

РЕНТГЕНОДИФРАКЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК С ИХФАНОМ

© 2024 г. А.В. Кривандин*,[#], А.Н. Голощапов*

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

[#]E-mail: a.krivandin@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 23.01.2024 г.

После доработки 23.01.2024 г.

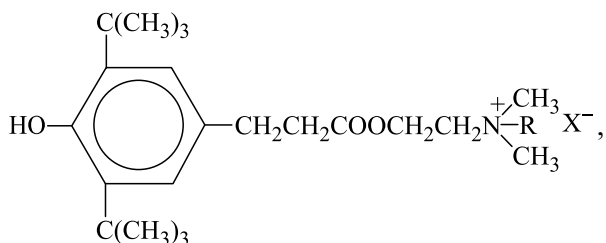
Принята к публикации 07.02.2024 г.

Методом рентгеновской дифракции проведено исследование ориентированных пленок, сформированных из растворов в хлороформе яичного фосфатидилхолина, синтетического гибридного антиоксиданта ИХФАН-10-С-10 и их смесей, содержащих 12.5 и 32 масс. % ИХФАНа. Воздушно-сухие пленки, полученные из фосфатидилхолина и ИХФАНа, были многофазными и, помимо небислойных липидных фаз, содержали кристаллическую фазу ИХФАНа. При увеличении степени гидратации таких пленок в них происходило образование одной ламеллярной фазы, состоящей из липидов и ИХФАНа. Выделение и исчезновение кристаллической фазы ИХФАНа в пленках при изменении степени их гидратации было обратимым. Профили электронной плотности липидных мембран, рассчитанные с разрешением ~1.2 нм, показали, что в присутствии ИХФАНа толщина мембраны уменьшается и упорядоченность в ней углеводородных цепей липидов понижается. Полученные результаты свидетельствуют о способности ИХФАНа встраиваться из кристаллической фазы в липидные мембраны в высоких концентрациях.

Ключевые слова: липидные мембраны, фосфатидилхолин, антиоксидант, ихфан, структура, рентгеновская дифракция.

DOI: 10.31857/S0006302924020065, EDN: OVAQAJ

Одним из важных направлений современной химии биоантиоксидантов является синтез «гибридных» соединений, молекулы которых содержат фрагменты, обеспечивающие этим соединениям, помимо антиоксидантной активности, ряд других специфических функций [1]. К таким соединениям относится группа фенольных антиоксидантов, синтезированных в ИБХФ РАН и получивших название ИХФАНЫ [1, 2]. ИХФАНЫ являются производными антиоксиданта фенозна-1 — 3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропионовой кислоты. Общая структурная формула ИХФАНов имеет следующий вид:



Сокращение: ФХ — фосфатидилхолин.

где R — атом водорода или алкил C_nH_{2n+1} , содержащий от 1 до 16 атомов углерода, X — атом Cl, Br или J [2]. Присутствие в структуре ИХФАНов фрагмента экранированного фенола обеспечивает им антиоксидантные свойства, фрагмент триметиламиноэтанола предполагает способность ингибировать действие холинэстеразы, а жирнокислотный фрагмент (алкил) должен способствовать их встраиванию в биологические мембраны и проникновению через гематоэнцефалический барьер.

Высокая антиоксидантная активность ИХФАНов и способность ингибировать действие холинэстеразы были продемонстрированы экспериментально [3–5]. Благодаря сочетанию этих свойств ИХФАНЫ являются перспективными соединениями для разработки новых эффективных средств лечения нейродегенеративных заболеваний, в том числе и болезни Альцгеймера — главной причины деменции у пожилых людей.

Свойства ИХФАНов в значительной степени зависят от длины алифатической цепи входящего в их состав алкильного заместителя. Оптимальным сочетанием антиоксидантной активности и способности ингибировать действие холинэсте-

разы по данным исследований, проведенных *in vitro* [4], обладает ИХФАН, у которого алкильный заместитель содержит 10 атомов углерода (ИХФАН-10-С-10 [5]).

Для понимания молекулярных механизмов биологического действия ИХФАНов необходимо изучение их взаимодействия с липидными мембранами. Исследованию этих вопросов, насколько нам известно, было посвящено лишь небольшое число работ. Так, на основании анализа кинетики аскорбат-индуцированного восстановления радикальных центров спиновых зондов в липосомах был сделан вывод, что ИХФАНЫ могут оказывать модифицирующее действие на структуру липидного бислоя [6]. Методом сканирующей электронной микроскопии для ИХФАНов с алкильными заместителями, содержащими 10 или 12 атомов углерода, была выявлена способность модифицировать морфологию эритроцитов, что авторы объяснили встраиванием ИХФАНов в мембрану эритроцитов [7, 8]. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния было показано, что в присутствии ИХФАНа-10-С-10 происходит уменьшение периода укладки и толщины липидных мембран в многослойных липосомах из яичного фосфатидилхолина, что также свидетельствует о встраивании ИХФАНа в липидные мембраны [9]. Однако в силу плохой упорядоченности и разориентации мембран в таких липосомах пространственное разрешение рентгенодифракционных данных при изучении подобной модельной системы является низким и из-за этого возможности методов рентгеновской дифракции не могут быть использованы в полной мере. Значительно более хорошей упорядоченности и ориентации липидных мембран можно добиться в липидных пленках, сформированных на подложках, что позволяет при рентгенодифракционных исследованиях таких пленок получить существенно более точные структурные данные о взаимодействии биологически активных веществ с липидными мембранами.

В настоящей работе сообщается о первых результатах исследования ориентированных многослойных липидных пленок, содержащих ИХФАН-10-С-10.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения пленок использовали яичный L- α -фосфатидилхолин (тип X-E, ~60% (TLC), Sigma, США) и синтезированный в ИБХФ РАН ИХФАН-10-С-10 [5], имеющий алифатическую цепь из 10 атомов углерода и содержащий атом Br. Навески фосфатидилхолина (ФХ) и ИХФАНа растворяли в хлороформе и полученные растворы наносили тонким слоем на алюминиевые подложки. После испарения основной части хлороформа и образования пленок их выдерживали на

воздухе в комнатных условиях не менее двух суток для испарения остатков хлороформа и формирования воздушно-сухой структуры пленок. Так были получены пленки из совместных растворов в хлороформе ФХ и ИХФАНа, содержащие 12.5% и 32% ИХФАНа от общей массы ФХ и ИХФАНа, а также пленки из растворов в хлороформе одного ФХ и одного ИХФАНа.

Гидратацию пленок проводили при заданной относительной влажности воздуха, выдерживая их при комнатной температуре (23–25°C) сутки в герметично закрытой ячейке над поверхностью воды или насыщенного раствора той или иной соли (NaCl, KBr, BaCl₂, KН₂РO₄), изменяя таким образом относительную влажность воздуха [10] и степень гидратации пленок. В этой же ячейке над поверхностью воды или насыщенного раствора соли гидратированные пленки находились и при измерении их дифрактограмм.

Дифрактограммы пленок получали при комнатной температуре на дифрактометре HZG4 (Freiberger Präzisionsmechanik, Германия) в геометрии Брэгга–Брентано (рентгеновская трубка с медным анодом, никелевый β -фильтр, регистрацию дифрактограмм осуществляли с помощью сцинтилляционного детектора с дифференциальным амплитудным дискриминатором).

Период повторяемости D мембран в пленках определяли по формуле Вульфа–Брэгга:

$$D = h\lambda / 2 \sin \theta_h,$$

где h – номер дифракционного пика (порядок отражения для ламеллярной фазы), $2\theta_h$ – дифракционный угол, соответствующий максимуму дифракционного пика с номером h , λ – среднее значение длины волны рентгеновского излучения для дублета Cu $K\alpha_1/K\alpha_2$ (0.1542 нм).

Полагая, что распределение электронной плотности в пленках в направлении, перпендикулярном плоскости мембран, является центросимметричным (мембраны состоят из двух одинаковых липидных монослоев), одномерные профили электронной плотности мембран $\rho(x)$ в направлении перпендикулярном плоскости мембран рассчитывали центросимметричным фурье-синтезом:

$$\rho(x) = 2 / D \sum_{h=1}^N S(h) |F(h)| \cos\left(\frac{2\pi hx}{D}\right). \quad (1)$$

В этой формуле N – число дифракционных пиков (в нашем случае $N = 4$), $F(h)$ – структурные амплитуды, $S(h)$ – фазовые множители, которые для центросимметричных структур могут иметь значения +1 или –1. Модули структурных амплитуд $|F(h)|$ для $h \geq 1$ определяли по интегральным интенсивностям дифракционных пиков $I_{\text{инт}}(h)$,

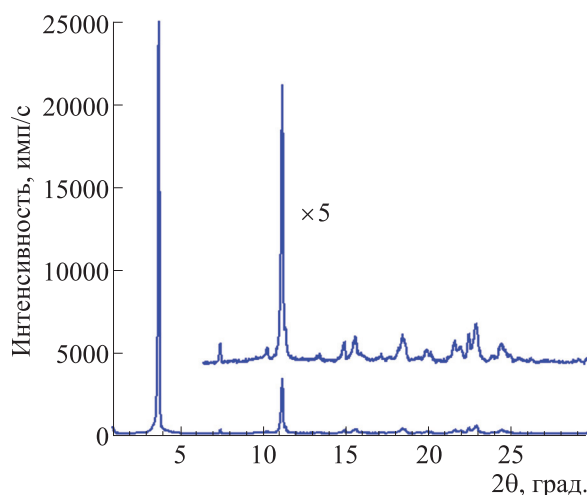


Рис. 1. Дифрактограмма воздушно-сухой пленки, полученной из ИХФАНа.

используя поправочный множитель Лоренца $\sin(2\theta_h)$, как

$$|F(h)| = \sqrt{I_{\text{int}}(h) \sin(2\theta_h)},$$

и затем нормировали так, чтобы выполнялось соотношение

$$\frac{2}{D} \sum_{h=1}^N |F(h)|^2 = 1.$$

Фазовые множители $S(h)$ определяли как в работах [11, 12], при помощи разработанной для этого компьютерной программы, основанной на расчетном методе, предложенном в работе [13]. Суть этого метода состоит в том, что для двух дифрактограмм мембранного мультислоя, полученных при разных периодах D и D' ($D' > D$), проводится перебор всех возможных сочетаний фазовых множителей и попарное сравнение между собой профилей электронной плотности $\rho(x)$ и $\rho'(x)$, рассчитанных по этим дифрактограммам для каждого из этих сочетаний (структура мембраны при периодах D и D' предполагается неизменной). За меру совпадения профилей $\rho(x)$ и $\rho'(x)$ принимается величина

$$\Delta = \int_0^{D/2} [\rho(x) - A\rho'(x) - B]^2 dx \Big/ \int_0^{D/2} [\rho(x)]^2 dx,$$

минимизированная в пространстве параметров A и B , где A — масштабирующий коэффициент, а параметр B учитывает вклад неизмеряемых экспериментально отражений с индексом $h = 0$:

$$B = F(0)(D - D') / D / D'.$$

Верными являются те фазовые множители, при которых величина Δ имеет наименьшее значение. Для всех липидных пленок без ИХФАНа и

с ИХФАНа для первых четырех порядков отражений были получены одни и те же фазовые множители: $-1, -1, +1, -1$. Эти множители были использованы при расчетах профилей электронной плотности по формуле (1). Дифрактограммы образцов с разными периодами D , необходимые для определения фазовых множителей, получали, изменяя степень гидратации пленок, как описано выше.

Средние размеры областей когерентного рассеяния в пленках, которые дают оценку средних размеров кристаллитов, рассчитывали по ширине дифракционных пиков при помощи формулы Селякова—Шеррера:

$$L = \lambda / (\beta \cos \theta), \quad (2)$$

где L — средний размер областей когерентного рассеяния в направлении, перпендикулярном плоскостям отражения, дающим анализируемый дифракционный пик, λ — длина волны рентгеновского излучения, β — исправленная на инструментальное уширение интегральная ширина анализируемого дифракционного пика (отношение площади под пиком к его высоте), выраженная в шкале 2θ в радианах, θ — половина дифракционного угла, соответствующего максимуму этого пика. Для поправки на инструментальное уширение дифракционных пиков использовали формулу [14]:

$$\beta = f(b^2 - m^2)^{0.5} + (1 - f)(b - m),$$

где b — экспериментальное значение интегральной ширины дифракционного пика, m — инструментальное уширение, f — параметр профиля дифракционного пика, равный доле функции Гаусса в профиле этого пика, аппроксимированного суммой функций Гаусса и Коши (Лоренца).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для того, чтобы понять, какую структуру может иметь ИХФАНа в пленках, состоящих из липидов и ИХФАНа, была исследована пленка, сформированная из одного ИХФАНа. Дифрактограмма воздушно-сухой пленки из ИХФАНа, полученная через трое суток после нанесения пленки на подложку, показывает, что такая пленка имеет кристаллическую структуру (рис. 1). Совершенно идентичная дифрактограмма была получена для этой пленки и после ее продолжительной (8 суток) выдержки в парах воды. Следовательно, даже максимальное увеличение относительной влажности воздушной среды, в которой находится пленка из ИХФАНа, никак не влияет на ее кристаллическую структуру. Дифракционные пики при $2\theta \approx 3.78^\circ$, $2\theta \approx 7.48^\circ$ и $2\theta \approx 11.19^\circ$ на дифрактограмме пленки из ИХФАНа (рис. 1) являются тремя первыми порядками отражений для межплоскостных расстоя-

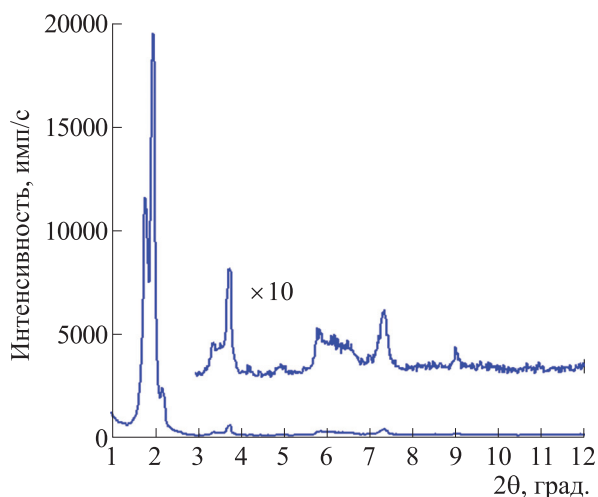


Рис. 2. Дифрактограмма воздушно-сухой пленки, полученной из фосфатидилхолина.

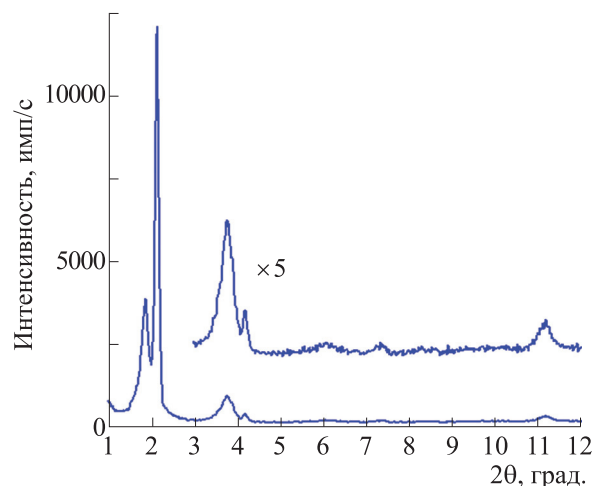


Рис. 3. Дифрактограмма воздушно-сухой пленки, полученной из фосфатидилхолина с 12.5% ИХФАНа.

ний ~ 2.36 нм. Эти дифракционные пики были использованы как реперы наличия кристаллической фазы ИХФАНа в пленках, сформированных из липидов и ИХФАНа. Интегральная ширина данных пиков на дифрактограмме (рис. 1) составляет $\sim 0.14^\circ$. Используя это значение без поправки на инструментальное уширение, получаем по формуле (2) нижнюю оценку среднего размера кристаллитов в исследованной пленке ИХФАНа, составляющую ~ 60 нм.

Воздушно-сухие пленки, сформированные из ФХ, содержали неламеллярную липидную фазу (возможно более одной такой фазы). Одна из дифрактограмм таких пленок, полученная через двое суток после нанесения пленки на подложку, приведена на рис. 2. Образование неламеллярных структур липидами при пониженной гидратации хорошо известно [15]. Анализ этих структур в исследованных пленках не входит в цели данной работы.

В воздушно-сухих пленках, сформированных из ФХ и ИХФАНа, присутствовали не только неламеллярные липидные фазы, но и кристаллическая фаза ИХФАНа. В качестве примера на рис. 3 приведена дифрактограмма воздушно-сухой пленки, содержащей 12.5% ИХФАНа, которая была получена через трое суток после нанесения пленки на подложку. Дифракционные пики на этой дифрактограмме при $2\theta \approx 3.78^\circ$, $2\theta \approx 7.48^\circ$ и $2\theta \approx 11.19^\circ$ характерны для кристаллической фазы ИХФАНа. Эти пики имеют интегральную ширину $\sim 0.3^\circ$, которая значительно больше ширины соответствующих пиков на дифрактограмме пленки из ИХФАНа ($\sim 0.14^\circ$). Оценка по формуле (2) среднего размера L кристаллитов ИХФАНа в пленке, содержащей 12.5% ИХФАНа, дает без поправки на инструментальное уширение дифрак-

ционных пиков $L \approx 30$ нм, а с максимально возможной такой поправкой $L \approx 50$ нм (поправка введена для лорентцевой формы дифракционных пиков, в качестве инструментального уширения взята полученная для пленки ИХФАНа интегральная ширина пика 0.14°). Следует отметить, что неламеллярные липидные структуры и отдельные кристаллические фазы ИХФАНа наблюдались не только в воздушно-сухих пленках, но и в пленках, находившихся над насыщенными растворами NaCl и KBr.

При достаточно высокой влажности среды (выдерживание пленок над водой или раствором KH_2PO_4) пленки, сформированные из ФХ и из смеси ФХ с ИХФАНОм, становились однофазными. Дифрактограммы гидратированных в парах воды пленок из ФХ без ИХФАНа и из ФХ с 12.5% и 32% ИХФАНа представлены на рис. 4 (кривые 1, 2 и 3 соответственно). На этих дифрактограммах присутствуют по четыре дифракционных пика, которые являются четвертьными отражениями для структур с периодами D , равными ~ 5.08 нм (без ИХФАНа), ~ 4.77 нм (12.5% ИХФАНа) и ~ 4.58 нм (32% ИХФАНа). На основании этого можно сделать вывод, что исследованные гидратированные пленки, сформированные из ФХ и ИХФАНа, являются однофазными и содержат одну ламеллярную фазу, образованную липидами и ИХФАНОм. Судя по полученным результатам, в этих пленках произошло встраивание ИХФАНа из его кристаллической фазы в липидные мембраны. Интегральная ширина дифракционных пиков на дифрактограммах пленок с ИХФАНОм (рис. 4, кривые 2 и 3) составляет ~ 0.12 – 0.14° , что не превосходит ширину дифракционных пиков на дифрактограмме пленки из ФХ (рис. 4, кривая 1). Это показывает, что встраи-

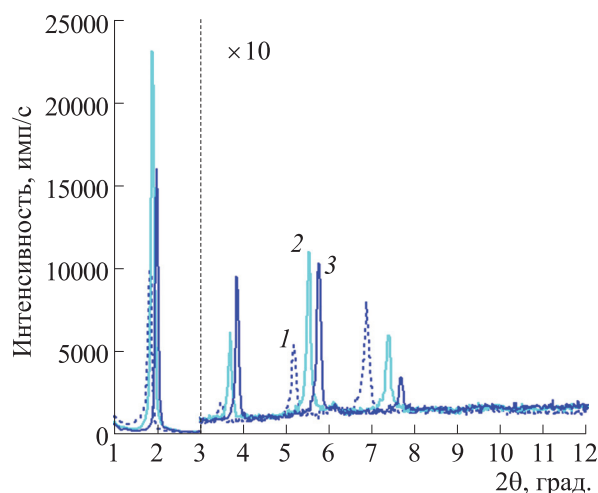


Рис. 4. Дифрактограммы гидратированных в парах воды пленок, полученных из фосфатидилхолина (дифрактограмма 1) и из фосфатидилхолина с 12.5% (дифрактограмма 2) и 32% (дифрактограмма 3) ИХФАНа. Величина интенсивности для углов $2\theta > 3^\circ$ увеличена в 10 раз.

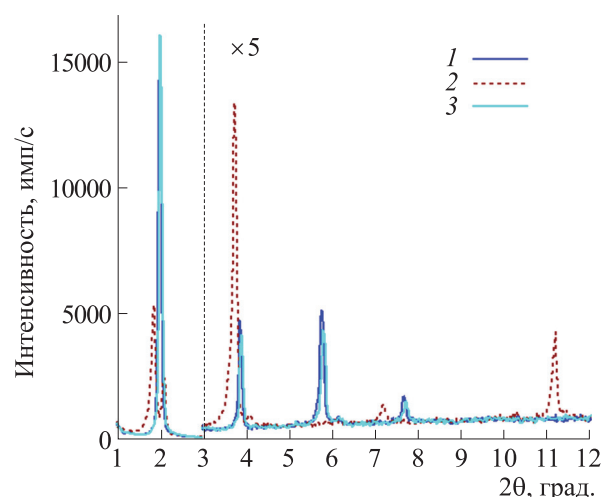


Рис. 5. Дифрактограммы пленки, полученной из фосфатидилхолина с 32% ИХФАНа, которая была гидратирована в парах воды (дифрактограмма 1), затем высушена при комнатной влажности (дифрактограмма 2) и повторно гидратирована в парах воды (дифрактограмма 3). Величина интенсивности для углов $2\theta > 3^\circ$ увеличена в 5 раз.

вание ИХФАНа в липидные мембраны не приводит к ухудшению их упорядоченности в пленках.

При дегидратации однофазных пленок, сформированных из ФХ и ИХФАНа, происходит их фазовое разделение с образованием неламинарных липидных фаз и кристаллической фазы ИХФАНа, а при повторной гидратации пленки становятся опять однофазными (содержат общую ламеллярную фазу липидов и ИХФАНа), то есть этот процесс является обратимым. Для иллюстрации на рис. 5 приведены дифрактограммы пленки, содержащей 32% ИХФАНа, гидратированной в парах воды (кривая 1), затем высушенной при комнатной влажности (кривая 2) и снова гидратированной в парах воды (кривая 3).

На дифрактограмме воздушно-сухой пленки (рис. 5, кривая 2), полученной из гидратированной пленки, присутствуют дифракционные пики при $2\theta \approx 3.8^\circ$, $2\theta \approx 7.2^\circ$ и $2\theta \approx 11.2^\circ$, характерные для кристаллической фазы ИХФАНа. Следовательно, при дегидратации этой пленки произошло фазовое разделение ламеллярной фазы, образованной липидами и ИХФАНа, в результате чего образовалась кристаллическая фаза ИХФАНа и неламинарная липидная фаза. При регидратации этой воздушно-сухой пленки в ней снова образовалась единая ламеллярная фаза, содержащая липиды и ИХФАН. Дифрактограмма такой регидратированной пленки (рис. 5, кривая 3) практически полностью совпадает с ее дифрактограммой, полученной до высушивания (рис. 5, кривая 1). Следовательно, при регидратации воздушно-сухой пленки кристаллические се-

грегации ИХФАНа, образовавшиеся в ней при ее дегидратации, снова «растворились» в липидном бислое и произошло восстановление той структуры пленки, которую она имела до высушивания. Таким образом, ИХФАН способен встраиваться в липидный бислой из его кристаллических включений. Аналогичные обратимые изменения структуры липидной пленки с выделением отдельной фазы ИХФАНа наблюдались и при гидратации-дегидратации пленки, содержащей 12.5% ИХФАНа, но размеры кристаллических сегрегаций ИХФАНа, судя по большей ширине дифракционных пиков ИХФАНа, были в этом случае меньше (возможно, также была хуже упорядоченность кристаллической структуры ИХФАНа).

Надо отметить, что ширина дифракционных пиков кристаллической фазы ИХФАНа, образующейся при дегидратации однофазных гидратированных пленок, становилась меньше, чем на дифрактограммах воздушно-сухих пленок, изначально сформированных из совместных растворов липидов и ИХФАНа. Это показывает, что размер образующихся при этом кристаллических выделений ИХФАНа был больше, чем до гидратации пленок. По-видимому, условия для кристаллизации ИХФАНа при его выделении из ламеллярной липидной фазы при дегидратации пленок являются более благоприятными, чем при формировании воздушно-сухих пленок из совместных растворов липидов и ИХФАНа в хлороформе.

Профили электронной плотности липидных мембран, рассчитанные по четырем порядкам от-

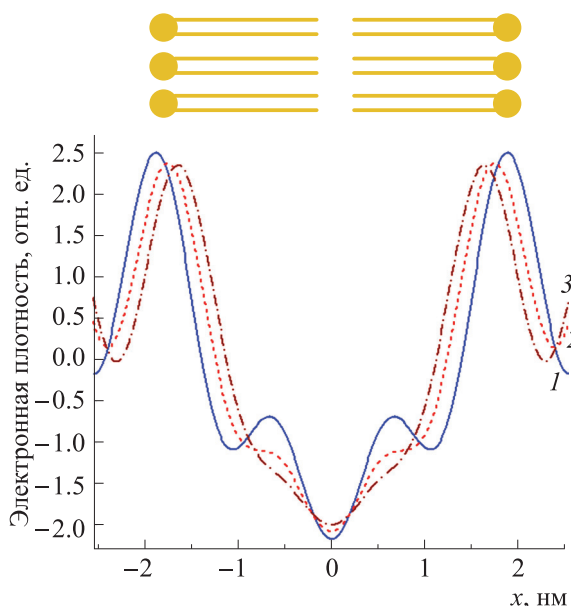


Рис. 6. Профили электронной плотности липидной мембраны без ИХФАНа (кривая 1) и при содержании ИХФАНа 12.5% (кривая 2) и 32% (кривая 3). Сверху схематично показано поперечное сечение липидной мембраны.

ражений (разрешение ~ 1.2 нм) для гидратированных однофазных пленок, сформированных из одного ФХ и из ФХ с добавками 12.5 и 32% ИХФАНа, приведены на рис. 6. Как видно из рис. 6, в присутствии ИХФАНа толщина липидной мембраны уменьшается. Если в качестве толщины мембраны t взять расстояние между пиками электронной плотности, соответствующими положению полярных групп липидов, то получаем для мембраны без ИХФАНа $t = 3.75$ нм, для мембраны, содержащей 12.5% ИХФАНа, $t = 3.46$ нм и для мембраны, содержащей 32% ИХФАНа, $t = 3.26$ нм. Учитывая, что для этих мембран периоды D равны 5.08 нм (без ИХФАНа), 4.77 нм (12.5% ИХФАНа) и 4.58 нм (32% ИХФАНа), получаем одинаковую толщину водных прослоек между мембранами в рассматриваемых пленках: $w = D - t = 1.32 \pm 0.01$ нм.

В присутствии ИХФАНа не только уменьшается толщина мембраны, но и происходят значительные изменения формы профиля ее электронной плотности в области углеводородных цепей липидов, которые прогрессируют с увеличением содержания ИХФАНа в пленке (рис. 6). Эти изменения формы профиля электронной плотности и уменьшение толщины мембраны в присутствии ИХФАНа, по-видимому, объясняются уменьшением упорядоченности липидов в мембране при встраивании в мембрану ИХФАНа подобно тому, как это происходит при переходе липидного бислоя из низкотемпературной жид-

кокристаллической мезофазы в высокотемпературную гелевую мезофазу [15].

ВЫВОДЫ

Результаты проведенного рентгенодифракционного исследования показали, что воздушно-сухие пленки, состоящие из фосфатидилхолина и ИХФАНа-10-С-10, являются многофазными и, помимо неламеллярных липидных фаз, содержат кристаллическую фазу ИХФАНа. При увеличении степени гидратации таких пленок они становятся однофазными и состоят из ламеллярной фазы, образованной липидами и ИХФАНам. Период повторяемости мембран и их толщина в таких однофазных пленках, содержащих ИХФАН, меньше, чем в пленках без ИХФАНа, а упорядоченность углеводородных цепей липидов ниже. Выделение и исчезновение кристаллической фазы ИХФАНа при изменении степени гидратации пленок является обратимым. Полученные результаты показывают, что ИХФАН способен в высоких концентрациях (по крайней мере, до $\sim 50\%$ от массы липидов) встраиваться из кристаллической фазы в липидные мембраны.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для ИБХФ РАН (тема № 01201253310).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burlakova E. B., Molochkina E. M., and Nikiforov G. A., Hybrid Antioxidants. In *Chemical and biochemical physics, kinetics, and thermodynamics: new perspectives*, Ed. by P. E. Stott, G. E. Zaikov and V. F. Kablov (Nova Science Publishers, Inc., N. Y., 2007), pp. 1–18.
2. Никифоров Г. А., Брагинская Ф. И., Ершов В. В. и Бурлакова Е. Б. Соли *N,N*-диметиламиноэтил- β -(4-гидрокси-3,5-ди-*т*-третбутилфенил)пропионата в качестве ингибитора холинэстеразы. Патент РФ 2029760, Б.И., № 6 (1995).
3. Брагинская Ф. И., Зорина О. М., Молочкина Е. М. и Бурлакова Е. Б. Синтетические биооксиданты

- ингибиторы ацетилхолинэстеразной активности. *Изв. АН СССР*, № 5, 690–698 (1992).
4. Озерова И. Б. *Новые антиоксиданты – экранированные фенолы как модуляторы активности ацетилхолинэстеразы in vitro и in vivo*. Дисс. ... канд. биол. наук (ИБХФ РАН, М., 2000).
 5. Сторожок Н. М., Перевозкина М. Г. и Никифоров Г. А. Взаимосвязь химической структуры и ингибирующего действия стерически затрудненных фенолов при окислении метилолеата в гомогенной и микрогетерогенной системах. *Изв. АН. Сер. хим.*, № 2, 323–328 (2005).
 6. Паршина Е. Ю., Гендель Л. Я. и Рубин А. Б. Влияние новых гибридных антиоксидантов – ихфанов – на кинетику аскорбат-индуцированного восстановления радикальных центров спиновых зондов в липосомах. *Биофизика*, **50** (4), 676–679 (2005).
 7. Паршина Е. Ю., Гендель Л. Я. и Рубин А. Б. Влияние новых гибридных антиоксидантов – ихфанов – на морфологию эритроцитов. *Биофизика*, **49**, № 6, 1094–1098 (2004).
 8. Паршина Е. Ю., Гендель Л. Я. и Рубин А. Б. Влияние ихфанов на структурные особенности мембраны эритроцитов. *Изв. РАН. Сер. биол.*, № 6, 645–649 (2007).
 9. Кривандин А. В., Фаткуллина Л. Д., Шаталова О. В., Голощاپов А. Н. и Бурлакова Е. Б. Исследование встраивания антиоксиданта ихфана в липосомы методом малоуглового рентгеновского рассеяния. *Хим. физика*, **32** (5), 91–96 (2013), DOI: 10.7868/S0207401X13050075
 10. Winston P. W. and Bates D. H. Saturated Solutions for the Control of Humidity in Biological Research. *Ecology*, **41**, 232–237 (1960), DOI: 10.2307/1931961
 11. Кривандин А. В., Протасова Т. Б., Федорович И. Б. и Фейгин Л. А. Рентгеноструктурное исследование фоторецепторных мембран в состоянии фазового разделения. *Биол. мембраны*, **9** (1), 40–51 (1992).
 12. Кривандин А. В., Федорович И. Б., Островский М. А. и Фейгин Л. А. Анализ структурных превращений липидного бислоя фоторецепторной мембраны при фазовом разделение. *Биофизика*, **41** (5), 1068–1074 (1996).
 13. Stamatoff J. B. and Krimm S. Phase determination of X-ray reflections for membrane-type systems with constant fluid density. *Biophys. J.*, **16**, 503–516 (1976), DOI: 10.1016/S0006-3495(76)85705-0
 14. Hosemann R. and Hindeleh A. M. Structure of crystalline and paracrystalline condensed matter. *J. Macromol. Sci. Part B*, **34** (4), 327–356 (1995). DOI: 10.1080/00222349508219497
 15. Ивков В. Г. и Берестовский Г. Н., *Динамическая структура липидного бислоя* (Наука, М., 1981).

X-Ray Diffraction Study of Lipid Films with ICHPHAN

A.V. Krivandin* and A.N. Goloschapov*

*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

The X-ray diffraction technique was used to study oriented films prepared from chloroform solutions of egg phosphatidylcholine, synthetic hybrid antioxidant ICHPHAN-10-C-10 and their mixtures containing 12.5 wt % and 32 wt % ICHPHAN. The air-dry films prepared from phosphatidylcholine and ICHPHAN were multiphase and in addition to non-bilayer lipid phases, they contained a crystalline phase of ICHPHAN. Increasing a degree of hydration of such films contributed to the formation of one lamellar phase containing lipids and ICHPHAN. The formation and disappearance of ICHPHAN crystalline phase in the films upon alteration of their degree of hydration was reversible. Electron density profiles of lipid membranes calculated at ~1.2 nm resolution showed that membrane thickness and lipid hydrocarbon chain ordering decrease in presence of ICHPHAN. The results obtained demonstrate that ICHPHAN can incorporate from crystalline phase into lipid membranes at high concentration.

Keywords: lipid membranes, phosphatidylcholine, antioxidant, ichphan, structure, X-ray diffraction