздействия на грамицидин, который в данном исследовании может служить моделью мембранных белков.

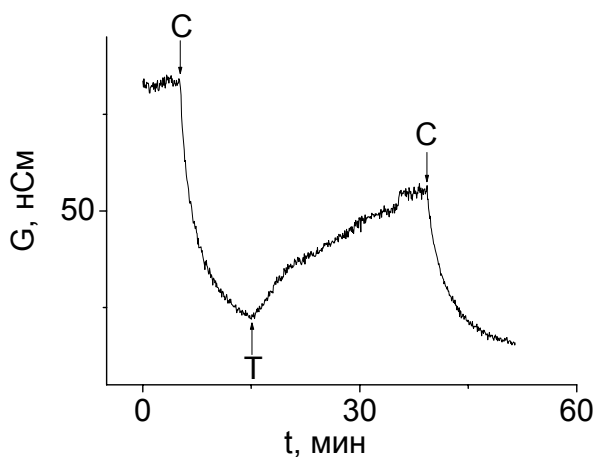


Рис.6. Фотоинактивация грамицидина под действием А2Е. Зависимость проводимости БЛМ (DPhPC) от времени после адсорбции А2Е и формирования грамицидиновых каналов. Стрелками отмечены моменты включения («С») и выключения («Т») освещения.

После формирования БЛМ из DPhPC и окончания адсорбции А2Е (аналогично опытам, описанных в предыдущем разделе) в оба отсека добавляли спиртовой раствор грамицидина А. В течение 40-60 минут после добавления грамицидина проводимость БЛМ достигала стационарного значения порядка десятков или сотен нСм, что свидетельствовало о формировании достаточно большого количества каналов в мембране (*рис.6*). После этого включали освещение и продолжали регистрировать зависимость проводимости БЛМ от времени. В присутствии А2Е наблюдалось значительное уменьшение проводимости,

которое было обратимым (после выключения света проводимость снова увеличивалась за счет встраивания нового грамицидина из раствора). Таким образом, А2Е в данной системе функционирует как фотосенсибилизатор, индуцируя разрушение грамицидина при освещении. Кинетика уменьшения проводимости при освещении БЛМ с адсорбированным на ней А2Е и встроенным грамицидином хорошо аппроксимируется моноэкспоненциальной функцией. В качестве параметра, характеризующего скорость фотоинактивации, было взято обратное характерное время этой экспоненты, которое в присутствии А2Е составляло в среднем  $0,33 \pm 0,051 \text{ мин}^{-1}$ .

На основании полученных результатов и имеющихся данных о фотоокислительном воздействии А2Е было сделано предположение о том, что основной причиной наблюдаемой фотоинактивации грамицидина и уменьшения времени жизни БЛМ, описанного в предыдущем разделе, являются генерируемые пигментом активные формы кислорода. Для проверки этой гипотезы была измерена зависимость проводимости от времени в присутствии тушителя синглетного кислорода (азид натрия,  $\text{NaN}_3$ ) и супероксиддисмутазы (СОД). Сравнение обратных характерных времен кинетики фотоинактивации показало, что в присутствии азидов фоторазрушение грамицидиновых каналов происходит в 2-2.6 раза медленнее, а в присутствии СОД – в 1.5 раза медленнее по сравнению с контрольными экспериментами без тушителей. Обнаруженное ингибирование фотоинактивации грамицидина свидетельствует о том, что фотоокислительное воздействие А2Е обусловлено как синглетным кислородом, так и супероксидными анион-радикалами, но ведущая роль в этом процессе принадлежит синглетному кислороду. Предположительно, по такому же механизму происходит описанное в предыдущем разделе нарушение стабильности мембран, сформированных из ненасыщенного липида – генерируемый пигментом синглетный кислород способен окислять углеводородные «хвосты» липидов, содержащих двойные связи.

## **Глава 4. Изучение воздействия полностью-*транс*-ретиная на бислойные липидные мембраны**

### **4.1. Встраивание ретиная в БЛМ**

Встраивание ретиная в мембрану регистрировалось по изменению проводимости БЛМ, обусловленной ионофорами – нонактином (N) и пентахлорфенолом (PCP). На *рис.7а* приведена кинетика изменения проводимости БЛМ, содержащей нонактин, который переносит ионы калия. Было обнаружено, что проводимость мембран различного липидного состава (DPhPC либо смесь DPhPC с DPhPE в массовом соотношении 3:5) увеличивалась в течение 30-40 мин после добавления ретиная в оба отсека ячейки, после чего достигала стационарного значения. Относительный прирост проводимости (нормированный на начальную проводимость БЛМ с ионофором) усреднялся по результатам 4-5 измерений (*рис.7б*). В опытах на мембранах, сформированных из DPhPC, проводимость увеличивалась в

среднем в 1,5 раза, а на мембранах из смеси DPhPC/DPhPE - в 3 раза. Зависимость эффекта от липидного состава свидетельствует о том, что он обусловлен именно наличием ретиналя в БЛМ, а не его взаимодействием с ионофором. Полученный результат косвенно указывает на то, что ретиналь не только встраивается в БЛМ, но в случае присутствия в ней фосфатидилэтаноламина может образовывать с ним комплекс. Это предположение согласуется с данными работы (Eldred, 1993), в которой показано образование устойчивых комплексов ретиналя с фосфатидилэтаноламином, входящим в состав фоторецепторных мембран зрительных клеток.

Как известно, проводимость мембраны определяется концентрацией в ней носителей заряда (например, комплекса нонактина с катионами калия) и их подвижностью. Появление ретиналя в липидном бислое может привести к изменению как неэлектрических свойств мембраны (толщина или микровязкость), так и скачков электрического потенциала на ее границах. Последнее может быть связано с тем, что молекула ретиналя, хотя и является электронейтральной и липофильной, содержит альдегидную группу, обладающую дипольным моментом, благодаря чему встраивание ретиналя может вызывать изменение дипольного потенциала. В соответствии с подходом, использованным ранее в работе (Szabo, 1974), а также многими другими авторами, разделить вклады электрических и неэлектрических факторов можно, сравнивая изменения проводимости, вызванные противоположно заряженными носителями тока. С этой целью нами было проведено аналогичное измерение проводимости с РСР – ионофором, переносящим через мембрану заряды противоположного знака - анионы. В случае РСР добавление ретиналя в ячейку приводило к уменьшению проводимости БЛМ в 4 раза (*рис. 7в*).

Противоположные изменения проводимости с ионофорами разного знака при проникновении различных веществ в бислой наблюдались ранее в работах (Szabo, 1974; Симонова, 1986) и объяснялись изменением граничных потенциалов мембраны. В рамках такой интерпретации в нашем случае можно сделать предположение об уменьшении граничных потенциалов с обеих сторон БЛМ, что приводит к понижению потенциального барьера в мембране для ионофоров катионного типа и его повышению для анионов. Тем самым увеличивается проводимость мембраны, модифицированной катионными ионофорами, и уменьшается в случае анионных ионофоров.



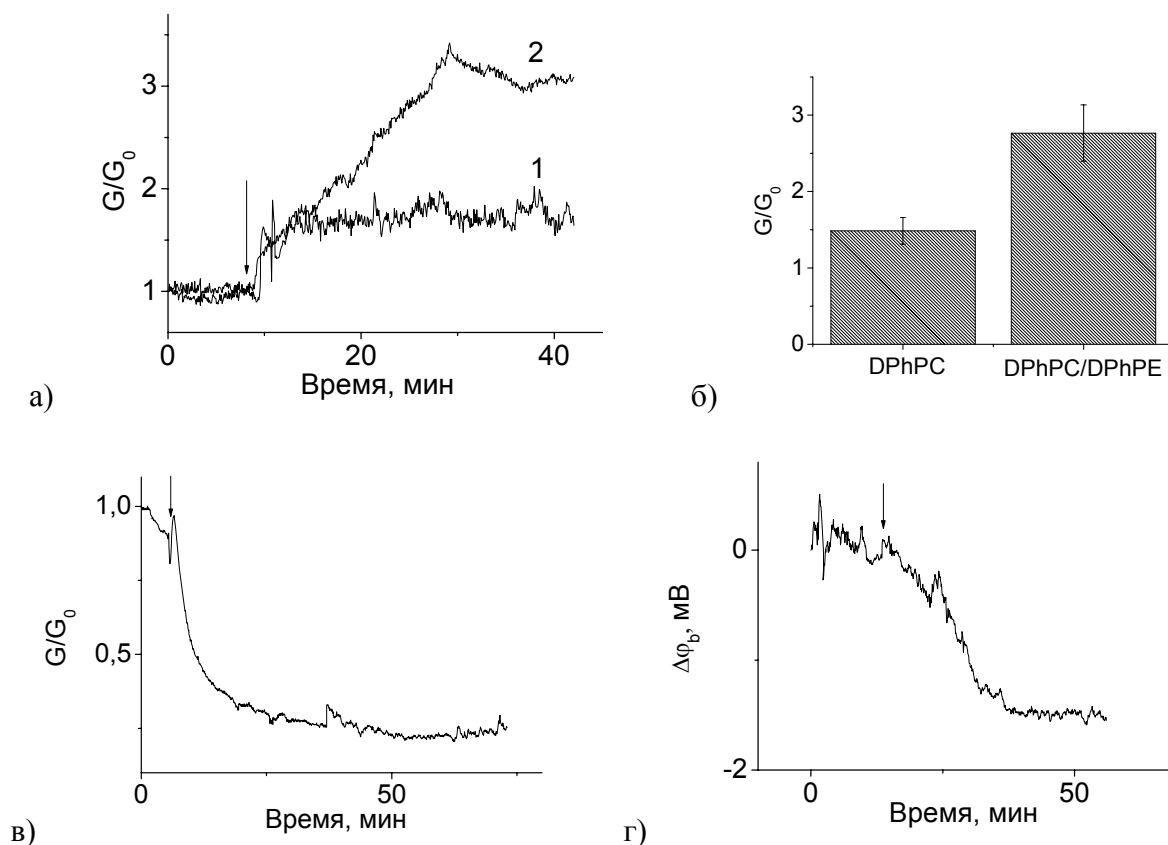


Рис.7. Воздействие ретиналя на проводимость БЛМ, модифицированных ионофорами, и на разность граничных потенциалов, измеряемую методом КВП

а) Изменение проводимости БЛМ с нонактином, сформированных из DPhPC (1) или смеси DPhPC/DPhPE в соотношении 3:5 (2) после добавления в ячейку спиртового раствора ретиналя до концентрации 80 мкМ в момент, указанный стрелкой.

б) Относительное изменение проводимости БЛМ разного состава с нонактином, вызванное введением ретиналя в ячейку (усреднение по результатам 5 измерений).

в) Относительное изменение проводимости БЛМ с пентахлорфенолом после добавления в водный раствор ретиналя до концентрации 80 мкМ в момент, указанный стрелкой.

г) Разность граничных потенциалов на БЛМ из DPhPC, измеренная методом КВП. Стрелкой указан момент добавления ретиналя (80 мкМ) в *cis*-отсек ячейки.

Полученные результаты объясняются тем, что при встраивании ретиналя происходит изменение дипольной составляющей граничного потенциала (так называемый дипольный эффект), причем знак эффекта соответствует ориентации отрицательного полюса диполя молекулы ретиналя, направленного внутрь мембраны.

Важно отметить, что в наших опытах относительное увеличение проводимости с нонактином и ее уменьшение с пентахлорфенолом существенно различались, а именно, с нонактином проводимость мембраны изменилась в 1.5 раза, а с пентахлорфенолом - в 4 раза. В то же время, если бы влияние ретиналя ограничивалось только изменением граничного потенциала (поверхностной или/и дипольной компонентой), то эти относительные изменения проводимости должны были бы практически совпадать по абсолютной величине. Полученный

результат свидетельствует о том, что помимо изменения электростатических свойств БЛМ, при проникновении ретиналя в бислой меняются и структурные характеристики мембраны (например, микровязкость).

Предположение об изменении дипольного потенциала было проверено с помощью метода КВП, который позволяет регистрировать изменение разности граничных потенциалов при добавлении ретиналя в *цис*-отсек ячейки. Запись соответствующего опыта приведена на *рис. 7г*. Добавление ретиналя приводило к появлению разности граничных потенциалов, причем ее знак соответствовал предположению об отрицательном изменении дипольного потенциала, что качественно согласуется с полученными выше результатами с ионофорами. Однако количественного согласия не было: наблюдаемое изменение разности граничных потенциалов оказалось чрезвычайно малым и не превышало 2.5 мВ. Если считать, что все изменение проводимости в присутствии ионофоров при встраивании ретиналя вызвано только изменением дипольного потенциала, то это изменение должно было бы составлять 10-30 мВ, что на порядок больше величины, измеренной методом КВП. Для сравнения, адсорбция А2Е на БЛМ приводила к изменению потенциала до +80 мВ (Соколов и др., 2005). Зарегистрированное незначительное изменение разности граничных потенциалов может быть обусловлено липофильностью ретиналя, благодаря которой он способен свободно проникать через мембрану, симметрично в ней распределяясь. Из-за проникновения ретиналя через БЛМ измеряемая методом КВП разность граничных потенциалов оказывается меньше изменения потенциала на одной границе, что делает невозможным его прямое измерение.

## 4.2. Фотодеструктивное воздействие ретиналя на БЛМ и встроенные в нее соединения

### 4.2.1. Фотодинамическое разрушение БЛМ в присутствии ретиналя

В рамках изучения фотодеструктивного воздействия ретиналя на мембраны, было изучено его влияние на время жизни БЛМ в темноте и при освещении видимым светом, аналогично тому, как это делалось при исследовании фотодинамического разрушения БЛМ в присутствии А2Е. Так же как и в случае А2Е, мембраны, сформированные из насыщенного липида (DPhPC), не разрушались ни при освещении, ни в темноте, независимо от присутствия ретиналя. Мембраны из ненасыщенного липида (DOPC) разрушались в присутствии ретиналя при освещении примерно втрое быстрее, чем в темноте – средние времена жизни составили 13 минут на свету и 40 мин в темноте (*рис. 5б*). Предположительно, это обусловлено способностью ретиналя к генерации активных форм кислорода при освещении, которая отмечалась в ряде исследований (Delmelle, 1977, 1979). Для получения более точных количественных данных и сравнения его фототоксичного воздействия с другими фотосенсибилизаторами были проведены исследования фотоинактивации грамицидинового канала, результаты которых приведены ниже.

#### 4.2.2. Фотоинактивация грамицидинового канала под действием ретиналя

Аналогично описанным в разделе 3.2 исследованиям А2Е, было проведено исследование фотоинактивации грамицидинового канала в присутствии ретиналя в тех же условиях. Для количественной оценки скорости фотоинактивации грамицидинового канала рассчитывали величину обратного характерного времени экспоненты, аппроксимирующей кинетику уменьшения проводимости. Как и в случае А2Е, были проведены эксперименты по фотоинактивации грамицидина в присутствии азида натрия и супероксиддисмутазы. Полученные средние значения обратного характерного времени фотоинактивации грамицидиновых каналов под действием А2Е и ретиналя приведены в *табл. 2*.

Условия	$1/\tau$ , $\text{сек}^{-1}$
А2Е	$0,332 \pm 0,051$
А2Е/ $\text{NaN}_3$	$0,128 \pm 0,013$
А2Е/СОД	$0,225 \pm 0,014$
Ретиналь	$0,949 \pm 0,132$
Ретиналь/ $\text{NaN}_3$	$0,027 \pm 0,017$
Ретиналь/СОД	$0,873 \pm 0,014$

Таблица 2. Средние значения обратных характерных времен фотоинактивации грамицидина под действием ретиналя и А2Е, в присутствии азида натрия (20 мМ) и супероксиддисмутазы (0.25 мг/мл)

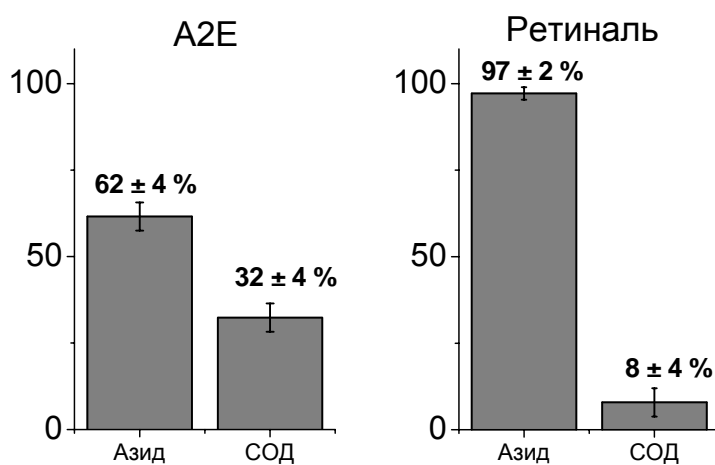


Рис.8. Относительное ингибирование фотоинактивации грамицидина, обусловленное присутствием А2Е (диаграмма слева) и ретиналя (диаграмма справа), азидом натрия и супероксиддисмутазой, в процентах. Каждый столбец иллюстрирует, на сколько процентов уменьшилась скорость падения проводимости в присутствии соответствующего тушителя АФК.

Видно, что в данных условиях ретиналь оказывает гораздо более сильное фотодеструктивное воздействие на БЛМ, чем А2Е. В присутствии ретиналя фотоинактивация грамицидина происходит быстрее примерно в 3 раза, чем в присутствии А2Е. Это может быть связано как с большим количеством ретиналя в составе БЛМ, так и его большей фотодинамической активностью. Чтобы оценить количественно относительный вклад синглетного кислорода и супероксиданионрадикала в процесс фотоинактивации грамицидина, было рассчитано относительное уменьшение скорости фотоинактивации грамицидина в присутствии азида натрия либо СОД, выраженное в процентах (*рис.8*). Более высокая степень ингибирования эффекта ретиналя в присутствии азида и СОД по сравнению со степенью ингибирования воздействия А2Е может свидетельствовать о том, что в исследуемой модельной системе ретиналь при освещении генерирует большее количество АФК. Возможно, при освещении

A2E в составе БЛМ задействованы также и другие механизмы фотоокисления, т.к. оба тушителя вызывали лишь частичное ингибирование эффекта. Полученные данные согласуются с результатами работы (Pawlak, 2003), где сравнивались способности A2E и ретиналя к генерации активных форм кислорода. Там было показано, что ретиналь гораздо более фотореакционноспособен – количество образующихся АФК в его присутствии было в 73 раза больше по сравнению с A2E. Наши результаты указывают также на то, что супероксидный анион-радикал тоже может участвовать в фототоксичном воздействии A2E, но в гораздо меньшей степени, чем синглетный кислород.

#### 4.3. Изучение фотохимических превращений ретиналя в искусственных мембранных системах при длительном освещении

В предыдущем разделе было исследовано воздействие ретиналя как фотосенсибилизатора на различные мишени, а вопрос о его собственных фотоиндуцированных превращениях не затрагивался. Однако нельзя исключать, что и сам ретиналь, находящийся в составе БЛМ, способен подвергаться фотолизу и автоокислению под действием генерируемых им активных форм кислорода, подобно тому, как это происходит с A2E (Sparrow, 2002). Для проверки этой гипотезы и определения устойчивости ретиналя в условиях описанных выше экспериментов были получены спектры его поглощения в водном растворе и в суспензии липосом, сформированных из DPhPC (рис.9\_ либо DOPC (не показано на рисунках), до и после освещения видимым светом того же источника, который использовался в описанных выше опытах на БЛМ.

Как в липидном окружении, так и в водном растворе после облучения в течение нескольких десятков минут максимум поглощения ретиналя на 380 нм практически полностью исчезал. На 280 нм появлялся новый максимум, который увеличивался при более длительном облучении кюветы с суспензией.

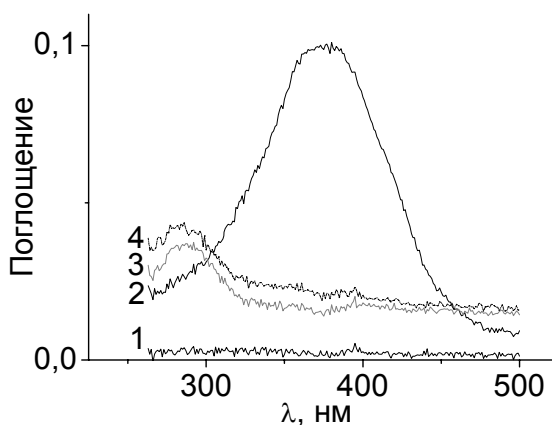


Рис.9. Спектры поглощения ретиналя в суспензии липосом, сформированных из DPhPC в зависимости от длительности освещения видимым светом. 1 –липосомы из DPhPC без ретиналя. 2 – ретиналь 16 мкМ в суспензии липосом, до освещения. 3- та же суспензия после 10 минут освещения. 4 – после 45 минут освещения видимым светом

Подобные изменения в спектре поглощения ретиналя были обнаружены и ранее (Логинова, 2008), в результате инкубации в течение нескольких дней. Эти спектральные изменения, очевидно, свидетельствуют об образовании продуктов фотоокисления ретиналя. Известно, что в отличие от *эпокси-A2E*, образующегося в результате окисления бис-ретинилиден-этанолamina, продукты фотоокисления ретиналя достаточно гидрофобны, а значит не покидают БЛМ, и сами по себе тоже обладают свойствами фотосенсибилизаторов. Это, как и более высокая фотореакционная способность самого ретиналя, может быть одной из причин его большей, по сравнению с A2E, фототоксичности.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что А2Е практически не проникает через мембрану и адсорбируется на ней только с одной стороны, вызывая значительное изменение разности граничных потенциалов. Ретиналь свободно проникает через мембрану, распределяясь в ней практически симметрично. Эффективность встраивания ретиналя заметно увеличивается при наличии в составе БЛМ фосфатидилэтаноламина, что согласуется с литературными данными об образовании комплекса ретиналя с этим липидом.
2. Обнаружено, что А2Е уменьшает стабильность БЛМ в отсутствие освещения (на 2-3 порядка уменьшается время жизни мембраны во внешнем электрическом поле) только если мембрана содержит отрицательно заряженные липиды. Это объясняется взаимодействием А2Е с их полярными группами с образованием комплексов, влияющих на спонтанную кривизну бислоя. Предположительно, по такому же механизму А2Е способен разрушать и мембраны клеток, в состав которых входят заряженные липиды. Ретиналь подобного воздействия на мембрану не оказывает.
3. Показано, что уменьшение времени жизни БЛМ в присутствии А2Е обусловлено увеличением вероятности образования спонтанно образующихся дефектов и/или скорости изменения их радиуса. При этом незначительно уменьшается натяжение бислоя и увеличивается линейное натяжение спонтанно образующихся пор.
4. Показано, что А2Е и ретиналь при освещении способствуют разрушению мембран, содержащих ненасыщенные липиды, а также вызывают инактивацию встроенных в БЛМ грамицидиновых каналов. В обоих случаях ретиналь оказался более фотоактивен, чем А2Е.
5. Обнаружено, что фотодинамическое воздействие ретиналя и А2Е на грамицидиновый канал ингибируется азидом натрия. Это свидетельствует о том, что разрушение грамицидина вызвано генерацией синглетного кислорода. Предположительно, те же механизмы действуют при фотодеструктивном воздействии исследуемых соединений на мембранные белки клеток сетчатки.
6. Показано, что фотодеструктивное воздействие ретиналя на мембраны может быть обусловлено и продуктами его фотоокисления, образование которых обнаруживается по изменениям спектра поглощения в суспензии липосом.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Соколов В.С., Соколенко Е.А., Соколов А.В., Финогенова О.А., Донцов А.Е., Островский М.А. Взаимодействие бис-ретиноид этаноламина (A2E) с бислойными липидными мембранами в темноте и при действии света. // Биологические мембраны. 2005. Т.22. С.336-345.
2. Sokolov V.S., Sokolenko E.A., Sokolov A.V., Finogenova O.A., Dontsov A.E., Ostrovsky M.A. Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes // J.Photochem. Photobiol. B: Biol. 2006. V.86. P.177-185.
3. Соколов А.В., Соколов В.С., Фельдман Т.Б., Островский М.А. Взаимодействие полностью-транс-ретинола с бислойными липидными мембранами. // Биологические мембраны. 2008. т.25, С.499-507.
4. Соколенко, Е. А., Соколов, А. В., Финогенова, О. А., Соколов, В. С., and Донцов, А. Е. Влияние продуктов фотолиза зрительного родопсина на бислойные липидные мембраны. 2, 458-459. 2004. Воронеж. 111 Съезд биофизиков России, 2004.
5. Sokolenko, E. A., Sokolov, V. S., Sokolov, A. V., Finogenova, O. A., Dontsov, A. E., and Ostrovsky, M. A. Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. Eur.Biophys.J. 34[6], 772, 2005.
6. Sokolenko, E. A., Sokolov, V. S., Sokolov, A. V., Finogenova, O. A., Dontsov, A. E., and Ostrovsky, M. A. Interaction of bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes.. 8<sup>th</sup> International Frumkin Symposium "Kinetics of electrode processes", Moscow, 2005.