Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Тверская государственная медицинская академия
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Состояние воды в биологических и модельных системах

Материалы I международной конференции
Тверь, 20–21 декабря 2007 г.

Тверь 2007

УДК 614.777:574.356:543.3
ББК 28.082
С 668

Состояние воды в биологических и модельных растворах [Текст]: материалы I международ. конф., 20–21 декабря. – Тверь, 2007. – 203 с.
С 668
ISBN 978-5-8388-0062-6

В материалах конференции рассмотрен широкий круг междисциплинарных вопросов современной биофизики, биохимии, криобиотики, медицины и фармации.

Рассчитаны на участников конференции и широкий круг читателей, интересующихся проблемами исследования структуры и свойств водного компонента биологических систем и модельных растворов.

© ГОУ ВПО Тверская ГМА Росздрава, 2007
© Авторы тезисов, 2007

ISBN 978-5-8388-0062-6

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА ДИНАМИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ ВОДНО-БЕЛКОВОЙ МАТРИЦЫ ЦИТОПЛАЗМЫ ЭРИТРОЦИТОВ БЫКА

Л. В. Цымбал, Н. М. Шпакова [1], С. С. Ершов, Н. В. Орлова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Украина г. Харьков, tsymbalgtp@mail.ru, [1]starling_nataly@mail.ru

Методом ЭПР спиновых зондов с использованием гидрофильного зонда ТЕМПОН исследована динамическая структура цитоплазмы эритроцитов быка. Показано, что состояние водно-белковой матрицы цитозоля модифицируется при действии гипертонических концентраций NaCl в зависимости от времени инкубирования. Высказано предположение, что механизм воздействия обусловлен как изменением водно-белковых взаимодействий в цитоплазме, так и изменением структурно-динамического состояния мембран.

Важнейшим типом взаимодействий в клетках, обусловливающим их реактивность, являются водно-белковые и водно-липидные взаимодействия [1]. Несмотря на существующие многочисленные данные о взаимосвязи состояния внутриклеточных коллоидов со структурой цитоплазмы и реакцией клеток на различные раздражители, молекулярные аспекты этой проблемы изучены слабо [2].

Учитывая роль полярных взаимодействий в структурно-функциональном состоянии биомембран [3], можно предположить, что модификация состояния гидратированной поверхности мембран при определенных условиях может сопровождаться изменением водно-белковых взаимодействий, в том числе в цитозоле. Так, в эритроцитах человека показано влияние неэлектролитов, обладающих различной проникающей способностью, на водно-белковую поверхность мембран, а также на динамическую структуру цитозоля [4]. Несмотря на общность строения, эритроциты млекопитающих различных видов имеют определенные отличия от эритроцитов человека. В частности, эритроциты быка имеют клетки с доминирующим содержанием натрия в цитоплазме, в отличие от эритроцитов человека [5]. Ранее обнаружены определенные видовые различия эритроцитов в реак-

ции на не физиологические концентрации электролитов [6]. Настоящая работа посвящена вопросам взаимосвязи между состоянием цитозоля и мембран (барьерных свойств) клеток на электролитный состав внеклеточной среды.

Для исследования динамической структуры цитоплазмы эритроцитов быка мы использовали метод ЭПР спиновых зондов [7], оценивая изменения параметров вращательной подвижности гидрофильного зонда ТЕМПОН (10^{-4} М) (параметр микровязкости) в присутствии феррицианида калия (ФЦ, 0,1 М) (Sigma), не проникающего в неповрежденные клетки, а также ширину сигнала. Последний параметр и вид спектра характеризуют как подвижность зонда, так и взаимодействия между радикалами или между радикалами и дополнительными парамагнитными ионами [7]. Это позволяет в динамике характеризовать барьерные свойства мембран в отношении ионов ФЦ.

Клетки инкубировали в средах с различной концентрацией хлорида натрия при температуре 37 °С в течение различных промежутков времени (10 и 120 мин). Затем в суспензию добавляли зонд и уширяющий агент. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре «Bruker» 100 D (Германия) при температуре 20 °С. Методом спектрофотометрии [Ваша] показано, что при данных условиях и использованном диапазоне концентраций NaCl эритроциты быка не лизируют, т.е. их мембраны не проницаемы для гемоглобина.

Было обнаружено нетривиальное изменение параметра микровязкости при увеличении концентрации хлорида натрия в среде до 1,2 М (рис. 1).

Увеличение параметра вращения зонда наблюдалось вплоть до концентрации соли 1,8 М в среде. При более высоких концентрациях отмечено немонотонное изменение параметра (рис. 1). Некоторое уменьшение подвижности зонда при продолжительной инкубации клеток (120 мин) свидетельствует об определенной динамике обезвоживания эритроцитов. Регистрируемые изменения параметра вращательной подвижности зонда были незначительными, но воспроизведение этих изменений при различных временах инкубации позволяет сделать некоторые

предположения относительно природы изменения характеристик вращения цитозольного зонда.

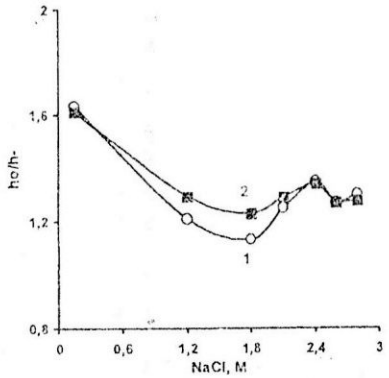


Рис.1. Влияние концентрации NaCl на параметр вращательной подвижности зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов быка (10^9кл./мл) в зависимости от времени инкубации (1–10 мин, 2–120 мин)

Поскольку увеличение концентрации соли в среде до 2,0 М сопровождалось увеличением ширины центральной компоненты сигнала ЭПР (рис. 2), «растормаживание» подвижности ТЕМПОН (видимое уменьшение параметра микровязкости) может отражать искажение спектров вследствие увеличения взаимодействия зондов с ионами внеклеточного ФЦ. Отмечена тенденция к смещению концентрационной зависимости ширины спектра при изменении продолжительности инкубации, особенно в зоне предлитических концентраций соли.

Можно предположить, что увеличение времени гипертонического воздействия на клетки сопровождается изменением состояния водно-белковой матрицы цитозоля и состояния мембран. Другими словами, более длительное инкубирование клеток в гипертонической среде (при определенной концентрации NaCl) приводит, возможно, к уменьшению взаимодействия радикалов с внеклеточными ионами ФЦ.

Немонотонный характер зависимостей параметров подвижности зонда в диапазоне концентраций соли 2,0–2,8 М указывает на более сложные процессы в клетках в предгемолитической

зоне. Можно предположить, что при этих концентрациях соли в среде в цитоплазме происходят структурные переходы, обусловленные изменением водно-белковых взаимодействий. Однако эти переходы не сопровождаются существенным увеличением доступности зонда для внеклеточных ионов, особенно при более продолжительной инкубации клеток.

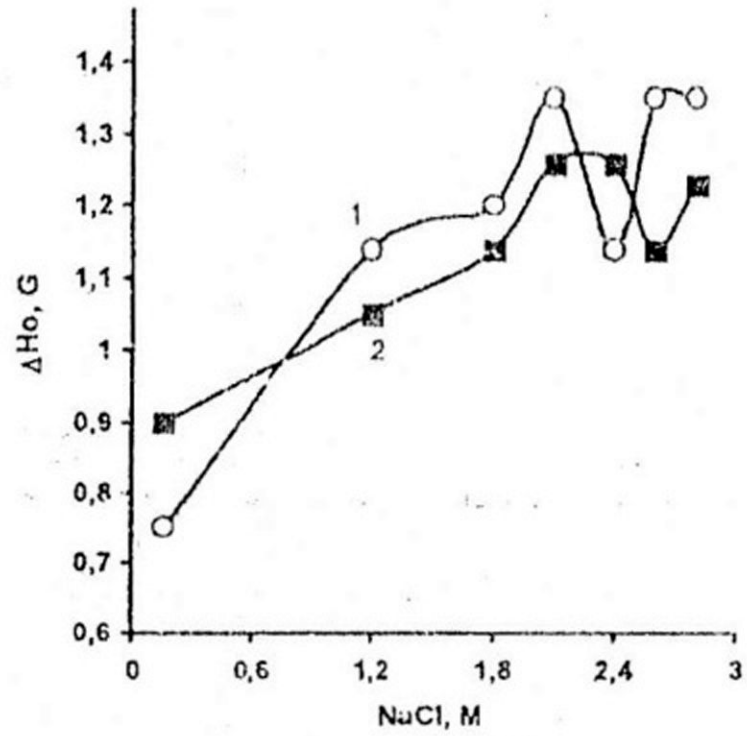


Рис. 2. Влияние концентрации NaCl и времени инкубации (1–10 мин, 2–120 мин) на параметр ширины центральной компоненты спектра ЭПР зонда ТЕМПОН в цитоплазме эритроцитов быка (10^9 кл./мл)

Помимо структурных переходов в цитозоле эритроцитов в результате удаления определенной части осмотически активной воды, следует принять во внимание возможность модификации динамической структуры мембран, сопровождающей изменение ее стерических параметров [8]. Вклад обоих механизмов в эффективность взаимодействия внутриклеточных зондов с внеклеточными ионами при варьировании количества так называемой свободной воды требует дальнейших исследований.

SODIUM CHLORIDE INFLUENCE ON DYNAMIC STRUCTURE OF WATER-PROTEIN MATRIX OF BOVINE ERYTHROCYTE CYTOPLASM

Tsymbal L. V., Shpakova N. M.[1], Ershov S. S., Orlova N. V.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine Kharkov, tsymbalgtp@mail.ru, [1]starling_nataly@mail.ru

Dynamic structure of bovine erythrocyte cytoplasm was studied by means ESR spin probe method using hydrophilic probe TEMPON. It has been shown, that water-protein matrix state of cytosol under NaCl hypertonic concentrations and incubation time effect was modified. The effect mechanism was assumed to be stipulated by both changes in cytosol water-protein interactions and membrane dynamic structure state.

Литература

1. Цымбал Л. В., Шовкопляс С. В., Белоус А. М. Исследование вода-белок-липидных взаимодействий в эритроцитах пойкилотермного организма // Пробл. криобиологии. 1995. № 1. С. 10-14.
2. Браун А. Д. Моженок Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л.: Наука, 1987. 232 с.
3. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. – М.: Наука, 198. – 294 с.
4. Цымбал Л. В. Влияние неспецифических факторов на динамическую структуру цитоплазмы эритроцитов // Пробл. криобиологии. 2000. № 3. С. 8-14.
5. Bogner P., Sipos K., Ludbny A., Somogyi B., Miseta A. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes // Eur. Biophys. J. 2002. V. 31. P. 145-152.
6. Ершов С. С., Орлова Н. В., Шпакова Н. М. Чувствительность эритроцитов млекопитающих к изменению температурных и осмотических условий среды // Пробл. криобиологии. 2004. № 3. С.51-57.
7. Кузнецов А.И. Метод спинового зонда (основы и применение). М.: Наука, 1976. С. 95-103.
8. Єршов С.С. Залежність об'єму еритроцитів ссавців від часу інкубації та складу гіпертонічного середовища // Збірник тез третьої Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів. Львів, 2007. С. 467-468.