

УДК 577.1 : 612.015.347

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ И СПЕКТРА БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТОВ У КРЫС

© 2010 г.

А.В. Дерюгина, В.Н. Крылов, Е.В. Кондратьева

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

kfg@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 15.10.2010

Изучены механизмы взаимосвязи электрофоретической подвижности эритроцитов и их белкового состава при развитии стресс-реакции у крыс. Установлено, что снижение электрофоретической подвижности эритроцитов и изменение белкового профиля при стрессе может быть опосредовано активацией бета-адренорецепторов мембраны и предотвращается после их блокады.

Ключевые слова: электрофоретическая подвижность эритроцитов, эритроцитарные белки, адренорецепторы.

В основе жизнедеятельности организма лежат общие приспособительные реакции к постоянно меняющимся факторам окружающей среды [1]. Изучение мембранных механизмов адаптации к экстремальным внешним воздействиям подтверждает правоту о закономерном изменении мембранных структур клеток при развитии в организме стресс-реакции и формировании адаптационного ответа. При характеристике реакций клеточных мембран на стресс, в дополнение к достаточно подробно изученным в литературе биохимическим изменениям, с успехом могут быть использованы данные об электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ). ЭФПЭ тонко реагирует на изменение состояния организма [2, 3]. Исследование изменения электрокинетического потенциала эритроцитов при различных видах патологии и экстремальных воздействиях свидетельствует о снижении электрофоретической подвижности эритроцитов с последующим ростом данного показателя по мере развития адаптационных процессов в организме. Учитывая, что ЭФПЭ определяется суммарным зарядом их мембраны, главным образом зависящим от состояния мембранных белков, можно предположить, что типовые изменения ЭФПЭ связаны с такими же типовыми структурными перестройками белков мембран эритроцитов. В свою очередь, изменения структуры мембраны могут быть следствием взаимодействия ее рецепторов со стресс-реализующими агентами – катехоламинами и кортикостероидами. Ранее нами было установлено, что ЭФПЭ является отражением общей неспецифической реакции организма на раздражитель и связана с развитием стресс-

реакции и вовлечением стресс-реализующих систем в ответ на действие чрезвычайных раздражителей [4]. В связи с указанным, целью работы было изучение взаимосвязи изменения ЭФПЭ и белкового профиля мембраны эритроцитов при моделировании стресса у крыс, а также участия в этом адренорецепторов.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 50 нелинейных белых крысах-самках массой 200–250 г. Содержание животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Животных кормили натуральными и брикетированными кормами в соответствии с утвержденными нормами. Животные прошли карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 14 суток.

Крысы были разделены на 5 равных по численности групп. Стресс-реакцию моделировали путем внутрибрюшинного введения пчелиного яда животным в дозе 0.1 мг/кг. Для исследования механизмов реализации стресс-реакции 2-й группе животных внутрибрюшинно вводили блокатор β-адренорецепторов (пропранолол, 0.2 мг/кг), а 3-й группе – пчелиный яд на фоне пропранолола (спустя 10 мин после инъекции пропранолола). Контролем служили крысы после внутрибрюшинного введения 0.9% хлорида натрия (4-я группа), дополнительно исследовали кровь интактных крыс (5-я группа).

Забор крови производили из подъязычной вены через 15, 30, 60, 120 минут после

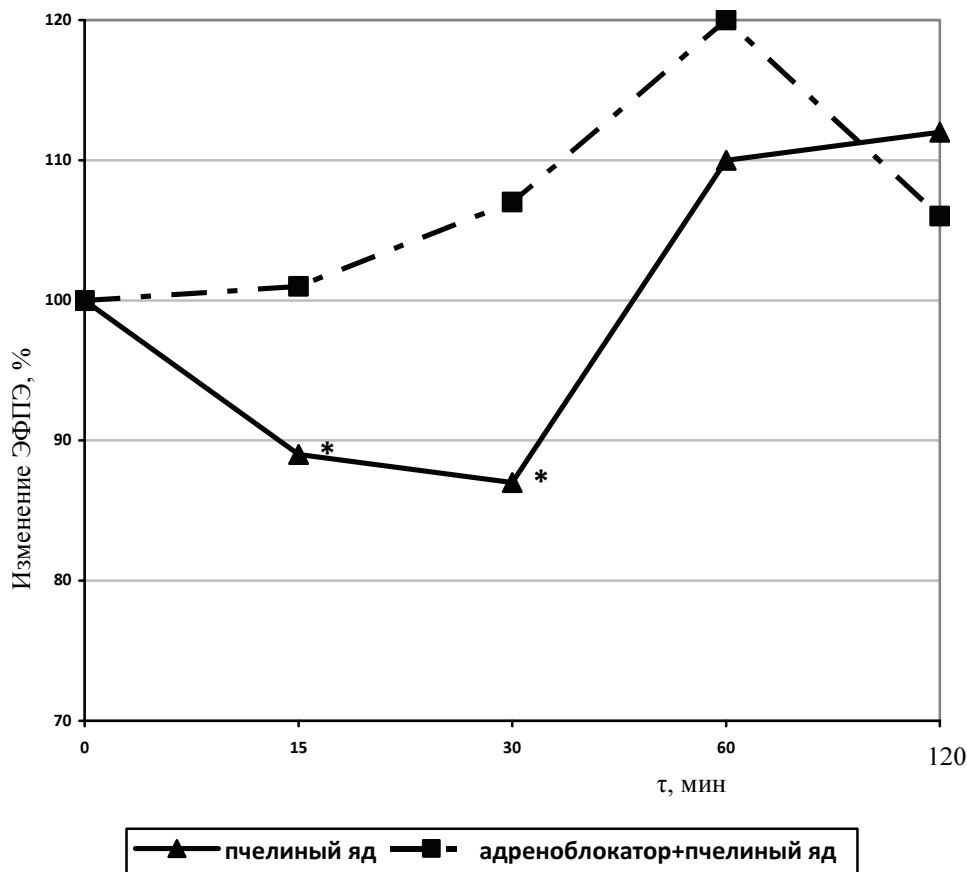


Рис. 1. Электрофоретическая подвижность эритроцитов крови крыс ($\mu\text{км см В}^{-1}\text{с}^{-1}$) при различных видах воздействия. * – отмечены статистически значимые различия между группами «пчелиный яд» и «адреноблокатор + пчелиный яд»

воздействия. Исследовали динамику изменения ЭФПЭ и белковый спектр их мембран. Используемые в опытах эритроциты трижды отмывали 0.85%-ным раствором хлористого натрия, центрифугируя 10 мин при 1500 об/мин. Измерение ЭФПЭ проводили методом микроэлектрофореза [5], регистрируя время прохождения эритроцитов расстояния 10 $\mu\text{км}$ в трис-НСI буфере с pH 7.4 при силе тока 10 мА. Разделение белков мембран эритроцитов проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ). Электрофорез в ДСН-ПААГ проводили по методу Лэммли [6] с использованием камеры Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA). Для приготовления гелей использовали 30%-ный раствор акриламида/метилен-бис-акриламида. Буфер для приготовления концентрирующего геля содержал 0.5М трис-ОН, 0.4% ДСН, pH 6.8. Для приготовления разделяющего геля использовали буфер, содержащий 1.5М трис-ОН, 0.4% ДСН, pH 8.8. Камеры для проведения электрофореза заполняли буфером, содержащим

0.025М трис-ОН, 0.192М глицин, 0.1% ДСН, pH 8.3. Полимеризацию проводили в присутствии TEMED и 10% персульфата аммония (APS) при комнатной температуре. Объем наносимых проб составлял 20 $\mu\text{ккл}$. Перед нанесением образцы разводили буфером для проб (0.0625М трис-НСI, 10% глицерин, 0.001% бромфеноловый синий, 5% β -меркаптоэтанол, 2.3% ДСН, pH 6.8) и прогревали на водяной бане (100°C) в течение 10 мин. Во время прохождения пробами концентрирующего геля, электрофорез проводили при постоянной силе тока 20 мА. В разделяющем геле сила тока составляла 40 мА. По окончании электрофореза гель окрашивали 30–60 мин в растворе, содержащем Coomassie Blue R250, 40% метанола, 10% уксусной кислоты. Несвязанный краситель удаляли отмывкой геля в растворителе (40% метанола, 10% уксусной кислоты).

Количественный анализ спектра белков осуществляли с помощью программы *Onedescan* для *Windows* 98 и представляли в процентах площади каждой фракции белков от суммы площадей всех пиков на хроматограмме.

Таблица

Спектр белков (фракции, % от общего содержания белков) эритроцитарных мембран при различных видах воздействия к 15-й минуте эксперимента

Белковые фракции	Интактные	Физиологический раствор	Пчелиный яд	Блокатор β -адренорецепторов	Блокатор + пчелиный яд
Спектрин	10.0±1.5	10.6±0.9	9.2±1.0	10.9±2.6	12.3±1.6
Анкирин	5.5±1.0	4.0±0.7	4.1±1.3	4.0±0.9	4.5±1.2
2.2	2.5±0.5	3.0±0.5	4.9±1.0*	3.8±1.0	4.7±0.5*
2.6	2.1±0.3	2.0±0.3	3.6±0.9	2.8±2.2	1.9±0.3
3	32.0±2.2	32.5±3.0	26.2±2.2*	28.7±2.6	35.1±3.0
4.1	3.5±0.7	4.6±1.2	6.8±0.9*	5.5±1.9	4.0±0.8
4.2	3.8±0.9	4.4±1.0	6.5±1.0*	5.7±2.2	4.4±1.4
Гликофорин А	7.9±1.0	7±1.2	5.4±1.1*	5.7±1.5	6.6±1.2
4.9	5.3±0.9	5.7±2.0	6.0±2.6	5.1±1.2	5.3±1.2
Актин	8.5±2.7	7.7±2.9	8.0±1.4	9.0±2.0	7.6±1.2
ГАФД	7.4±2.5	8.0±1.4	7.7±2.5	8.5±0.3	3.9±1.1
Тропомиозин	6.5±0.9	6.1±0.9	6.7±2.0	5.9±1.9	6.7±1.0
Гликофорин В	5.0±0.6	4.3±0.2	3.9±0.3*	4.4±0.6	3.0±0.8*

Примечание: * – $p < 0.05$ по отношению к уровню соответствующих белков до воздействия (интактная группа).

Результаты, полученные в ходе проведенного исследования, обрабатывали статистически с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных экспериментов выявлено, что введение животным стресс-агента – пчелиного яда приводило к типичной двухфазной реакции ЭФПЭ, выражающейся в форме депрессии ЭФПЭ (1-я фаза) с последующей ее элевацией, превышающей исходные значения (2-я фаза) (рис. 1). Физиологический раствор и бета-адреноблокатор вызывали незначительное изменение ЭФПЭ только на начальных этапах эксперимента. Введение пчелиного яда на фоне введения блокатора бета-адренорецепторов пропранолола отменяло реакцию снижения ЭФПЭ, но не влияло на повышение ЭФПЭ. Известно, что при стрессовых

ситуациях активация симпато-адреналовой системы является первичной. Отмечено, что в реакциях на стресс концентрация адреналина в плазме возрастает в десятки раз уже через несколько минут [7], в частности, при внутрибрюшинном введении пчелиного яда собакам на 1–5 минуте [8]. Анализируя наблюдаемое в опытах первичное уменьшение ЭФПЭ при альтерации организма и отмену данной фазы при действии стресс-агента на фоне блокады β -адренорецепторов, можно говорить о влиянии стрессоров через изменение адренореактивности клеток, вызывающих адаптивные изменения мембраны. Таким образом, установлено влияние β -адренорецепторов в реализации ЭФПЭ на стрессовое воздействие. Поскольку адренорецептор представляет белок и при взаимодействии с медиатором образует комплексное соединение, следует ожидать непосредственного влияния β -адренорецепторов на структурную модификацию белков эритроцитарной мембраны.

Учитывая, что до 90% отрицательного заряда клетки составляют сиаловые кислоты, которые находятся, в основном, в составе гликопротеинов [9, 10], нами проведено исследование динамики изменения белков эритроцитарной мембраны. Проведенное разделение белков мембран эритроцитов показало, что на фореграммах к 15 мин после воздействия пчелиного яда регистрировалось достоверное уменьшение фракций белка полосы 3, гликофоринов А и В, при относительном увеличении белков полос 2.2, 4.1, 4.2 ($p < 0.05$) и тенденция к уменьшению спектрина и анкирина по сравнению с контрольными образцами (таблица). Следует отметить, что блокатор β -адренорецепторов не вызывал достоверного изменения белкового состава мембран эритроцитов, хотя и наблюдалась тенденция к уменьшению концентраций белка полосы 3, гликофорина А при увеличении концентраций белков полос 2.2, 4.1, 4.2 по сравнению с контрольными образцами. При действии пчелиного яда на фоне блокады адренорецепторов эффекты, связанные с действием пчелиного яда, существенно нивелировались, что выражалось лишь увеличением концентрации белка п. 2.2. и снижении гликофорина В ($p < 0.05$). К 120 мин при действии пчелиного яда концентрация спектрина сохранялась пониженной, при восстановлении концентрации белков полос 2.2, 4.1, 4.2, гликофоринов и росте содержания белка полосы 3. Пропранолол вызвал отсроченное, по сравнению с действием пчелиного яда, уменьшение концентрации спектрина (отмеченное к 120 мин), уменьшение белков полос 2.2, 2.6 и рост белка п. 3.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что изменение ЭФПЭ сопряжено с модификацией белковой фазы мембраны. Учитывая, что белок полосы 3 и гликофорины являются основными сиалогликопротеинами эритроцитарной мембраны, углеводный компонент которых содержит значительное количество сиаловых кислот [11], а спектрин, анкирин, белки полос 2.2, 4.1 и 4.2 являются структурными компонентами цитоскелета, и через спектрин, анкирин белок полосы 4.1 связывается с белком полосы 3 и гликофорины [12–14], можно заключить, что стресс-реакция реализуется через изменение состава сиалогликопротеинов и белков цитоскелета, приводя к двухфазному изменению суммарного заряда эритроцитов. При этом отмена падения ЭФПЭ при действии пчелиного яда на фоне бета-блокатора адренорецепторов сочетается с нивелированием эффектов пче-

линого яда на белковый профиль за счет предварительной блокады бета-адренорецепторов. Таким образом, механизм снижения ЭФПЭ в 1-ю фазу действия пчелиного яда как стресс-агента связан с активацией β -адренорецепторов мембраны эритроцитов, которые, в свою очередь, определяют модификацию белков эритроцитарной мембраны.

Представленная работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, ГК № П604.

Список литературы

1. Гильмутдинов Р.Я. Электрокинетические характеристики клеток крови и их взаимосвязь с другими гематологическими показателями в норме и патологии: Автореф. дис... д-ра биол. наук. Казань, 1994. 34 с.
2. Крылов В.Н., Густов А.В., Дерюгина А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов и стресс // Физиология человека. 1998. Т. 24. № 6. С. 108–111.
3. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Антипенко Е.А. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов и их фосфолипидный состав при разных заболеваниях // Клинич. лаб. диагностика. 2009. № 9. С. 37–40.
4. Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях // Бюл. экп. биол. и мед. 2005. Т. 136. № 4. С. 364–366.
5. Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. Минск: Беларусь, 1974. 143 с.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1979. V. 227. № 259. P. 680–685.
7. Тюрина О.А., Кузьмин А.И., Медведев О.С. Дифференцированная активация симпатической нервной системы и выброса катехоламинов при нейрогликопении у бодрствующих крыс // Бюл. экп. биол. и мед. 1997. Т. 124. № 11. С. 509–512.
8. Vick J.A. et al. Beta-adrenergic and antiarrhythmic effects of a compound of bee venom // Amer. bee. J. 1972. № 112. P. 288–292.
9. Donath E., Pastushenko V. Electrophoretic study of cell surface properties, theory and experimental applicability // Bioelectrochem. and bioenerg. 1980. V. 7. P. 31–40.
10. Seaman G.V.F. et al. Surface alterations of erythrocytes with cell age // Bioch. and bioph. reserch communications. 1983. V. 97. P. 107–113.
11. Owens J., Mueller I., Morison M. A minor siialoglycoprotein of the human erythrocytes membrane // Biochem., biophys. 1980. V. 204. P. 247–254.
12. Weaver D.C., Marchesi V.T. The structural basis of ankyrin function // Biol. chem. 1984. V. 259. P. 6165–6169.

13. Schwartz R. et al. Protein 4.1 in sickle erythrocytes // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 1566–1567.

14. Takakuwa, T. Regulation of cell membrane protein interaction implication for red cell function // Curr. Opin in Hematology. 2001. V. 8. P. 80–84.

INTERRELATION OF RAT ERYTHROCYTE ELECTROPHORETIC MOBILITY AND PROTEIN SPECTRUM OF ERYTHROCYTES

A.V. Deryugina, V.N. Krylov, E.V. Kondrat'eva

The interrelation mechanisms have been studied of erythrocyte electrophoretic mobility (EEM) and erythrocyte membrane protein composition at the development of the stress reaction in rats. It has been found that the EEM decrease and the change of the protein profile under stress can be mediated by the activation of membrane beta-adrenoceptors. These effects can be prevented after the blockade of beta-adrenoceptors .

Keywords: erythrocyte electrophoretic mobility, erythrocyte proteins, adrenoceptors.