

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕМОГЛОБИНА С ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ В УСЛОВИЯХ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ

**Скоростецкая Л.А., Гудко Т.Г., Тимохова М.М., Литвинко Н.М.**

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

Биологическое действие полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) чрезвычайно разнообразно: они участвуют в регуляции большинства нормальных и патологических процессов. В организме С20-полиненасыщенные ЖК образуются из экзогенных ЖК: линоленовой, которая дает начало семейству ПНЖК типа  $\omega$ -3, и линолевой, которая метаболизируется в ПНЖК, имеющие строение  $\omega$ -6. Линолевая (18:2) и линоленовая кислоты (18:3) относятся к разряду незаменимых ПНЖК, не синтезирующихся в организме и поступающих исключительно с пищей.

Ранее нами показано, что нативный фосфатидилхолин (ФХ, 0,1 мМ) незначительно влияет на спектральные свойства гемоглобина (Hb) [1], а ФХ, облученный УФ в течение часа, может переводить Hb в гемихром [2]. В то же время, ранее обнаружено, что взаимодействие с гемоглобином отщепившихся под действием фосфолипазы A<sub>2</sub> (ФЛА<sub>2</sub>) от фосфолипидов ЖК приводит к изменению спектральных свойств гемоглобина при его переходе в гемихром [1], что может служить своеобразным индикатором всех процессов, происходящих с их участием, в том числе и поглощения квантов света в УФ-диапазоне.

Цель настоящей работы – изучение спектральных характеристик Hb в присутствии ПНЖК в условиях УФ-облучения.

Известно, что коротковолновое ультрафиолетовое (УФ) излучение поглощается в живых клетках, в основном, полиненасыщенными структурами [3], в том числе и ПНЖК, являющимися элементами фосфолипидов. При действии УФ на мембрану за счет разрушения неопредельных связей жирнокислотных остатков развивается перекисное окисление липидов (ПОЛ). Показано, что ЖК, накапливаясь в процессе липолиза, образуют в мембране домены, появление которых стимулирует активность ФЛА<sub>2</sub> [4], а также усиливают на 40-95% интенсивность флуоресценции ФЛА<sub>2</sub> при увеличении длины углеродной цепочки ЖК от 18 до 22 и числа неопредельных связей с 2 до 6. Обнаружено, что в процессе мицеллообразования полиненасыщенных жирных кислот (18:2, 18:3, 20:4, 22:6) происходит изменение собственной флуоресценции как

панкреатической ФЛА<sub>2</sub> (активная субъединица мономер), так и ФЛА<sub>2</sub> яда змеи (активная субъединица димер) [5- 3]. Такие домены ЖК могут иметь организованную структуру по принципу мицелл и также быть мишенью для УФ излучения.

Спектральные изменения *Hb*, являющегося тетрамером, оценивали по изменению в присутствии ЖК интенсивности (амплитуды,  $\Delta D$ ) дифференциальных спектров в диапазоне волн полосы Core (405 – 423 нм) на регистрирующем спектрофотометре *Specord uv-vis* (Германия) в режиме пропускания Т75-125% с использованием 4 пар кювет ( $V=1$  мл,  $l=1$  см). В качестве эффекторов изучали следующие ЖК: пальмитиновую (ПК, С16:0), олеиновую (ОК, С18:1), линолевую (2ЛК, С18:2) и  $\gamma$ -линоленовую (3ЛК, С18:3) в виде спиртовых растворов (1 мМ). Для получения контрольных кинетических кривых (до облучения УФ) к опытной кювете каждой пары уравновешенных кювет, содержащих *Hb*, добавляли ЖК (по 30 мкл 1 мМ раствора), содержимое кюветы перемешивали и каждые 30 секунд в течение 4 минут записывали дифференциальные спектры.

Облучение образцов ЖК осуществляли с помощью облучателя медицинского назначения ОКУФ 5М, имеющего в качестве источника УФ ртутно-кварцевую лампу ПРК-4. Флаконы со спиртовыми растворами ЖК (по 200 мкл 1 мМ) помещали под источник УФ на 60 мин.

Регистрацию спектральных изменений *Hb* под действием УФ-облученного раствора ЖК также проводили каждые 30 сек в течение 4 мин.

Сравнение действия облученных и необлученных ЖК на *Hb* (рис. 1) показывает, что  $\Delta D$  увеличивается как минимум вдвое для всех ПНЖК. При этом четко прослеживается зависимость изменения дифференциального спектра гемопротеида от числа двойных связей в молекуле ПНЖК.

Показано, что изменение амплитуды дифференциальных спектров *Hb* зависит также от продолжительности облучения ЖК, причем, для достижения максимального эффекта ЖК с большим числом двойных связей требуется меньше времени. Максимальный эффект для линоленовой кислоты наблюдался через 30 мин УФ-облучения, для олеиновой – через 60 мин (рис.2).

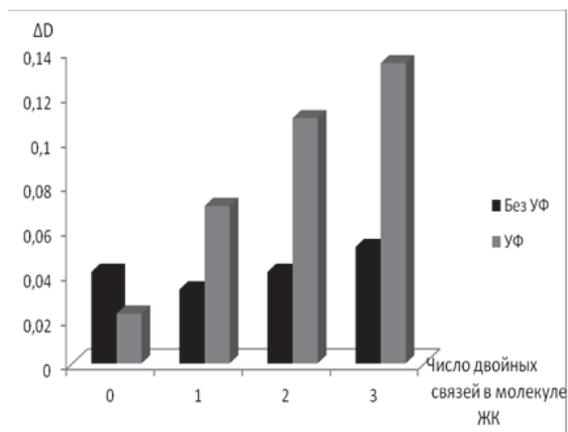


Рис. 1. Зависимость  $\Delta D$  дифференциальных спектров *Hb* от числа двойных связей ЖК до облучения (черные столбики) и после (серые столбики). Условия облучения:  $[ЖК]=1$  мМ,  $V=200$  мкл, 4 см до источника облучения, 30 мин,  $t^{\circ}$ комн. Условия регистрации спектров:  $[Hb]=5$  мкМ,  $[ЖК]=30$  нмоль/мл *Hb*,  $t^{\circ}$ комнатная

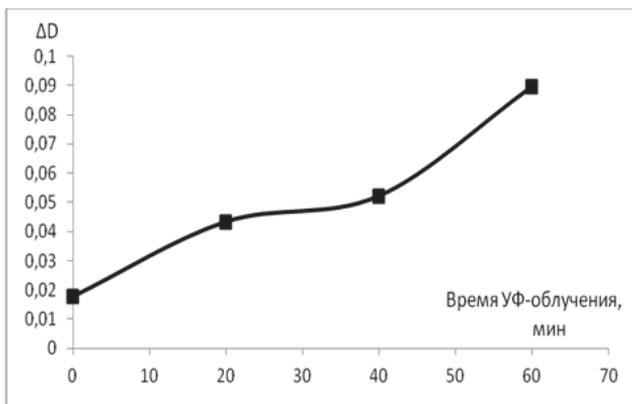


Рис. 2. Зависимость  $\Delta D$  от времени облучения

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что с помощью регистрации спектральных изменений гемопротеида под действием УФ-облученных ПНЖК можно также определять степень окисления липидной фазы. Однако количественная характеристика данного процесса требует дальнейших углубленных исследований.

### **Литература**

1. Litvinko, N.M. Study of phospholipase A2 hydrolysis using conversion of methemoglobin to hemoglobin / N.M. Litvinko, G.M. Andreyuk, M.A. Kisel // *Faseb. J.*, – 1997. – Vol.11, №9. – P. 2623.
2. Литвинко, Н.М. Взаимодействие фосфолипазы А2 с фосфатидилхолином в условиях УФ-облучения / Н.М. Литвинко, Л.А. Скоростецкая, Д.О. Герловский // *Труды XIX Менделеевского съезда, Волгоград.* – 2011. – Т.1. – С.268.
3. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в первичных фотобиологических процессах / Ю.А. Владимиров // *Биол. мембраны.* – 1998. – Т. 15, вып. 5. – С. 517-529.
4. Burack, W. R. Role of lateral phase separation in the modulation of phospholipase A2 activity / W. R. Burack, Q. Yuan, R. L. Biltonen // *Biochemistry.* – 1993. – Vol.32, № 2. – P.583-589.
5. Литвинко, Н.М. Функционирование фосфолипаз А<sub>2</sub> в условиях взаимодействия с полиеновыми жирными кислотами при формировании мицеллярной фазы / Н.М. Литвинко, С.В. Бабицкая, С.В. Кучуро, Г.Н. Рахуба // *Доклады НАН Беларуси.* – 2004. – Т.48, №6. – С. 57-61.

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ НИЗКИХ ЗНАЧЕНИЙ pH НА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ СИНАПСОМ**

**Федорович С.В., Дубовская Т.Г., Гриневич С.В., Васим Т.В.**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь*

Ишемия мозга сопровождается снижением вне- и внутриклеточного pH. Ранее нами было показано, что внеклеточное, но не внутриклеточное закисление в синапсосомах мозга крыс вызывает деполяризацию митохондриальных мембран с последующим образованием активных форм