

© Л. Е. Панин, П. В. Мокрушников

УДК 538.9 + 577.352.332/.335 + 577.175.5 + 577.31

ВОЗДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ ВИТАМИНА Е НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН*

Л. Е. Панин, П. В. Мокрушников (Новосибирск, Россия)

Методами флуоресцентного анализа исследовалось влияние синтетических производных витамина Е тиюфана и тиюфана-М на реологические свойства мембран эритроцитов. Первый препарат снижал микровязкость как в области липид-липидных, так и белок-липидных взаимодействий. Второй препарат снижал микровязкость в области белок-липидных взаимодействий и повышал в области липид-липидных взаимодействий. Проверка эффективности антиоксидантной защиты эритроцитарных мембран показала, что тиюфан значительно подавляет перекисное окисление липидов мембран и образование белково-липидных сшивок, восстанавливая реологические свойства эритроцитов. Данный препарат рекомендован нами для профилактики перекисного окисления липидов у лиц, работающих в условиях Арктики.

Ключевые слова: микровязкость мембран, перекисное окисление липидов, тиюфан.

Биологические мембраны – это жидкокристаллические структуры. Выполнение ими различных функций (транспорт газов через мембрану, рецепция гормонов, активация мембраносвязанных ферментов и др.) обусловлено обратимыми наноструктурными и структурно-фазовыми переходами [1–2]. Старение мембран связано с

накоплением в них необратимых структурных изменений. Большой вклад в этот процесс вносит перекисное окисление ненасыщенных связей жирных кислот фосфолипидов и образование белково-липидных сшивок. Перекисное окисление липидов значительно усиливается под влиянием колебаний магнитного поля Земли

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Панин Лев Евгеньевич – доктор медицинских наук, академик российской академии медицинских наук, директор, научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН.

E-mail: panin@soramn.ru

Мокрушников Павел Валентинович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии клетки, научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН.

E-mail: pwm64@ngs.ru

(геомагнитные бури), при действии на организм ионизирующей радиации. В высоких широтах это связано с активным проникновением в магнитосферу частиц «солнечного ветра» [3].

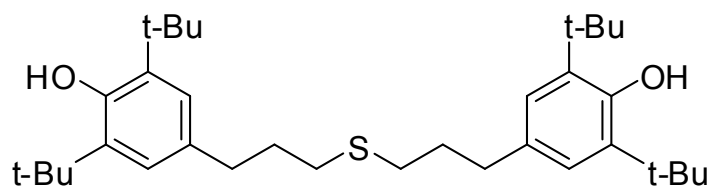
Естественной защитой биологических мембран от перекисного окисления липидов служит витамин Е (токоферол). Основным источником витамина Е и других антиоксидантов (витамины А, С) являются продукты питания. Нарушение режима питания, использование в пищу рафинированных продуктов создают дефицит природных антиоксидантов в организме, что способствует усилению перекисного окисления липидов биологических мембран и нарушению их функций [4]. Нежелательным последствием этих изменений в эритроцитарных мембранах является увеличение их вязкости и нарушение их реологических свойств. Это затрудняет продвижение эритроцитов по капиллярам и приводит к диффузной гипоксии тканей. На крайнем Севере это явление известно как

«полярная одышка» [5]. Перед современной медициной стоит важная задача обеспечить человека, работающего в условиях Арктики, дополнительным количеством антиоксидантов. Такие препараты были получены на кафедре химии Новосибирского государственного педагогического университета [6].

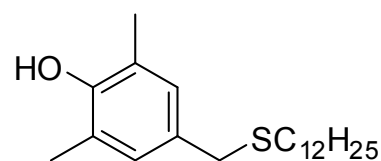
В данной работе была дана оценка эффективности антиоксидантных свойств производных витамина Е тиофан-М и тиофан с использованием в качестве модели биологических мембран плазматических мембран эритроцитов.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Материалы. В работе использовались производные витамина Е тиофан-М додецил-[3-(3',5'-диметил-4-гидроксибензил)метил]сульфид и тиофан бис-[3-(3',5'-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил)пропил]сульфид производства ФГБОУ ВПО «НГПУ», НИИ химии антиоксидантов.



тиофан



тиофан-М

Флуоресцентный анализ теней эритроцитов. Эритроциты получали из свежесывленной крови после декапитации самцов крыс линии Вистар под легким нембуталовым наркозом. Кровь разбавляли впятеро изотоническим фосфатным буфером pH 7.35, содержащим 0.043 М KH_2PO_4 и 0.136 М Na_2HPO_4 . После осаждения клеток с помощью центрифугирования при 330 г в

течение 10 мин надосадочную жидкость сливали и процедуру повторяли еще 2 раза. Тени эритроцитов были получены после их гемолиза в гипотоническом фосфатном буфере (pH 7.35), содержащем 2.75 мМ KH_2PO_4 и 8.5 мМ Na_2HPO_4 . Тени осаждались центрифугированием при 5500 г, надосадочная жидкость сливалась. Процедура

повторялась четыре раза. Получение и хранение теней производилось при 4°C.

Измерения флуоресценции проводились на спектрофлуориметре «Шимадзу» RF-5301(PC)SCE. В кварцевую кювету размером 1x1x4 см³ наливали 4 мл гипотонического фосфатного буфера содержащего 2,75 мМ КН₂РO₄ и 8,5 мМ Na₂НРO₄, рН=7,35 и тени эритроцитов. Концентрация белков теней определялась методом Варбурга и Кристиана по изменению оптической плотности взвеси [7]. В среднем она колебалась в пределах 0,200-0,350 мг/мл.

Кювета с взвесью теней помещалась в термостат спектрофлуориметра на 10 минут. Выход температуры в кювете на стационарный режим контролировался электронным термометром. Во всех экспериментах температура в кювете была 36°C. После выхода температуры в кювете на стационарный режим проводились контрольные измерения интенсивности собственной флуоресценции остатков триптофана в белках мембран. Снимался спектр излучения триптофана в диапазоне 300нм ≤ λ ≤ 400нм при длине волны возбуждения λ = 281нм, при этом максимум интенсивности излучения приходился на λ = 332нм. Спектральная ширина щелей 1,5/10.

Измерение микровязкости мембран эритроцитов. Измерения микровязкости мембран эритроцитов проводились на спектрофлуориметре «Шимадзу» RF-5301(PC)SCE. Опытный образец готовился следующим образом. В кварцевую кювету размером 1x1x4 см³ наливалось 4 мл гипотонического фосфатного буфера (рН 7.35), содержащем 2.75 мМ КН₂РO₄ и 8.5 мМ Na₂НРO₄, тени эритроцитов, необходимое количество производных витамина Е, флуоресцентный зонд пирен. Все компоненты до этого хранились при 4°C.

Концентрация белка теней в кювете составляла 0.200–0.350 мг/мл, пирена – 7.76x10⁻⁶ М. Пирен разводился в этаноле, его исходная концентрация составляла – 1.5x10⁻³ М. Кювету помещали в термостат спектрофлуориметра на 10 минут, после этого проводили измерения флуоресценции при температуре 36°C. Перед тем как поставить пробу в термостат спектрофлуориметра ее энергично встряхивали в течение 1 минуты. Для измерения флуоресценции теней при нагружении их другим количеством производных витамина Е каждый раз точно также готовилась новая проба. Такая процедура связана с тем, что пирен способствует быстрой деградации мембран эритроцитов.

Для измерения микровязкости липидного бислоя вблизи мембранных белков (область белок-липидного взаимодействия) использовалась длина волны возбуждения λ = 281 нм и спектральная ширина щелей 1.5/5. Микровязкость липидного бислоя вдали от мембранных белков (область липид-липидного взаимодействия) использовалась длина волны возбуждения λ = 337 нм и спектральная ширина щелей 1.5/3. Максимумы излучения наблюдались при λ = 374 нм и λ = 393 нм (вибронные пики излучения мономеров пирена), и λ = 468 нм (максимум излучения димеров пирена).

Относительная микровязкость мембран описывалась отношением $L = \frac{\eta(A)}{\eta(0)}$, где η(A) и η(0) микровязкости мембран при добавлении во взвесь тиофана концентрации А и без добавления тиофана, соответственно. Для области липид-липидного взаимодействия относительная микровязкость L вычислялась по формуле

$$L = \frac{\eta(A)}{\eta(0)} = \frac{F_{468}(0)}{F_{468}(A)} \cdot \frac{F_{393}(A)}{F_{393}(0)}$$

где $F_{468}(A)$ интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 468$ нм при концентрации A гормона во взвеси; $F_{468}(0)$ интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 468$ нм при отсутствии гормона во взвеси. $F_{393}(A)$ and $F_{393}(0)$ интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 393$ нм при концентрации A гормона во взвеси и при отсутствии гормона во взвеси, соответственно.

Для области белок-липидного взаимодействия относительная микровязкость L вычислялась по формуле

$$L = \frac{\eta(A)}{\eta(0)} = \frac{F_{468}(0) - I_{468}}{F_{468}(A) - I_{468}} \cdot \frac{F_{393}(A) - I_{393}}{F_{393}(0) - I_{393}}$$

где I_{393} и I_{468} интенсивность флуоресценции триптофановых остатков в мембранных белках при $\lambda = 393$ нм и $\lambda = 468$ нм, соответственно. Относительная погрешность измерения относительной микровязкости равна 6 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была получена зависимость относительной микровязкости мембран эритроцитов L от удельной концентрации тиюфана-М во взвеси (рис. 1). В работе рассчитывалась удельная концентрация тиюфана-М и тиюфана: молярная концентрация этих молекул поделена на концентрацию белков теней во взвеси. Относительная микровязкость мембран в области липид-липидного взаимодействия при увеличении концентрации тиюфана-М вначале увеличивалась. После увеличения на 20 % она вышла на плато. В области белок-

липидного взаимодействия напротив, микровязкость уменьшалась на 12 % и выходила на плато. Интенсивность собственной флуоресценции остатков триптофана в белках мембран при добавлении тиюфана-М увеличивалась (рис. 2), при 10^{-9} моль/мг белка выходила на плато. При добавлении тиюфана микровязкость уменьшалась как в области липид-липидных взаимодействий, так и в области белок-липидных взаимодействий мембран (рис. 3). Микровязкость достигала минимума при $0.7 \cdot 10^{-9}$ моль/мг белка, при дальнейшем увеличении концентрации тиюфана микровязкость увеличивалась. Максимальное уменьшение микровязкости составляло 20 % для области липид-липидного взаимодействия и 15 % для области белок-липидного взаимодействия. Интенсивность собственной флуоресценции остатков триптофана в белках мембран при добавлении тиюфана также незначительно увеличивалась (рис. 4).

Можно предположить следующий механизм взаимодействия тиюфана и тиюфана-М с мембраной. Тиюфан и тиюфан-М, подобно холестерину, погружались в фосфолипидный бислой, закоривались своими фенольными кольцами с гидрофильными ОН-группами на внешней поверхности мембран, где много гидрофильных групп фосфолипидов и белков мембраны. В гидрофобную область мембран проникали жирнокислотные хвосты, содержащие сульфидную группу. Можно предположить, что эти хвосты так перераспределяли диполи воды, содержащиеся в биомембране, что микровязкость мембран уменьшалась. С другой стороны, подобно холестерину, тиюфан и тиюфан-М, по-видимому, могли увеличивать жесткость мембраны за счет

образования новых связей между своими активными группами и полярными группами фосфолипидов и белков мембраны. В случае тиофана-М механизм увеличения жесткости мембраны преобладал над его уменьшением, микровязкость в липид-липидной области увеличивалась. Диполи воды вытеснялись в область белок-липидных взаимодействий, где микровязкость уменьшалась, а интенсивность собственной флуоресценции остатков триптофана в белках мембран увеличивалась (рис. 3). Проникновение тиофана способствовало уменьшению микровязкости мембраны, но параллельно работал механизм увеличения микровязкости, что приводило к куполообразной форме зависимости микровязкости от концентрации тиофана.

Разницу во влиянии на микровязкость мембран тиофана и тиофана-М можно объяснить тем, что в тиофане атом серы находится дальше от бензольного кольца. Он проникал глубже в гидрофобную часть мембраны, мог более равномерно перераспределять диполи воды между жирнокислотными хвостами фосфолипидов. Молекулы воды, встраиваясь между жирнокислотными хвостами фосфолипидов, увеличивали расстояние между молекулами фосфолипидов и ослабляли взаимодействие между ними. Это приводило к уменьшению жесткости мембраны.

Исследовалось защитное действие тиофана от перекисного окисления липидов (ПОЛ) (рис. 5 и 6). Для моделирования ПОЛ во взвесь тений добавляли 3мМ перекиси водорода H_2O_2 . В результате ПОЛ происходит образование радикалов в области связей $C=C$ в жирнокислотных хвостах фосфолипидов. Это приводило к образованию сшивок между молекулами, усилению жесткости биомембран. При добавлении 3мМ перекиси водорода к взвеси

эритроцитов происходило увеличение относительной микровязкости мембран в области липид-липидного взаимодействия на 25 % (на рис. 5 горизонтальная линия). В области белок-липидного взаимодействия микровязкость снижалась на 8 % (рис. 5). При добавлении тиофана происходило уменьшение микровязкости мембран. При его удельной концентрации $0.3 \cdot 10^{-9}$ моль/мг белка микровязкость мембран восстанавливалась до контрольного значения 1. При концентрации тиофана $0.6 \cdot 10^{-9}$ моль/мг белка она достигала минимального значения, после этого начинала возрастать. Максимальное уменьшение микровязкости составляло примерно 20 % и в области липид-липидного взаимодействия и в области белок-липидного взаимодействия.

Тиофан является высокоэффективным ингибитором процессов свободно-радикального окисления, что обусловлено синергетическим сочетанием антирадикальной активности его фенольных групп с противопероксидной активностью бивалентной серы [6]. Тиофан уменьшает количество сшивок между молекулами фосфолипидов, тем самым уменьшая микровязкость биомембраны. Это позволяет эритроцитам более легко проходить по капиллярам, уменьшается артериальное давление, уменьшается возможность развития ишемической болезни сердца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально установлено, что тиофан и тиофан-М при добавлении во взвесь эритроцитов взаимодействуют с мембранами и уменьшают их микровязкость. Тиофан активно защищает мембрану эритроцитов от перекисного окисления липидов, уменьшает микровязкость мембран и восстанавливает реологические свойства эритроцитов.

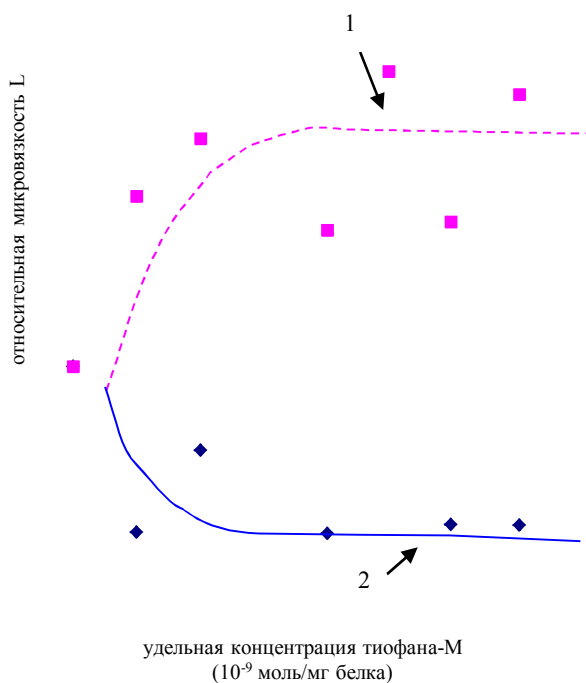


Рисунок 1.
 Зависимость относительной микровязкости мембран эритроцитов L от удельной концентрации тиофана-М во взвеси.
 Кривая 1 – область липид-липидного взаимодействия, кривая 2 – область белок – липидного взаимодействия.

Рисунок 2.

Зависимость тушения флуоресценции триптофана от удельной концентрации тиофана-М во взвеси.

F – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при добавлении тиофана-М, $F(0)$ – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при нулевой концентрации тиофана-М.

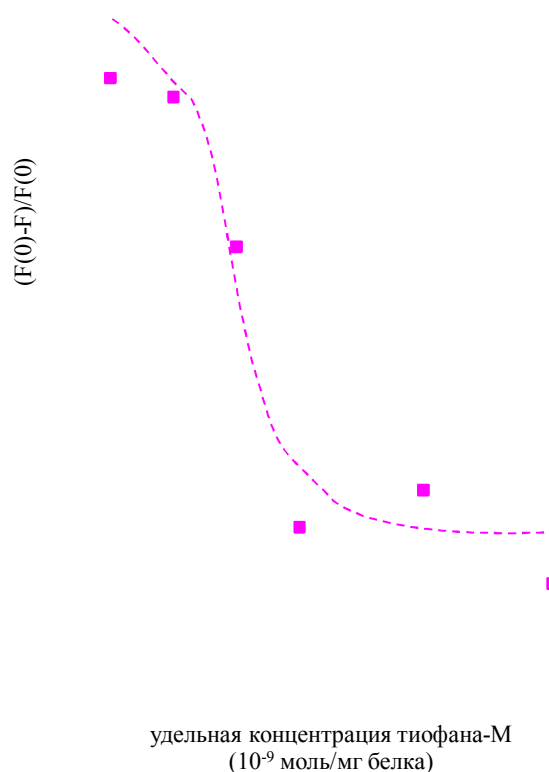
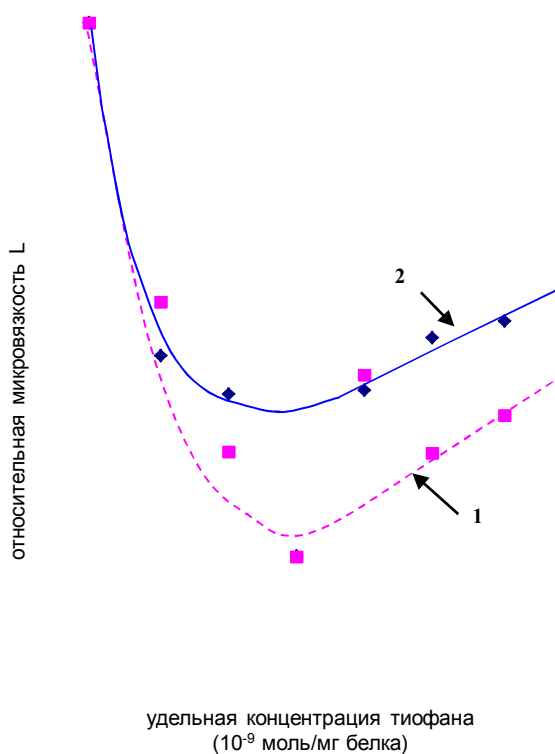


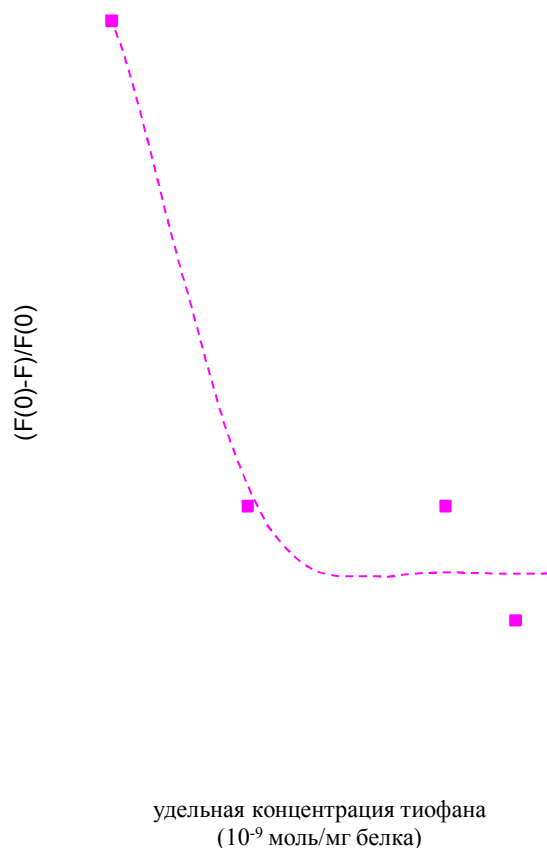
Рисунок 3.

Зависимость относительной микровязкости мембран эритроцитов L от удельной концентрации тиюфана во взвеси. Кривая 1 – область липид-липидного взаимодействия, кривая 2 – область белок – липидного взаимодействия.

**Рисунок 4.**

Зависимость тушения флуоресценции триптофана от удельной концентрации тиюфана во взвеси.

F – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при добавлении тиюфана-М, $F(0)$ – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при нулевой концентрации тиюфана.



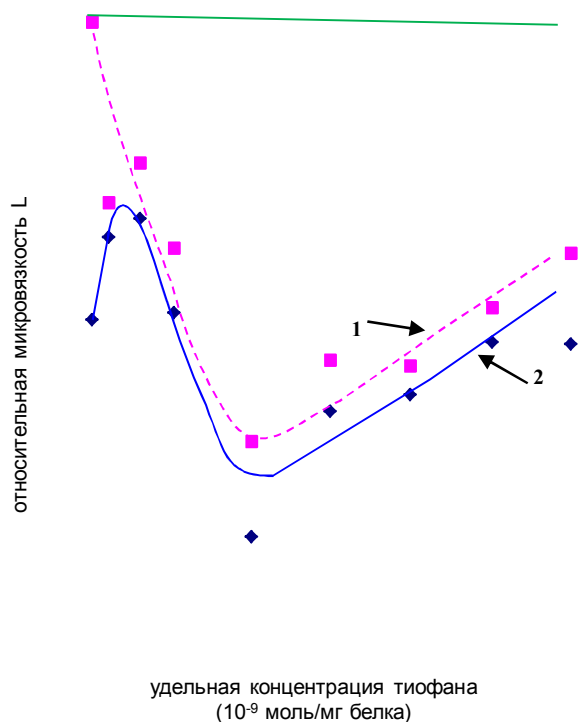
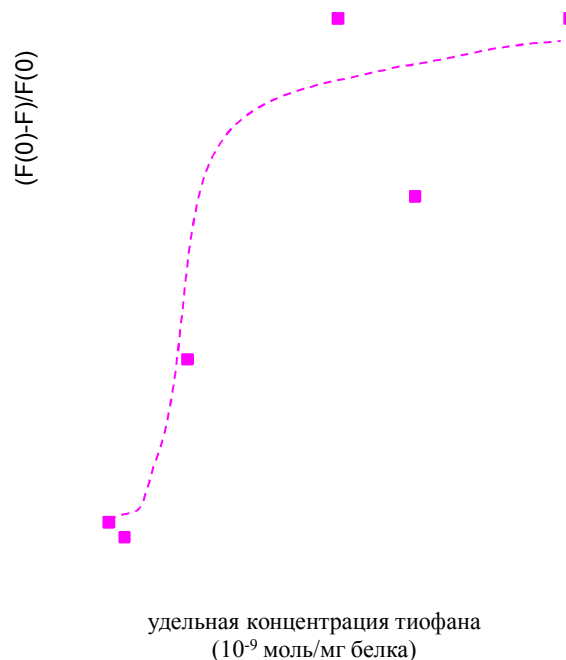


Рисунок 5.
 Зависимость относительной микровязкости мембран эритроцитов L от удельной концентрации тиофана во взвеси при добавлении во взвесь 3 мМ перекиси водорода. За единицу принята микровязкость мембран без добавления перекиси водорода и тиофана. Кривая 1 – область липид-липидного взаимодействия, кривая 2 – область белок – липидного взаимодействия. Горизонтальная прямая – значение относительной микровязкости в области липид-липидного взаимодействия при добавлении 3 мМ перекиси водорода без добавления тиофана.

Рисунок 6.

Зависимость тушения флуоресценции триптофана от удельной концентрации тиофана во взвеси при добавлении во взвесь 3 мМ перекиси водорода. F – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при добавлении тиофана, $F(0)$ – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при нулевой концентрации тиофана.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Панин Л. Е.** Детерминированные системы в физике, химии, биологии. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2006. – 202 с.
2. **Панин Л. Е., Мокрушников П. В., Куницын В. Г., Панин В. Е., Зайцев Б. Н.** Основы многоуровневой мезомеханики наноструктурных переходов в мембранах эритроцитов и их разрушения при взаимодействии с гормонами стресса// Физическая мезомеханика. – 2011. – т. 14. – № 1. – С. 5–17.
3. **Казначеев В. П., Куликов В. Ю., Панин Л. Е.** Особенности экологических факторов высоких широт/ Механизмы адаптации человека в условиях высоких широт / Отв. ред. Казначеев В. П. – Л.: Медицина, 1980. – С. 10–24.
4. **Панин Л. Е.** Человек в экстремальных условиях Арктики // Бюлл. СО РАМН. – 2010. – т. 30. – №3. – С. 92–97.
5. **Авцын А. П., Марачёв А. Г.** Проявления адаптации и дезадаптации у жителей Крайнего Севера // Физиология человека. – 1975. – т.4. – С. 3–14.
6. **Овчинникова Л. П., Роцкая У. Н., Васюнина Е. А., Сеницина О. И., Кандалинцева Н. В., Просенко Н. В., Невинский Г. А.** Антиокислительная активность тиофана [бис-[3-(3',5'-дигидротрет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида] // Биорг. Химия. – 2009. – Т. 35. – № 3. – С. 417–423.

© L. E. Panin, P. V. Mokrushnikov

UDC 538.9 + 577.352.332/.335 + 577.175.5 + 577.31

EFFECTS OF SYNTHETIC VITAMIN E DERIVATIVE ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF RED BLOOD CELL MEMBRANES

L. E. Panin, P.V. Mokrushnikov (Novosibirsk, Russia)

Methods of the fluorescent analysis was investigated action of derivatives of vitamin E tiofan and tiofan-M on rheological properties of membranes of erythrocytes. The first formulation reduced the microviscosity of a lipid-lipid, and protein-lipid interactions. The second drug reduced microviscosity of the protein-lipid interactions, and increased in the area of a lipid-lipid interactions. Checking the effectiveness of antioxidant erythrocyte membranes showed that thiophane significantly inhibits peroxidation of membrane lipids and the formation of lipid-protein cross-links, restoring the rheological properties of red blood cells. This drug is recommended by us to prevent lipid peroxidation in persons working in Arctic conditions.

Keywords: microviscosity of membranes, lipoperoxidation, tiofan

REFERENCES

1. **Panin L. E.** Deterministic systems in physics, chemistry, and biology. – Novosibirsk: Sib. Univ. Publishers, 2006. – 202 p.
2. **Panin L. E., Mokrushnikov P. V., Kunitsyn, V. G., Panin V. E., Zaitsev B. N.** Fundamentals of multilevel mesomechanics nanostructured transition in membranaz destruction of red blood cells and their interaction with stress hormones // Physical Mesomechanics. – 2011. – T. 14. – № 1. – Pp. 5–17.
3. **Kaznacheev V. P., Kulikov V. Yu., Panin L. E.** Features of ecological factors of high latitude / mechanisms of human adaptation to high latitudes / Red. Kaznacheev V. P. – Leningrad : Medicine, 1980. – Pp. 10–24.
4. **Panin L. E.** Man in the extreme conditions of the Arctic // Bull. RAMS. – 2010. – V. 30. – № 3. – Pp. 92–97.
5. **Avtsyn A. P. Marachev A. G.** Manifestations of adaptation and maladjustment among residents of the Far North // Human Physiology – 1975. – V. 4. – Pp. 3–14.
6. **Ovchinnikov L. P., Rotskaya U. N., Vasyunina E. A., Sinitsyna O. I., Kandalintseva N. V., Prosenko A. E., Nevinsky G. A.** Antioxidant activity of the Thiophane // Bioorg. Chemistry. – 2009. – Vol. 35. – N 3. – Pp.417–423.

Panin Lev Evgenjevich – Doctor of Medical Sciences, Academician of the Russian Academy of Medical Sciences, Director, State Research Institute of Biochemistry SB RAMS.

E-mail: panin@soramn.ru

Mokrushnikov Pavel Valentinovich – research associate, State Research Institute of Biochemistry SB RAMS.

E-mail: pwm64@ngs.ru