



Биолог. журн. Армении, 3 (60), 2008

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНЕГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА СОРБЦИЮ НЕЙТРАЛЬНОГО КРАСНОГО ЭРИТРОЦИТАРНОЙ МЕМБРАНОЙ

Г.А. ПОГОСЯН, О.П. СОЦКИЙ, Г.Г. АРЦРУНИ

НИЦ ЕрГМУ им.М.Гераци

Исследовано *in vitro* и *in vivo* воздействие электростатического поля напряженностью 200 кВ/м на сорбцию катионного красителя нейтрального красного эритроцитарными мембранами. Показано, что воздействие поля приводит к увеличению как концентрации связанного красителя на мембране, так и предельного количества сорбированного на грамм мембранного белка красителя.

*Электростатическое поле - эритроцитарная мембрана -
нейтральный красный - сорбция*

Ուսումնասիրվել է նեյտրալ կարմիր կատիոնային ներկի սորբցիան էրիթրոցիտար մեմբրանների վրա 200 կՎ/մ լարվածությամբ էլեկտրաստատիկ դաշտերի *in vitro* և *in vivo* ազդեցությունից հետո: Ցույց է տրվել, որ դաշտի ազդեցությունը բերում է ինչպես մեմբրանում կապված ներկի կոնցենտրացիայի, այնպես էլ մեկ գրամ թաղանթային սպիտակուցին բաժին ընկնող սորբցիայի ենթարկված ներկի սահմանային քանակի աճի:

Էլեկտրաստատիկ դաշտ - էրիթրոցիտար մեմբրան - նեյտրալ կարմիր - սորբցիա

The *in vitro* and *in vivo* effects of 200 kV/m electrostatic field on the sorption of cationic stain neutral red in the membranes of erythrocytes has been investigated. The data obtained show that the field influence leads to the increasing of the both membrane binding stain concentration and the maximum quantity of sorbet by the one-gram membrane protein.

Electrostatic field - erythrocyte membrane - neutral red - sorption

Ранее нами было показано, что *in vitro* воздействие внешнего электростатического поля (ЭСП) напряженностью 200 кВ/м приводит к повышению ξ -потенциала и увеличению поверхностного заряда на эритроцитах [6].

Одной из характеристик структурной организации клеточных мембран и его поверхностного заряда является способность мембран связывать различные красители [5]. В настоящей работе исследовали *in vitro* и *in vivo* влияние внешних ЭСП на способность эритроцитарных мембран связывать катионный краситель – нейтральный красный (НК). Исследования сорбции НК эритроцитарной мембраной позволят оценить влияние внешнего ЭСП на суммарный заряд эритроцитов, что поможет выявить определенный механизм воздействия ЭСП на мембранные структуры.

Материал и методика. Объектом исследования служила стабилизированная оксалатом натрия эритроцитарная масса крови белых беспородных крыс массой 130-150 г. Эритроциты осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин и трижды отмывали физиологическим раствором. В экспериментах *in vitro* одну часть выделенных эритроцитов подвергали воздействию ЭСП напряженностью 200 кВ/м длительностью 15 мин в специальной камере [1] при комнатной температуре, другая часть, находящаяся в тех же условиях, но без воздействия ЭСП, служила контролем.

В экспериментах *in vivo* животных подвергали воздействию ЭСП тех же параметров продолжительностью один час. Выделенные эритроциты служили объектом для исследования, а контролем служили эритроциты интактных животных. Для каждого опыта эритроцитарные мембраны выделяли из крови двух животных, всего использовано 52 животных.

Эритроцитарные мембраны выделяли по методу Лимбера [12]. Белок определяли по Лоури [13].

Для окрашивания эритроцитарных мембран был использован витальный краситель НК в концентрации $0,5 \cdot 10^{-5}$ М. Объем пробы составлял 4 мл (0,1 мл суспензии эритроцитарных мембран, содержащих 90 -120 мкг белка, 0,4 мл 200 мМ трис-НСl буфер рН 6,5, 0,4 мл раствора красителя, 3,1 мл физраствора). С целью достижения равновесия пробы инкубировали в термостате в течение 1 ч при температуре 30° . Затем мембраны осаждали 20 мин при 20 000 g.

Оптическую плотность супернатанта определяли при длине волны 512 нм. Каждый эксперимент проводили по 6 параллелям.

Концентрацию красителя в супернатанте, соответствующую равновесной концентрации несвязанного мембранами красителя (C_s), определяли по уравнению:

$$C_s = C_0 \cdot D_c / D_0,$$

где D_c – оптическая плотность супернатанта, C_0 – концентрация красителя в контрольных растворах, D_0 – оптическая плотность контрольных растворов.

Концентрацию связанного мембранами красителя в расчете на 1 г белка мембран (C_c) находили по разности между C_0 и C_s и относили к количеству белка в пробе.

При установлении равновесия между свободным красителем в растворе и красителем, адсорбированным на поверхности с ограниченным числом связывающих центров, и при условии мономолекулярной сорбции, что имеет место в наших экспериментах, должно выполняться уравнение адсорбции Ленгмюра:

$$C_c = n \cdot C_s / K + C_s,$$

где K – константа диссоциации комплекса краситель-субстрат, n – предельное количество молей сорбированного красителя на 1 г мембранного белка.

Разность средних оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как следует из приведенной таблицы, воздействие ЭСП приводит к увеличению как концентрации связанного красителя на мембране, так и к увеличению предельного количества

сорбированного на грамм мембранного белка красителя. Это свидетельствует о том, что воздействие внешних полей исследуемых параметров приводит к увеличению отрицательного заряда эритроцитов. Следует отметить, что увеличение концентрации связанного с мембранами красителя при *in vitro* воздействии статистически не достоверно. Судя по полученным данным, эффект поля при воздействии *in vivo* более выражен. Возможно, это является следствием того, что к механизмам непосредственного действия ЭСП накладываются изменения обменных процессов, происходящих при наложении ЭСП.

Таблица 1. Концентрация связанного мембранами НК C_c (моль/г белка) и предельное количество молей сорбированного красителя n (моль/г белка) при воздействии *in vitro* и *in vivo* ЭСП напряженностью 200 кВ/м

Вариант воздействия	Количество опытов	C_c	n
Контроль (0)	10	$4.99 \cdot 10^{-5} \pm 0.89 \cdot 10^{-5}$	4.97
<i>In vitro</i>	8	$6.74 \cdot 10^{-5} \pm 0.13 \cdot 10^{-5}$ $t=1.945$	7.26
<i>In vivo</i>	8	$8.76 \cdot 10^{-5} \pm 0.13 \cdot 10^{-5*}$ $t=4.191$	8.76

* $p < 0.01$

Ранее показано, что внешние ЭСП существенно влияют на липидный обмен мембранных структур, что, несомненно, может привести к изменению заряда [3]. В литературе имеется большое количество работ [8, 9, 14] о влиянии внешних ЭСП на мембранные структуры, где большинство выявляемых эффектов авторы объясняют поляризацией фосфолипидной компоненты мембран. Однако, как нами отмечалось ранее [2], помимо поляризации, при наложении внешних ЭСП происходят изменения объемной плотности зарядов в пределах бислоя, что должно привести к изменению заряда эритроцитов, как и показано в данной работе. Ранее нами было показано, что наложение внешнего ЭСП исследуемых параметров в экспериментах *in vitro* приводит к повышению поверхностного заряда эритроцитов [6]. Приведенные выше данные об увеличении предельного количества сорбированного красителя на грамм мембранного белка свидетельствуют о том, что как в увеличении поверхностного заряда, так и в увеличении суммарного заряда эритроцитов определенную роль играет белковая компонента мембран. Так как, согласно литературным данным [7], НК является проникающим красителем, может сорбироваться и на внутренней стороне мембраны, он связывается как с поверхностными, так и с неповерхностными белками [5]. Местами, связывающими катионный краситель НК, могут быть электроотрицательные группы COO^- боковых радикалов аминокислот, которые при наложении внешних ЭСП вследствие поляризации белков и изменения плотности заряда на их поверхности могут увеличить электроотрицательность. Возможно, что изменение электроотрицательности происходит вследствие изменения конформации мембранных белков при наложении ЭСП, так как конформация молекулы белка определяется соотношением и распределением полярных и неполярных аминокислот боковых радикалов. О структурных изменениях белков при действии ЭСП свидетельствуют работы [10, 11].

Принимая во внимание то, что отрицательный заряд поверхности эритроцитарных мембран обусловлен не только COO^- группами белков, но и карбоксильными группами сиаловых кислот [12], можно предположить, что в увеличении отрицательного заряда определенную роль могут играть изменения состояния COO^- групп сиаловых кислот поверхностного слоя эритроцитарных мембран.

Наши предварительные данные об изменении заряженных групп мембранных белков при наложении ЭСП, представленные в этой работе, свидетельствуют о том, что в биологических эффектах воздействия ЭСП на мембранные структуры, помимо изменений фосфолипидной компоненты, определенную роль играют также изменения белковой компоненты мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арируни Г.Г.* Камера для изучения действия ЭСП на мелкие лабораторные животные // Удост. на рац. предложение, 134, 1983.
2. *Арируни Г.Г.* Мед. наука Армении, XL(3), с. 70-80, 2000.
3. *Арируни Г.Г.* Глобус науки, 1(1), с. 33-37, 2001.
4. *Габриелян Э.С., Акопов С.Э.* В кн.: Клетки крови и кровообращение. Айастан, Ереван, с. 74-76, 1985.
5. *Левин С.В.* В кн.: Структурные изменения клеточных мембран. Л., Наука, 1976
6. *Погосян Г.А., Саакян Г.В., Арируни Г.Г.* Биолог. ж. Армении, 59, 1-2, с. 136-138, 2007.
7. *Тугай В.А., Левин С.В., Курский М.Д.* Цитология, X, 9, с.1103-1109, 1973.
8. *Crooes Y.T., Boker S.G., McConnel H.M.* Proc. Nath Acad. Sci. USA, 3, 95(3), pp. 935-938, 1998.
9. *Katnik K., Wang R.* J. Biophysics, 57, 4, p. 672- 676, 1990.
10. *Kohler M., Friedrich Y., Fidy Y.* Biochem. Biophys. Acta, 18, 1386 (2): 255-288, 1998.
11. *Kolodner P., Luckachev E., Ching V.* Bioelectrochemistry, 51(1): 67-73, 2000.
12. *Limber G.R., Davie R.F., Boker A.M.* Blood, 36, 2, p. 111-118, 1970.
13. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr R. H., Randal P. J.* J. Biol. Chem., 193, (1): 265, 1951.
14. *Radhakrishnan A., McConnel H.M.* Proc. Nath Acad. Sci. USA, 1, 97(3), p. 1073-1080, 2000.

Поступила 11.06.08