

зобшителя (С1-ССР) составлял для самок 85%, а для самцов 37% ($p < 0,05$).

Острый стресс привел к усилению окисления сукцината митохондриями самцов на 62% ($p < 0,05$). В отличие от самцов у самок такого заметного усиления не произошло. У самцов, увеличилась и интенсивность разобщенного С1-ССР окисления сукцината на 56% ($p < 0,05$).

Как и на сукцинате, дыхание на КГЛ в покое у самцов ниже, чем у самок, а после стресса наблюдается активация, чего не происходит у самок. Особенно выражены различия по малонатчувствительной фракции дыхания (МЧФ). В покое она несколько ниже у самцов, чем у самок, и увеличивается у них вдвое после стресса, в то время, как у самок увеличения не наблюдается.

Измерение активности СДГ демонстрирует картину, сходную с данными по дыханию. После воздействия острого стресса активация СДГ у самцов была почти вдвое выше, чем у самок – 56% и 30%, соответственно ($p < 0,05$). Изменение активности цитратсинтазы у самцов и самок в ответ на стресс противоположно изменению активности СДГ и окисления сукцината – активация у самцов почти вдвое ниже, чем у самок. Эти различия можно объяснить тем, что протекание полного цикла Кребса характерно для состояния покоя, а обход его начальных этапов, приводящий к ускоренному образованию сукцината, характерен для возбуждения. Как показано, возбуждение мощнее реализуется у самцов.

Изучение активности митохондриальной АТФ-азы выявило существенные различия по этому показателю у самок и самцов в исходном состоянии. Так, у самок активность фермента была на 27% выше, чем у самцов ($p < 0,05$). Острый стресс привел к повышению активности АТФ-азы у самок на 96% ($p < 0,05$) а у самцов на 100% ($p < 0,05$).

Таким образом, обнаружено, что реакция на острый стресс осуществляется усилением окисления сукцината, как добавленного, так и образующегося из КГЛ, – малонатчувствительная фракция. Эта реакция сильнее выражена у самцов, что подтверждается и прямым измерением активности СДГ. Увеличение активности АТФ-азы в условиях стресса также является механизмом повышения сопротивляемости организма за счет ускорения синтеза АТФ.

Выполнено при поддержке грантом CRDF (SR-006-X1).

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНАЛОГА ПЕПТИДА
СЛИЯНИЯ ИЗ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА
ГРИППА С ФОСФОЛИПИДНЫМИ
ЛИПОСОМАМИ: ИЗУЧЕНИЕ
МЕТОДОМ ³¹P-ЯМР**

Лесовой Д.М., Жмак М.Н.,

Люкманова Е.Н., Дубовский П.В.

*Институт биоорганической химии
им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, 117997,
Москва*

Пептиды слияния – фрагменты вирусных белков, состоящие из 20-25 аминокислот, способные вызы-

вать слияние липидных и биологических мембран [1]. При изучении этих процессов удобно работать с водорастворимыми аналогами. Нами сконструирован аналог F31, состоящий из 31-го аминокислотного остатка: G L F G A I A G F I E G G W T G M I D G W Y - G Y G G G K K K K .

С-концевой фрагмент GCGKKK обеспечивает водорастворимость пептида, а N-концевая часть (остатки 1-24) соответствует пептиду слияния из гемагглютиниона (штамм A/PR/8/34). В пептиде имеется только один остаток глутаминовой кислоты (Glu11). Цель данной работы – изучить влияние пептида F31 на фосфолипидные липосомы при различных состояниях ионизации этого остатка. С учётом данных по величинам рK_a остатков Glu в пептидах слияния, находящихся в мембранном окружении, есть основания считать, что при изменении pH от 7 до 4 с большой долей вероятности происходит протонирование боковой карбоксильной группы этого остатка. Поэтому нами взяты эти значения pH как такие, при которых остаток полностью заряжен (pH 7) и нейтрален (pH 4), соответственно. Фосфолипидные липосомы формировались из анионного фосфолипида диолеоилфосфатидилглицерина (ДОФГ). Т.к. заряд пептида в целом положителен при обоих значениях pH (4 и 7), это обеспечивает эффективное связывание с поверхностью липосом за счёт электростатического притяжения. Следовательно, изменение характера влияния пептида на липосомы при изменении pH от 7 до 4 будет означать изменение характера гидрофобного взаимодействия пептида с липосомами, вероятно, за счёт изменения глубины проникновения пептида в фосфолипидный бислой и/или характера ассоциаций пептидов на липосомах.

Наиболее удобным методом для исследования взаимодействий липид/пептид является метод ³¹P-ЯМР спектроскопии широких линий. Данный метод позволяет работать с бислойными мультисамельными липосомами, которые более адекватно моделируют биологическую мембрану. Показано, что форма линии ³¹P-ЯМР спектров мембран чувствительна к анизотропным движениям молекул фосфолипидов [2, 3], что позволяет следить за изменениями состояния модельной мембраны под воздействием пептида.

Для изучения pH-зависимости взаимодействия были проведены серии экспериментов при pH 4 и 7. Проанализировав полученные ³¹P-ЯМР спектры с помощью разработанной нами программы P-FIT [4], были получены зависимости параметров, характеризующих состояние бислоя в зависимости от соотношения липид/пептид.

При pH 4 наблюдается значительное влияние пептида на состояние бислоя. Так, при последовательном добавлении пептида, начиная с соотношения липид/пептид 40:1 происходит формирование второй анизотропной составляющей. Данная составляющая характеризуется уменьшенным значением анизотропии химического сдвига а также уменьшенным значением степени деформации липосом магнитным полем спектрометра, что связано с уменьшением эластичности мембраны. При уменьшении соотношения липид/пептид от 40:1 до 15:1 происходит рост вклада этой составляющей от ~15% до ~50%. Также стоит

отметить что начиная с соотношения липид/пептид 30:1 становится значительным вклад от изотропной составляющей, которая соответствует разрушенным липосомам. Величина этой составляющей растёт пропорционально количеству добавленного пептида и достигает значений 3-4%.

При pH 7 картина взаимодействия существенно иная: Во всём изученном диапазоне значений липид/пептид(от 50 до 15) не наблюдалось формирование дополнительных состояний модельного липидного бислоя. В то время как наблюдалось небольшое изменение параметров эластичности бислоя.

Таким образом, анализ влияния пептида на бислои ДОФГ при выбранных значениях pH подтверждает предположение о существенной роли ионогенного состояния остатка Glu11 во взаимодействии пептида слияния этого типа с липидным бислоем.

Благодарность:

Выражаем признательность РФФИ за финансовую поддержку, грант № 02-48882.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Dubovskii, P.V., Li, H., Takahashi, S., Arseniev, A.S., and Akasaka, K. *Protein Sci.*, 2000 V. 9, P. 786—798.
- 2 Seelig J. *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. V. 515. P. 105-140.
- 3 Brumm T., Mops A., Dolainsky C., Bruckner S., Bayerl T.M. *Biophys. J.* 1992. V. 61. P. 1018-1024.
- 4 Dubovskii P.V., Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., Utkin Y.N., Arseniev A.S. // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 2038-2046.

СОДЕРЖАНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА И ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МУЖЧИН И ЖЕНЩИН РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Логашова О.С., Лопатин И.В.*, Анищенко Т.Г.
Саратовский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского,
Саратова

В настоящее время количественное измерение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови приобретает важное диагностическое значение. Широко известные препараты со свойствами антиоксидантов применяются в клинической, в том числе в неврологической и нейрореанимационной практике, поэтому изучение процессов перекисного окисления служит предметом интереса молекулярных биологов и врачей. Но зачастую оценка состояния ПОЛ и антиоксидантной защиты (АОЗ) осуществляется без учета возраста обследуемых и их пола, что не всегда является методологически оправданным.

Целью работы явилось исследование некоторых показателей, характеризующих свободнорадикальное окисление липидов - малонового диальдегида (МДА), а также уровня одного из основных эндогенных антиоксидантов - церулоплазмينا (ЦП) в сыворотки крови людей с учетом их половых и возрастных особенностей.

В исследование были включены 160 практически здоровых женщин и мужчин в возрасте от 18 до 60 лет. Все обследованные были разделены на возрастные группы (18-29; 30-39; 40-49; 50-59; 60> лет); внутри этих групп учитывался пол обследуемых. В работе использовали свежеприготовленную сыворотку, которую отделяли от форменных элементов стандартным унифицированным методом. Уровень ПОЛ оценивали по содержанию ТБК-продуктов. Принцип метода определения содержания ТБК-активных веществ основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии МДА с тиобарбитуровой кислотой. Для характеристики АОЗ определяли активность церулоплазмينا. Определение активности эндогенного антиоксиданта основывается на окислении пара-фенилендиамина при участии церулоплазмينا. Ферментативную реакцию останавливали добавлением раствора этилендиаминтетраацетата (ЭДТА мг/л). По оптической плотности образующихся продуктов судили о содержании малонового диальдегида и активности церулоплазмينا. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением методов одномерной статистики, значимость различий между изучаемыми величинами определяли по критерию Стьюдента.

Результаты исследования выявили увеличение ТБК-продуктов с возрастом как у мужчин, так и у женщин (14.25 ± 0.4 нмоль/мл до 50 лет против 17.55 ± 0.58 нмоль/мл после 50 лет, $P < 0,05$). После 50 лет отмечена стабилизация концентрации ТБК-продуктов (17.68 ± 0.42 нмоль/мл в группе 50-59 лет против 17.82 ± 0.50 нмоль/мл в группе старше 60 лет). До 40 и после 50 лет достоверных отличий среди женщин и мужчин не выявлено, однако, наблюдается тенденция к увеличению МДА в сыворотке крови среди мужчин. Максимальные половые различия в концентрации МДА наблюдаются в возрасте 40-49 лет (16.73 ± 0.56 нмоль/мл у женщин против 18.45 ± 0.65 нмоль/мл у мужчин, $P < 0,05$).

Отмечено увеличение концентрации церулоплазмينا с возрастом (270.62 ± 15.7 мг/л до 50 лет против $297,11 \pm 12,5$ мг/л после 50 лет, $P < 0,05$). В течение жизни выявлены колебания уровня Cu-содержащего белка: максимальное увеличение ЦП наблюдается в 30-39 и 50-59 лет по сравнению с 18-29 и 40-49 годами (302.86 ± 22.4 мг/л, 297.07 ± 12.6 мг/л против $272,64 \pm 22.5$ мг/л, 269.71 ± 21.07 мг/л соответственно, $P < 0,05$). Содержание данного антиоксиданта у женщин (294.66 ± 17.5 мг/л) оказалось выше, чем у мужчин (275.33 ± 16.3 мг/л, $P < 0,01$).

Таким образом, увеличение концентрации МДА прямо пропорционально возрасту здорового человека. Накопление вторичных продуктов ПОЛ сопровождается ростом уровня ЦП, который можно рассматривать в качестве одного из катализаторов реакций свободнорадикального окисления. Возможно, в переходный период от юношеского к взрослому состоянию в организме человека происходят значительные изменения в системе ПОЛ-АОЗ сыворотки крови – увеличение активности процессов свободнорадикального окисления липидов сочетается с одновременным повышением уровня антиоксидантной защиты. Кроме того, обнаруженные отличия свидетельствуют о по-