



ВЛИЯНИЕ ВНЕШНЕГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА ТЕНИ ЭРИТРОЦИТОВ

Г.Г. АРЦРУНИ, Г.В. СААКЯН

*Ереванский государственный медицинский университет, НИЦ,
лаборатория биохимических и биофизических исследований*

Исследовано влияние внешнего электростатического поля (ЭСП) напряженностью 200 кВ/м на параметры связывания флуоресцентного зонда АНС с тенями эритроцитов. Показано, что при *in vivo* воздействии ЭСП константа скорости связывания АНС с тенями эритроцитов возрастает с одновременным снижением количества центров связывания. В экспериментах *in vitro*, во время которого связывание АНС с тенями эритроцитов происходило при непосредственном влиянии ЭСП, константа скорости связывания АНС с тенями эритроцитов не меняется, а количество центров связывания снижается. Когда инкубация с АНС проводилась после предварительного воздействия поля на тени эритроцитов, эффектов не было выявлено.

Электростатическое поле - тени эритроцитов - АНС

Ուսումնասիրվել է 200 կՎ/մ լարվածությամբ արտաքին էլեկտրաստատիկ դաշտի (ԷՄՊ) ազդեցությունը էրիթրոցիտների ստվերների հետ ֆլուորեսցենտային գոնդ ԱՆՍ-ի կապման պարամետրերի վրա: Ցույց է տրվել, որ *in vivo* ազդեցության արդյունքում էրիթրոցիտների ստվերների հետ ԱՆՍ-ի կապման արագության հաստատունը կապման կենտրոնների քանակի նվազմանը զուգահեռ աճում է: *In vitro* հետազոտությունների ժամանակ, երբ էրիթրոցիտների ստվերների հետ ԱՆՍ-ի կապումը իրականացվում է դաշտի անմիջական ազդեցությամբ, ԱՆՍ-ի կապման արագության հաստատունը չի փոխվում, իսկ կապման կենտրոնների քանակը նվազում է: Երբ ԱՆՍ-ի հետ էրիթրոցիտների ստվերների ինկուբացիան իրականացվում է վերջիններս նախապես դաշտի ազդեցությանը ենթարկելուց հետո, որևէ էֆեկտ չի գրանցվում:

Էլեկտրաստատիկ դաշտ - էրիթրոցիտների ստվերներ - ԱՆՍ

The influence of 200 kV/m external electrostatic field (ESF) on the binding parameters of fluorescent probe ANS with ghosts of erythrocytes was investigated. It was shown that *in vivo* influence of ESF led to the increase of the speed constant of ANS binding with ghosts in parallel with decrease of the amount of binding centers. In the case of *in vitro* experiments, when incubation of ANS with ghosts was released under the direct effect of ESF, the speed constant of ANS binding was not changed, while the amount of binding centers decreased. When the incubation of ANS with ghosts was accompanied after their treatment with field, any effect was not observed.

Electrostatic field - ghosts of erythrocytes – ANS

Ранее нами было показано, что первичный механизм биологической активности внешнего электростатического поля (ЭСП) в основном обуславливается физическими процессами на границе сред с различной проводимостью [1]. Плазматическая мембрана является системой с явно выраженными границами компонентов, имеющих разную проводимость.

Показано, что ЭСП существенно влияет на структурно-функциональное состояние биологических мембран [2, 5, 6, 7, 13, 15, 16, 17]. Однако в доступной нам литературе мы не встретили работ, свидетельствующих о тех или иных конкретных структурных перестройках в биологических мембранах после воздействия ЭСП. Представляемая работа является попыткой восполнить этот пробел.

Параметры связывания флуоресцентного зонда 1-анилинафталин-8-сульфоната (АНС) с мембраной эритроцита служит индикатором для оценки молекулярных перестроек в структуре мембраны [9, 14]. Целью данной работы является исследование *in vivo* и *in vitro* влияния ЭСП на параметры связывания АНС с тенями эритроцитов.

Материал и методика. В экспериментах использованы белые беспородные крысы массой 150-200 г. ЭСП создавалось при помощи установки конденсаторного типа, описание которой дано в работе [3]. Опытные животные подвергались воздействию ЭСП напряженностью 200 кВ/м. Контрольные и экспериментальные животные декапитировались. Из крови по стандартной методике извлекались эритроциты, выделялись мембраны и собирались тени эритроцитов по методу Доджа [8] с небольшой модификацией - эритроциты промывались физиологическим раствором, что позволяло увеличить выход мембран.

Исследование теней эритроцитов проводили методом флуоресцентного зонда, в качестве которого использовали АНС, который имеет единичный отрицательный заряд и располагается в наиболее функционально активном поверхностном слое мембран [9]. Молекулы зонда возбуждались при (360 нм, флуоресценцию регистрировали при (450 нм. Исследования проводили на спектрофлуорометре Hitachi MPF-4 (Япония).

Флуоресценцию измеряли в условиях постоянной концентрации мембранного белка (0,3 мг/мл) при титровании АНС (5-100 мкМ) и постоянной концентрации АНС (5 мкМ) различными концентрациями мембран (0,1-0,6 мг/мл). Полученные данные выражали в обратных координатах и строили графики по Клотцу (10). Константу скорости реакции (Kс) и количество центров связывания зонда рассчитывали по формуле Скэтчарда (12). Белок определяли по Лоури (11). Для каждой точки измерения использовали тени эритроцитов, выделенные от трех животных. Каждая расчетная точка бралась как средняя от 7 измерений. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Стьюдента.

В *in vivo* экспериментах исследовали тени эритроцитов крыс, предварительно подвергнутых одночасовому воздействию ЭСП. Для *in vitro* опытов тени эритроцитов, полученные из крови интактных животных, делили на три части. Одна часть служила контролем. Вторую часть после 20-минутного воздействия поля напряженностью 200 кВ/м инкубировали с АНС в течение 20 мин (*in vitro* I). Третью часть во время 20-минутной инкубации АНС подвергали воздействию ЭСП той же напряженности (*in vitro* II).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 и 2 приведены флуорометрические кривые титрования теней эритроцитов зондом АНС (а) и титрования АНС с тенями эритроцитов (б) в обратных координатах после воздействия ЭСП.

На основании флуорометрических кривых были рассчитаны константы скорости связывания АНС с тенями эритроцитов и количество центров связывания (табл. 1).

Как следует из табл.1, при *in vivo* воздействии ЭСП константа скорости связывания АНС с тенями эритроцитов возрастает на 94% с одновременным снижением числа центров связывания на 66,97%. Эти изменения исследуемых параметров говорят о том, что воздействие ЭСП привело к таким межмолекулярным перестройкам в поверхностном слое эритроцитарных теней, которые, уменьшая количество центров связывания, изменяют их заряд таким образом, что увеличивается константа скорости реакции. Если принять во внимание, что АНС связывается в поверхностном слое мембраны на местах контакта белок-липид (4, 9, 14), то можно предположить, что фиксированные изменения являются следствием изменений взаимного расположения этих молекул. Эти изменения могут быть обусловлены перестройками липидного обмена в мембранах эритроцитов [2, 13], а так-

же изменением поверхностного заряда эритроцитов при воздействии ЭСП [6, 7], а могут быть и результатом поляризации фосфолипидов наружного слоя мембраны. В пользу последнего предположения свидетельствуют результаты, полученные в экспериментах *in vitro* II, во время которого связывание АНС с тенями эритроцитов происходило при непосредственном влиянии ЭСП. Согласно полученным данным, константа скорости связывания АНС с тенями эритроцитов не меняется, а количество центров связывания снижается на 81,6%, то есть во время воздействия поля происходят межмолекулярные перестройки вне зависимости от обменных процессов, которые могут являться следствием поляризации белков и липидов, что может привести к их пространственной переориентации. Стоит обратить внимание на то, что в данном случае понижение количества центров связывания практически не изменило константу скорости реакции связывания, что свидетельствует об изменении зарядов центров связывания. Это еще раз подтверждает наше предположение, что при *in vitro* воздействии первичным механизмом наблюдаемых изменений является поляризация биологических макромолекул на поверхностном слое мембраны.

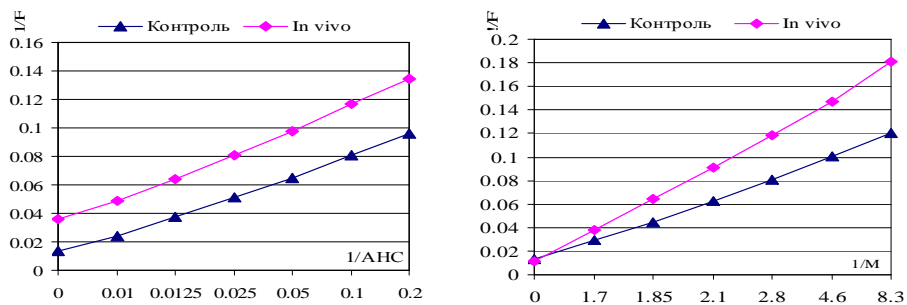


Рис. 1. Флюорометрические кривые титрования теней эритроцитов зондом АНС (а) и титрования АНС с тенями эритроцитов (б) в обратных координатах после одночасового *in vivo* воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м:
F – интенсивность флуоресценции в относительных единицах,
 АНС – концентрация зонда, мкМ,
 М – концентрация белка теней эритроцитов, мг/мл

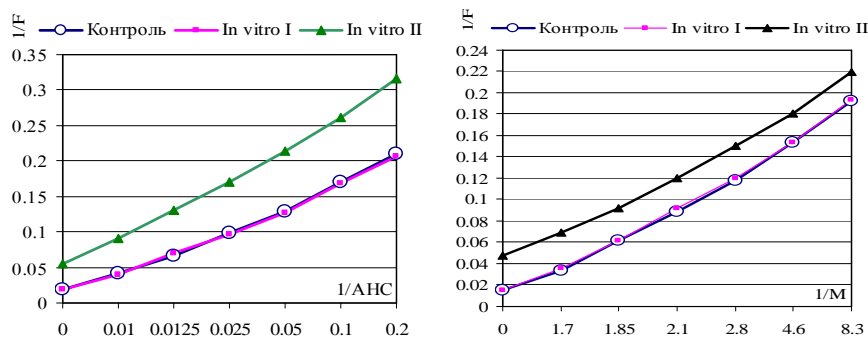


Рис. 2. Флюорометрические кривые титрования теней эритроцитов зондом АНС (а) и титрования АНС с тенями эритроцитов (б) в обратных координатах после 20-минутного *in vitro* воздействия ЭСП напряженностью 200 кВ/м

Обозначения см. на рис.1.

Таблица 1. Константа скорости связывания (K_c) и количество центров связывания (N) АНС с теньями эритроцитов при *in vitro* и *in vivo* воздействии ЭСП напряженностью 200 кВ/м
* $p=0,086$

Параметр	Контроль	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i> I	<i>In vitro</i> II
$K_c, \times 10^4 M^{-1}$	$2,1 \pm 0,69$ n= 21	$4,08 \pm 0,086^*$ n= 21	$1,8 \pm 0,2$ n= 21	$2,2 \pm 0,18$ n= 21
$N, \times 10^{-9} M/мг$ белка	$36,06 \pm 5,27$ n= 21	$11,91 \pm 1,72^{**}$ n= 21	$37,83 \pm 3,31$ n= 21	$6,63 \pm 1,18^{***}$ n= 21

** $p=0,0002$ *** $p=0,00002$

Результаты экспериментов по *in vitro* I, во время которого инкубация с АНС проводилась после предварительного воздействия ЭСП на тени эритроцитов, не выявили никаких эффектов. Это можно объяснить тем обстоятельством, что время релаксации молекул достаточно мало для фиксации возможного эффекта поляризации, а остаточная поляризация незначительна.

Таким образом, межмолекулярные перестройки в поверхностном слое мембран, вследствие поляризации биологических макромолекул во время воздействия ЭСП, могут явиться первопричиной множества изменений в мембранах после воздействия поля, описанных ранее в работах 2, 5, 6, 7, 13, 15, 16, 17.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арцруни Г. Механизмы биологической активности электростатических полей. Мед. наука Армении, XL, 3, с. 70-80, 2000.
2. Арцруни Г. Качественно-количественный состав и деацелирование фосфолипидов мембран эритроцитов после воздействия внешнего электростатического поля. Глобус науки, 1, 1, с. 33-37, 2001.
3. Арцруни Г.Г. Камера для изучения действия ЭСП на мелкие лабораторные животные. Удст. на рац. предложение, № 134, 1983.
4. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 1980.
5. Параніч А., Ромоданова Е., Пашиневка В. Зміна жеских физиологичних парметрив в організми зрилых шуриг пид впливом электростатичного поля. Физиол. ж., Киев, 39, 4, с. 94 – 97, 1993.
6. Погосян Г., Саакян Г., Арцруни Г. Влияние электростатического поля на электрокинетический потенциал эритроцитов. Биолог. журнал Армении, 1-2, с. 136-138, 2007.
7. Change S. Electric-field-induced volume and membrane ionic permeability changes of red blood cells. IEEE transactions on biomedical engineering, 40, 10, 1054-1059, 1993.
8. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D. The preparation and hemical characteristics of hemoglobin - free shosts of human erythrocyts. Arch. Biochem. and Biophys. 100, 1, 119-130, 1980.
9. Horie T., Sugiyama Y., Awazu S., Hanano M. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate binding site on human erythrocyte membrane using fluorescence lifetime and polarization. J Pharmacobiodyn. Feb; 5, 2, 73-80, 1982.
10. Klotz I. Chem. Revs, 41, p. 373, 1974.
11. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randal R. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 1, 265-275, 1951.
12. Sckatchard G. Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, p. 660, 1949.

13. *Starke-Peterkovic T., Turner N., Else P. L., Clarke R. J.* Electric field strength of membrane lipids from vertebrate species: membrane lipid composition and Na⁺-K⁺-ATPase molecular activity. *Am. J. Physiol.*, 288:663-670, 2005.
14. *Slavik, J.*, Anilinonaphtalene sulphonate as a probe of membrane composition and function, 1982.
15. *Vasilkoski Z.* The effect of electric fields on lipid membranes. *Biological Physics*, 1, 15-22, 2006.
16. *Vassu T., Fologea D., Csutak O., Smarandache D., Sasarman E., Stolica I., Soare S.* Secondary Effects of Electroporation with bipolar electric pulses: Electrostimulation. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 9, 1, 1541-1544, 2004.
17. *Wilkea N., Maggio B.* Effect of externally applied electrostatic fields on the surface topography of ceramide-enriched domains in mixed monolayers with sphingomyelin. *Biophysical Chemistry*, 122, 1, 36-42, 2006.

Поступила 12.10.2010.