

УДК 557.342

## СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОТЕРМИИ И ВВЕДЕНИИ ДАЛАРГИНА

Саидов М.Б., Халилов Р.А.

ФГБОУ ВПО «Дагестанский государственный университет», Махачкала, e-mail: smagras@mail.ru

Исследовано влияние гипотермии разной глубины на относительную микровязкость зон липид – липидных, белок – липидных контактов мембран эритроцитов, а также на эффективность переноса энергии электронного возбуждения с мембранных белков на пирен, характеризующий погруженность белков в липидный бислой мембраны при введении препарата даларгина. Показано, что низкая температура тела, независимо от уровня гипотермии, снижает микровязкость зон белок – липидных контактов мембран эритроцитов. Погруженность белков в липидный бислой мембраны изменяется в зависимости от температуры тела. Защитный эффект гипотермии зависит от глубины гипотермии.

**Ключевые слова:** гипотермия, даларгин, эритроциты, мембраны, пирен

## STRUCTURAL AND DYNAMIC PARAMETERS OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANES UNDER HYPOTHERMIA WITH DALARGIN INTRODUCTION

Saidov M.B., Halilov R.A.

FSBE establishment «Daghestan State University», Makhachkala, e-mail: smagras@mail.ru

The hypothermia influence of different depth on the relative microviscosity of the lipid lipid zones and protein lipid membrane contacts of the erythrocyte and also the effectiveness of energy transfer of electron stimulation from the protein membrane to pyrene characterizing absorption of protein in the lipid bilayer membrane with the introduction of dalargin was investigated. It is shown that low body temperature, regardless of hypothermia level, lowers microviscosity of zones and protein-lipid contacts of the erythrocyte membranes. Immersion of proteins in the lipid bilayer membranes changes depending on the body temperature. Protective effect of the hypothermia depends on the depth of hypothermia.

**Keywords:** hypothermia, dalargin, erythrocytes, membrane, pyrene

Температура – один из экологических факторов, определяющих скорости биохимических процессов и, тем самым, регулирующих стабильность биологических структур и процессов, протекающих на молекулярном уровне.

Гипотермия находит широкое применение в медицине с целью снижения обменных процессов, приводящих к повышению устойчивости организма к воздействию многих неблагоприятных факторов [1, 2]. Наряду с этим, при гипотермии запускается ряд процессов, имеющие постгипотермические последствия. В связи с этим практическое значение имеет поиск средств, защищающих организм от этого патологического воздействия.

Известно, что важную роль в сдерживании стресс – индуцированных свободнорадикальных процессов играют эндогенные регуляторные пептиды и их синтетические аналоги, в частности, опиоидный гексапептид даларгин [11]. По данным литературы, даларгин обладает множеством биологических эффектов, в том числе и мембраностабилизирующим при гипотермии [3].

Целью данного исследования явилось определение структурных параметров мембран эритроцитов при гипотермии разной

глубины и возможная коррекция обнаруженных изменений путем введения препарата даларгина.

### Материалы и методы исследования

Эксперименты проводились на беспородных белых крысах, содержащихся в обычных условиях вивария.

Гипотермию крыс вызывали в холодных камерах, в рубашке которых циркулировала вода с температурой 4-5 °С. Температуру тела снижали до 30 °С (умеренная гипотермия) и 20 °С (глубокая гипотермия).

За 30 мин до декапитации (контроль) или за 30 мин до начала снижения температуры тела животным внутривенно вводили 0,5 мл препарата даларгина в дозе 100 мкг/кг массы.

Кровь центрифугировали для получения эритроцитов при 2000 об/мин в течение 10 мин.

Структурное состояние мембран эритроцитов определяли с помощью флуоресцентного зонда пирена [4, 5]. Микровязкость липидной фазы определяли методом латеральной диффузии зонда пирена в суспензии эритроцитов.

Суспензию эритроцитов (0,5 мг белка/мл) инкубировали 1 мин со спиртовым раствором пирена, конечная концентрация которого 8 мкМ. Интенсивность флуоресценции измеряли на спектрофотометре Hitachi (Япония). Коэффициент эксимеризации пирена  $F_3/F_m$ , равный отношению интенсивности флуоресценции эксимеров  $F_3$  и мономеров пирена  $F_m$ , находится в обратной зависимости от скорости латеральной диффузии зонда в липидном слое мембран.

В вязкой среде степень эксимеризации пирена снижается, поэтому коэффициент эксимеризации находится в обратной зависимости от величины относительной микровязкости [4]. Микровязкость липидного бислоя эритроцитратных мембран оценивали при длине волны возбуждения 334 нм. Максимум длин волн флуоресценции составляли для мономеров пирена 393 нм, для эксимеров 470 нм.

Микровязкость белкового окружения определяли по соотношению флуоресценции эксимера ( $F_3$ ) и мономера ( $F_m$ ) пирена при длине волны возбуждения 282 нм. В основе метода лежит индуктивно-резонансный перенос энергии с ароматических остатков белка на пирен в пределах расстояния, называемого радиусом Фёрстера [4]. Отличием данного метода от предыдущего является лишь иная длина волны поглощаемого света.

Эффективность переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков мембранных белков на пирен оценивали по тушению флуоресценции суспензии эритроцитов при длине волны возбуждения 282 нм и длине волны флуоресценции 330 нм в отсутствие пирена и после инкубации с зондом. Эффективность переноса энергии определяли по выражению:

$$(F_0 - F)/F_0,$$

где  $F_0$  – интенсивность флуоресценции эритроцитов в отсутствие пирена;  $F$  – интенсивность флуоресценции суспензии эритроцитов после инкубации с пиреном.

результаты исследования и их обсуждение

### Результаты исследования и их обсуждение

Исследование структурных свойств мембран эритроцитов с помощью флуоресцентного зонда пирена показало, что коэффициент эксимеризации пирена  $F_3/F_m$  (334) имеет лишь слабую тенденцию к снижению по сравнению с контролем при исследованных нами уровнях гипотермии (табл. 1). По-видимому, это свидетельствует о том, что липидная фаза мембран, в которой растворены молекулы зонда, сама по себе не претерпевает существенных изменений при гипотермии.

Как видно из табл. 1, предварительное введение даларгина охлажденным животным также существенно не влияет на величину коэффициента эксимеризации пирена.

Таблица 1

Структурные параметры мембран эритроцитов при гипотермии и на фоне введения даларгина ( $M \pm m$ ;  $n = 6-8$ )

№	Состояние животного	$F_3/F_m$ (334)	$F_3/F_m$ (282)	Величина $(F_0 - F)/F_0$
1	Контроль	0,63±0,01	0,94±0,05	0,135±0,010
2	Контроль + даларгин	0,55±0,02	1,24±0,04	0,094±0,0007 $P_{1,2} < 0,05$
3	Гипотермия 30 °С	0,56±0,02	1,24±0,06	0,094±0,010 $P_{2,3} < 0,02$
4	Гипотермия 30 °С + даларгин	0,57±0,03	1,20±0,04	0,107±0,010
5	Гипотермия 20 °С	0,62±0,01	1,41±0,06	0,155±0,008
6	Гипотермия 20 °С + даларгин	0,57±0,05	1,21±0,04	0,109±0,01 $P_{5,6} < 0,01$

Таким образом, относительная микровязкость липидного бислоя эритроцитратных мембран крыс в условиях снижения температуры тела и при гипотермии с предварительным введением даларгина остается в пределах нормы.

В то же время при гипотермии изменяется другой параметр – коэффициент эксимеризации пирена  $F_3/F_m$  (282). При этом, чем глубже гипотермия, тем выше эксимеризация зонда. Так, коэффициент эксимеризации пирена при гипотермии 30 °С повышен на 32%, а при гипотермии 20 °С – на 50%.

Поскольку коэффициент эксимеризации пирена  $F_3/F_m$  (282) характеризует текучесть аннулярных липидов [4, 5], то полученные нами результаты указывают на зависимое от температуры тела снижение микровязкости зонд-белок-липидных контактов, или повышение текучести аннулярных липидов.

Введение даларгина интактным животным приводит к повышению параметра  $F_3/F_m$  (282) на 32%, который остается на этом же уровне и при гипотермии.

Таким образом, на фоне даларгина гипотермия не оказывает влияния на микровязкость зонд-белок-липидных контактов.

Исследование интенсивности безизлучательного переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков мембранных белков на пирен при гипотермии 30 °С выявило снижение эффективности переноса энергии  $(F_0 - F)/F_0$  с белков на пирен на 32%, что может быть следствием структурных перестроек в мембранных белках эритроцитов. Такие структурные перестройки мембранных белков могут быть, по крайней мере, следствием двух причин [6]:

1) ассоциация или олигомеризация интегральных белков, вследствие повышен-

ной генерации активных форм кислорода (АФК) и накопления поперечно-сшивающих продуктов ПОЛ типа МДА;

2) снижение степени погружения белков в липидный бислой.

В соответствии с этим можно предположить, что при гипотермии 30 °С уменьшается степень погруженности мембранных белков с липидный бислой. Уменьшение погруженности белков в липидный бислой при гипотермии 30 °С может быть связано с появлением на поверхности белков гидроперекисных группировок под действием АФК [7, 8]. В то же время АФК и поперечно-сшивающие продукты ПОЛ, избыточно образующиеся в крови при гипотермии, могут приводить к олигомеризации мембранных белков. При глубокой гипотермии, в отличие от умеренной, эффективность переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых осадков мембранных белков на пирен возрастает.

Эти результаты свидетельствуют, с одной стороны, о том, что при глубокой гипотермии увеличивается степень погружения мембранных белков в липидный бислой, с другой стороны – о фрагментации мембранных белков либо в результате спонтанной фрагментации окислительно-модифицированных белков [9], либо за счет активации эндогенных протеиназ. Установлено, что окислительно модифицированные белки легче и быстрее гидролизуются специфическими протеиназами [10].

Как видно по табл. 1, введение даларгина контрольным животным снижает эффективность переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков мембранных белков на пирен. Такое действие даларгин оказывает и в условиях гипотермии.

Известно, что даларгин предотвращает активацию свободнорадикальных процессов при низкотемпературном стрессе [11]. С.П.Львова с соавт. [3] показала, что введение даларгина существенно снижает накопление продуктов перекисного окисления липидов в тканях, как в норме, так и при гипотермии. Установлено, что даларгин также снижает интенсивность окислительной модификации белков плазмы крови у интактных и охлажденных до 30 и 20 °С животных [12]. Учитывая эти результаты можно предположить, что снижение эффективности переноса энергии электронного возбуждения с мембранных белков эритроцитов на пирен может быть связано со снижением окислительной модификации мембранных белков эритроцитов при введении даларгина.

Таким образом, при гипотермии наблюдаются изменения структурной организации мембран эритроцитов крыс, которые проявляются в увеличении текучести аннулярных липидов, при сохранении близкой к контролю микровязкости липидного бислоя, появлению структурных перестроек в мембранных белках.

Действие даларгина на интактных и гипотермических крыс характеризуется снижением микровязкости зон белок-липидных контактов, уменьшением эффективности переноса энергии электронного возбуждения с мембранных белков на пирен.

### Выводы

1. Исследование структурных параметров мембран эритроцитов не выявило влияния гипотермии на относительную микровязкость «общей липидной фазы» мембраны.

2. Низкая температура тела, независимо от уровня гипотермии, снижает микровязкость зон белок – липидных контактов мембран эритроцитов. В зависимости от температуры тела изменяется погруженность белков в липидный бислой мембраны.

3. Защитный эффект гипотермии зависит от глубины гипотермии. При глубокой гипотермии даларгин существенно не предотвращает изменение структурно – функциональных параметров мембран эритроцитов.

### Список литературы

1. Мешалкин Е.Н., Верещагин И.Г. Окклюзия в условиях неглубокой гипотермической защиты. – Новосибирск: Наука, 1985. – 198 с.
2. Lei Baiping, Tan Xinjuan, Cai Hongwei, Xu Qiming, Guo Quling Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation // *Stroke*. – 1994. – V. 25, № 1. – P. 147-152.
3. Львова С.П., Горбунова Т.Ф., Абаева Е.М. Влияние гипотермии и даларгина на перекисное окисление липидов в тканях крыс // *Вопр.мед.хим.* – 1993. – Т.39, вып. 3. – С. 21-24.
4. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – М.: Наука, 1980. – 320 с.
5. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
6. Спиринов М.М., Пучков Е.О., Лапшин Е.Н. Перестройки белково-липидных комплексов в результате замораживания с последующим отогревом: обнаружение по переносу энергии с белка на флуоресцентный зонд / *Ред. Журн. «Биофизика»*. – М., 1981. – 14 с. – Деп. В ВИНТИ 01.06.81, № 5121-81.
7. Gebicki S., Gebicki J.M. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals // *Biochem. J.* – 1993. – V. 289. – P. 743-749.
8. Gebicki J.M. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species // *Redox Report*. – 1997. – V.3, #2. – P. 99-110.
9. Dean Roger T., Fu Shanlin, Stocker Roland, Davies Michael J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation // *Biochem.* – 1997. – V.324. – P.1-18.
10. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging // *Science*. – 1992. – V.257. – P.1220-1224.
11. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. – Томск: Изд-во Том.ун-та, 1994. – 352 с.
12. Кличханов Н.К. Биохимические изменения в мембранах млекопитающих при зимней спячке и гипотермии. Автореф. дис. ... д-ра биол.наук. – Ростов-на-Дону, 2005. – 46 с.