

КИНЕТИКА ТЕПЛОВОЙ ДЕНАТУРАЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПРИ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

© 2018 г. Н.К. Кличханов, А.М. Джафарова

Дагестанский государственный университет, Махачкала, ул. М. Гаджиева, 43а

E-mail: albina19764@mail.ru

Поступила в редакцию 22.01.18 г.

После доработки 26.04.18 г.

Исследована термостабильность ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов крыс в норме и умеренной гипотермии. Показано, что кинетика термоденатурации ацетилхолинэстеразы нелинейна и соответствует модели, предполагающей денатурацию одной нативной формы его в две стадии: медленную и быструю. Константы скорости быстрой фазы (k_1) намного выше медленной (k_2), при этом энергия активации быстрой фазы всего на 19,4% ниже медленной. Кратковременная умеренная гипотермия способствует повышению k_1 и снижению показателя относительной активности промежуточной формы ацетилхолинэстеразы (параметра β), при этом энергии активации обеих стадий существенно снижаются, а параметр β становится более зависим от температуры. Пролонгирование гипотермии до трех часов способствует, главным образом, снижению k_1 и k_2 относительно кратковременной гипотермии, при этом энергии активации денатурации увеличиваются. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о лабильности структуры ацетилхолинэстеразы на начальных этапах развития гипотермического состояния и ее стабилизации при пролонгировании гипотермии.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, кинетика термоденатурации, мембрана эритроцитов, гипотермия, крысы.

DOI: 10.1134/S0006302918040063

Температура – один из важнейших экологических факторов, определяющих скорости химических, физических и биологических процессов [1]. От температуры зависит стабильность биологических структур и, прежде всего, стабильность молекулярных структур. Изменение температуры может привести к нарушению баланса между двумя важными качествами макромолекул – стабильностью и лабильностью, что может привести к нарушению их функций. По этой причине возникает необходимость в выработке соответствующих адаптивных механизмов, способствующих сохранению их функциональных свойств при изменении температуры среды и тела [2].

У теплокровных животных температура тела гомеостатирована в определенном температурном диапазоне. При низких температурах окружающей среды, когда происходит интенсивная теплоотдача, терморегуляторные механизмы могут не справиться с этой задачей и температура тела может значительно снизиться.

Эти состояния, называемые гипотермическими, очень опасны для гомойотермного организма и требуют с его стороны немедленной реакции, направленной на выживание [3]. У гомойотермных организмов острая реакция на холодный стресс включает в себя начальный, управляемый нервной системой сократительный термогенез, который сменяется на управляемый гормонами несократительный термогенез. Системным эффектом этих реакций является повышение потребления кислорода, окислительного метаболизма и выработки тепла. Возникающая при этом вазоконстрикция, с одной стороны, и увеличение вязкости крови, повышение уровней фибриногена и гематокрита, с другой стороны, нарушает микроциркуляцию, что приводит к снижению скорости кровотока и доступности кислорода для тканей, приводящей к нарушению их функций [4,5]. Активация окислительного метаболизма и возникающая при этом гипоксия и ацидоз способствуют повышенной продукции активных форм кислорода и развитием окислительного стресса [6–8]. Проведенные нами исследования позволили установить, что при кратковременной умеренной гипотер-

Сокращение: АХЭ – ацетилхолинэстераза.

мии (температура тела 30°C) и ее пролонгировании в течение полутора часов существенно активируются процессы окислительной модификации как липидов, так и белков мембран эритроцитов крыс [9]. Окислительная деструкция липидов и белков мембран может сказаться на структуре и свойствах связанных с мембранами ферментов, рецепторов, транспортных белков. Одним из ферментов, закоренным на внешней мембране эритроцитов, является ацетилхолинэстераза (АХЭ), «нейрональным» функциям которой в последние годы уделяют большое внимание. Было обнаружено, что АХЭ может связываться с субъединицами G-белка ($G\alpha_{1/2}$ и $G\beta$) эритроцитов и тем самым влиять на степень фосфорилирования С-конца белка полосы 3, что может привести к модуляции процессов оксигенации эритроцита и метаболизма в нем оксида азота [10]. Столь важная роль АХЭ в эритроцитах предполагает необходимость изучения механизмов ее функционирования при гипотермических состояниях.

Ранее нами было показано, что при кратковременной умеренной гипотермии активность и кинетические характеристики АХЭ в составе мембран эритроцитов существенно изменяются, а при пролонгировании состояния гипотермии до трех часов происходит их нормализация [11]. Однако механизмы этих изменений не вполне ясны. Одним из способов изучения механизмов изменения активности ферментов при различных физиологических состояниях организма является исследование их термостабильности. Термостабильность является важной характеристикой фермента, весьма чувствительной к структурным изменениям в самой молекуле и ее окружении [12].

Целью данной работы является изучение кинетических параметров термоденатурации АХЭ эритроцитарных мембран при гипотермии и ее пролонгировании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар (возраст три с половиной месяца, масса 200–220 г). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. При выполнении настоящего исследования были соблюдены все нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

Моделирование гипотермии. Животные были разделены на три группы по восемь животных в каждой: группа 1 – контрольная (температура тела 37°C); группы 2 и 3 – животные, подвергнутые гипотермии. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная (5°C) вода. Температуру тела крыс снижали равномерно со скоростью 0,23°C/мин до 30°C (кратковременная умеренная гипотермия) и поддерживали этот уровень гипотермии в течение трех часов (пролонгированная умеренная гипотермия). Температуру измеряли в прямой кишке на глубине 4–5 см ректальным цифровым термометром MS6501.

Получение мембран эритроцитов. После декапитации животного кровь собирали в пробирку с гепарином. Для осаждения эритроцитов кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин на холоду. Осадок эритроцитов трижды промывали холодным физиологическим раствором. Мембраны отмытых эритроцитов получали по методу Доджа [13] после осмотического гемолиза. Белые тени эритроцитов замораживали при –20°C и использовали на следующие сутки. Белок во фракции мембран эритроцитов определяли по методу Лоури [14].

Определение активности ацетилхолинэстеразы. Активность АХЭ определяли по методу Элмана [15], используя в качестве субстрата ацетилтиохолин иодид (Sigma, США). В термостатируемую при 37°C кювету спектрофотометра DU700 (Beckman Coulter, США) вносили 1,45 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 8,0 и 0,05 мл суспензии мембран эритроцитов (40–50 мкг белка). Затем добавляли 0,05 мл 0,01 М раствора 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты) (Sigma, США). Реакцию запускали добавлением 0,02 мл раствора ацетилтиохолин иодида. Изменение оптической плотности раствора в ходе гидролиза ацетилтиохолин иодида, катализируемой АХЭ, регистрировали при 412 нм в течение 2 мин с интервалом 10 с относительно контрольной пробы, содержащей все компоненты реакционной среды, кроме суспензии мембран. Параллельно регистрировали изменение оптической плотности контроля, в которую вместо суспензии мембран вносили соответствующий объем 0,1 М фосфатного буфера. Расчет активности фермента (в мкмоль/мг белка/мин) проводили, используя коэффициент молярного поглощения аниона 5-тио-2-нитробензоата, который равен $1,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

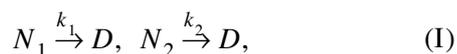
Исследование кинетики тепловой денатурации ацетилхолинэстеразы. Для определения термостабильности АХЭ суспензию мембран эритроцитов инкубировали в 0,1 М фосфатном бу-

фере, рН 8,0 при температурах 40, 43, 46, 49°C. Температуру поддерживали с точностью ±0,1°C. Через заданные интервалы времени из суспензии отбирали аликвоту и ставили на лед для остановки реакции. Затем определяли остаточную активность АХЭ с ацетилтиохолин иодидом в качестве субстрата (концентрация 0,5 мМ) при температуре инкубации 37°C в 0,1 М фосфатном буфере, рН 8,0. По полученным данным строили кинетические кривые тепловой денатурации АХЭ в координатах ($A_t/A_0, t$), где A_0 – начальное значение активности фермента до денатурации, A_t – активность фермента в момент времени t , t – время инкубации при температуре денатурации. Кинетические кривые были использованы для вычисления констант скорости денатурации фермента при разных температурах инкубации. По полученным данным температурной зависимости констант скоростей денатурации строили линейные анаморфозы в координатах Аррениуса ($\ln K, 1000/T$), по наклону которых вычисляли эффективные энергии активации.

Статистическая обработка результатов. Обработку данных производили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием программного пакета Statistica (StatSoft, США). Достоверность различия определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости $P = 0,05$. Каждая кривая на графиках концентрационной зависимости – среднее из восьми независимых экспериментов. Данные в таблице приведены в виде: среднее ± ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее при исследовании АХЭ синаптических мембран мозга крыс было показано, что кинетика термоденатурации фермента имеет нелинейный характер [16]. Мы предположили, что такая кинетика может соответствовать параллельной схеме с двумя нативными состояниями, денатурирующими с разными константами скорости:



где N_1, N_2 – нативные, D – денатурированные формы фермента, k_1 и k_2 – константы скорости денатурации.

Этой схеме соответствует кинетика денатурации, описываемая следующим уравнением [17]:

$$\frac{A_t}{A_0} = [a \exp(-k_1 t) + b \exp(-k_2 t)], \quad (Ia)$$

где k_1 и k_2 – константы скорости денатурации двух нативных (N_1, N_2) форм, a и b – начальные доли двух нативных форм ($a + b = 1$).

В данной схеме в неявной форме предполагается, что удельные активности обеих форм одинаковы, но их константы скорости денатурации разные, что свидетельствует о наличии двух различных изоформ АХЭ. Однако литературные данные свидетельствуют о том, что эритроциты экспрессируют на внешней поверхности мембраны только одну молекулярную форму АХЭ, представляющую из себя димер, заякоренный во внешнем листке мембраны фосфатидилинозитолом [18,19]. Поэтому такая схема и модель не могут вполне адекватно описать динамику денатурации АХЭ эритроцитов.

В связи с этим мы анализировали экспериментальные данные в соответствии с последовательной схемой, предполагающей денатурацию одной нативной формы фермента в две стадии: вначале нативная форма переходит в промежуточное состояние, а затем это состояние переходит в денатурированное [20]:



где N, X и D – нативная форма, промежуточное состояние и денатурированная форма фермента соответственно.

Математическая модель, соответствующая этой схеме, имеет следующий вид:

$$\frac{A_t}{A_0} = \exp(-k_1 t) + \frac{\beta k_1 (\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t))}{k_1 - k_2}, \quad (IIa)$$

где $0 \leq \beta \leq 1$ – относительная активность промежуточной формы по сравнению с нативной формой, активность которой принята равной 1.

На рис. 1 представлены кинетические кривые денатурации АХЭ мембран эритроцитов крыс, построенные в координатах ($A_t/A_0, t$) с использованием уравнения (IIa). Видно, что по мере повышения температуры инкубации денатурация происходит быстрее. При этом сами кинетические кривые носят нелинейный характер, что указывает на сложную динамику процесса денатурации. Из рис. 1 видно, что кинетика денатурации состоит из двух участков – начального быстрого и второго медленного.

Таким образом, регрессионный анализ показал хорошее соответствие экспериментальных данных теоретической модели (рис. 1). Пара-

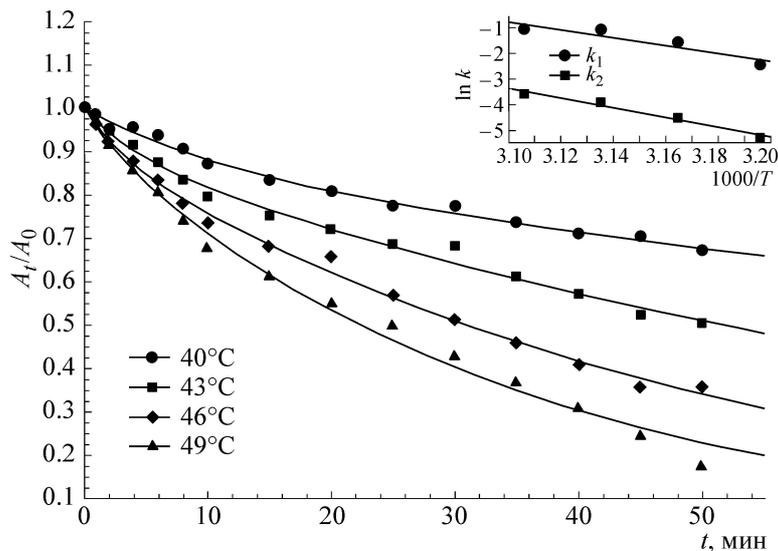


Рис. 1. Графики зависимости остаточной активности (A_t/A_0) АХЭ мембран эритроцитов контрольных крыс от времени инкубации при различных температурах денатурации. Точки на графиках соответствуют экспериментальным данным. Линии построены методом наименьших квадратов в соответствии с регрессионным уравнением (Па). Врезка: температурная зависимость констант скорости денатурации быстрой (k_1) и медленной (k_2) фаз в координатах Аррениуса.

метры регрессионного уравнения приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что с повышением температуры инкубации константы скорости денатурации увеличиваются, особенно для медленной стадии. Увеличение констант скорости денатурации при увеличении температуры инкубации говорит о том, что скорости перехода

из нативного состояния в промежуточное и из промежуточного в денатурированное увеличиваются. При этом значения k_1 при всех температурах инкубации на порядок выше таковых k_2 . Таким образом, наиболее существенный вклад в кинетику денатурации АХЭ вносит быстрая фаза. Параметр β незначительно зависит от температуры.

Таблица 1. Кинетические характеристики термоденатурации АХЭ мембран эритроцитов крыс в норме и при гипотермии ($M \pm m$, $n = 8$)

Параметры регрессионного уравнения	Температура денатурации, °C			
	40	43	46	49
Контроль				
k_1 , мин ⁻¹	0,0892 ± 0,0036	0,2259 ± 0,0102	0,3597 ± 0,0203	0,3571 ± 0,0427
k_2 , мин ⁻¹	0,0050 ± 0,0003	0,0115 ± 0,0008	0,0198 ± 0,0008	0,0282 ± 0,0014
β	0,8217 ± 0,0592	0,8587 ± 0,0398	0,8712 ± 0,0443	0,8657 ± 0,0312
Кратковременная гипотермия				
k_1 , мин ⁻¹	0,3181 ± 0,0250*	0,3031 ± 0,0134*	0,4739 ± 0,0383*	0,4180 ± 0,0242
k_2 , мин ⁻¹	0,0068 ± 0,0008	0,0077 ± 0,0008*	0,0118 ± 0,0007*	0,0197 ± 0,0009*
β	0,7211 ± 0,0145	0,6438 ± 0,0136*	0,6443 ± 0,0110*	0,5646 ± 0,0119*
Пролонгированная гипотермия				
k_1 , мин ⁻¹	0,2692 ± 0,0159*	0,2837 ± 0,0227*	0,2924 ± 0,0288 ⁺	0,5414 ± 0,0591* ⁺
k_2 , мин ⁻¹	0,0054 ± 0,0003	0,0070 ± 0,0005*	0,0105 ± 0,0010*	0,0281 ± 0,0014 ⁺
β	0,7443 ± 0,0065	0,6605 ± 0,0115*	0,5829 ± 0,0176*	0,5725 ± 0,0180*

Примечание. * – Достоверные отличия относительно контроля, + – достоверные отличия относительно умеренной кратковременной гипотермии.

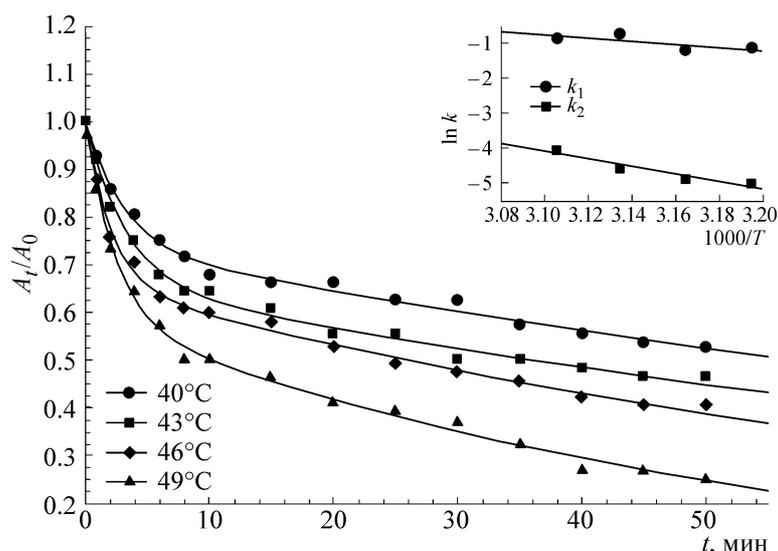


Рис. 2. Графики зависимости остаточной активности (A_t/A_0) АХЭ мембран эритроцитов крыс, подвергшихся кратковременной умеренной гипотермии, от времени инкубации при различных температурах денатурации. Точки на графиках соответствуют экспериментальным данным. Линии построены методом наименьших квадратов в соответствии с регрессионным уравнением (IIa). Врезка: температурная зависимость констант скорости денатурации быстрой (k_1) и медленной (k_2) фаз в координатах Аррениуса.

В координатах Аррениуса температурные зависимости констант скорости денатурации аппроксимированы прямыми (рис. 1, врезка), из наклона которых были вычислены соответствующие энергии активации (E_a). Табл. 2 указывает на то, что E_a быстрой фазы на 19,4% ниже таковой для медленной фазы. Близость E_a двух стадий денатурации АХЭ говорит о том, что структуры нативного и промежуточного состояний близки друг к другу. Но они отличаются друг от друга каталитической активностью.

На рис. 2 представлены кинетические кривые денатурации АХЭ эритроцитов крыс при кратковременной умеренной гипотермии. Они демонстрируют тот факт, что гипотермия способствует существенным изменениям в динамике денатурации АХЭ.

Из табл. 1 видно, что степень изменения параметров регрессионного уравнения при ги-

потермии зависит от температуры. Так, при 40°C k_1 увеличивается в 3,6 раза, 43°C – на 34%, 46°C – на 31,5%, 49°C – на 17,1%. При этом k_2 при 40°C увеличивается на 36%, а при 43, 46 и 49°C, напротив, уменьшается на 33,1, 40,5 и 30,2% соответственно. Незначительные изменения претерпевает и параметр β . Он уменьшается при 40°C на 12,3%, при 43°C – на 25,2%, 46°C – на 26,1%, 49°C – на 34,8%. При этом данный параметр становится более температурозависимой величиной по сравнению с контролем. С увеличением температуры происходит его снижение.

Из рис. 2 (врезка) видно, что при гипотермии изменяется характер температурных зависимостей констант скорости денатурации. Это отражается на значениях E_a соответствующих стадий. E_a быстрой стадии при гипотермии снижается на 72,7%, а E_a медленной – на 43,4% (табл. 2).

Таблица 2. Энергии активации быстрой и медленной стадий кинетики денатурации АХЭ мозга крыс в норме и при гипотермии ($M \pm m, n = 8$)

Состояния животных	E_a , кДж/моль	
	Быстрая стадия	Медленная стадия
Контроль	128,60 ± 7,11	159,40 ± 9,22
Кратковременная гипотермия	35,28 ± 1,05*	90,23 ± 6,21*
Пролонгированная гипотермия	59,09 ± 1,59*+	148,94 ± 6,98+

Примечание. * – Достоверные относительно контроля отличия; + – достоверные относительно умеренной кратковременной гипотермии отличия.

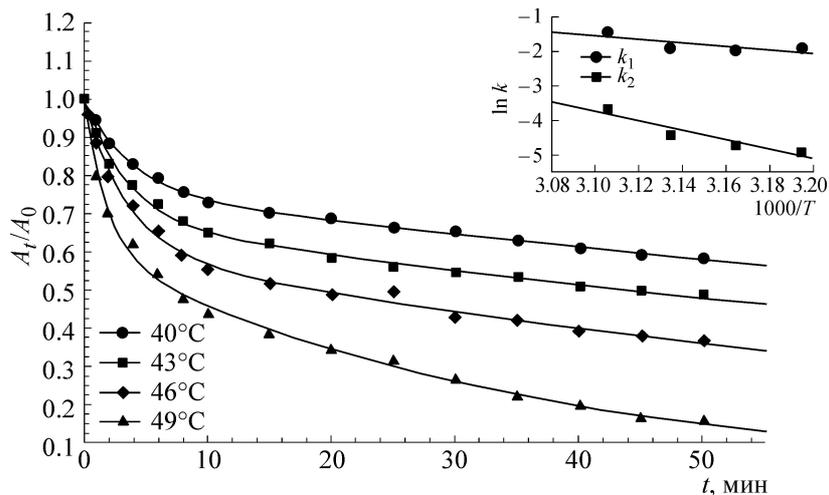


Рис 3. Графики зависимости остаточной активности (A_t/A_0) АХЭ мембран эритроцитов крыс, подвергшихся пролонгированной умеренной гипотермии, от времени инкубации при различных температурах денатурации. Точки на графиках соответствуют экспериментальным данным. Линии построены методом наименьших квадратов в соответствии с регрессионным уравнением (IIa). Врезка: температурная зависимость констант скорости денатурации быстрой (k_1) и медленной (k_2) фаз в координатах Аррениуса.

На рис. 3 представлены кинетические кривые денатурации АХЭ эритроцитов крыс при пролонгированной гипотермии. Видно, что пролонгирование гипотермии изменяет характер зависимости скорости денатурации от времени как относительно контроля, так относительно кратковременной гипотермии.

Из табл. 1 видно, что при пролонгировании гипотермии происходит снижение k_1 при 40°C на 15,4%, при 43°C – на 6,7%, 46°C – на 38,4%, а при 49°C, напротив, повышение на 29,5% относительно кратковременной гипотермии. При этом k_2 при 40, 43 и 46°C тоже незначительно снижается, а при 49°C, напротив, увеличивается на 42,9%, достигая при этом уровня контроля.

Пролонгирование гипотермического состояния не оказывает существенного влияния на параметр β относительно кратковременной гипотермии (табл. 1), поэтому так же, как и в случае кратковременной гипотермии, этот показатель с повышением температуры инкубации снижается.

На рис. 3 (врезка) показаны графики температурной зависимости констант скорости денатурации в координатах Аррениуса. Характер температурных кривых значительно отличается от такового при кратковременной гипотермии. Расчет термодинамических характеристик АХЭ показал, что при пролонгировании гипотермии E_a быстрой фазы увеличивается на 67,4%, а медленной фазы – на 53,7% относительно кратковременной гипотермии (табл. 2). Полученные значения E_a медленной фазы достигают уровня

контроля, а быстрой фазы – меньше его на 54,4%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное нами исследование показало, что кинетика денатурации АХЭ эритроцитов крыс нелинейна. Эти результаты в определенной мере согласуются с литературными данными. Вместе с тем следует отметить, что кинетика термоденатурации АХЭ из разных источников (как в составе мембран, так и в очищенном виде) демонстрирует существенные различия. В работе [21] было показано, что тепловая денатурация солюбилизированной фосфатидилинозитолспецифической фосфолипазы С и очищенной димерной формы АХЭ, полученной из электрических органов *Torpedo California*, имеет одноэкспоненциальную кинетику с высокой (145 ккал/моль) энергией активации. В то же время авторы работы [22] при исследовании этой же формы АХЭ из *Torpedo California* обнаружили двухстадийную кинетику термоденатурации. В работе [23] была исследована термоденатурация мономерной солюбилизированной формы АХЭ из мышц ланцетника. И в этом случае кинетика термоденатурации АХЭ также имела двухэкспоненциальный характер. Добавление ингибиторов АХЭ приводило к изменению кинетики термоденатурации АХЭ: быстрая стадия исчезала, а константа скорости второй стадии уменьшалась, т.е. кинетика становилась монофазной. При исследовании тетрамерной АХЭ синаптических мембран мозга крыс нами также была обнаружена двуэкспо-

ненциальная кинетика денатурации фермента [16].

Анализируя полученные данные, авторы работы [22] пришли к заключению, что двухстадийная кинетика денатурации АХЭ обусловлена тем, что между нативным (свернутым) состоянием фермента и полностью развернутым существует состояние частичной развернутости, называемое расплавленной глобулой. В этом состоянии третичная структура нарушена, но вторичная структура еще сохраняется. Такая модель денатурации АХЭ хорошо описывается уравнением типа (IIa). Естественно, в состоянии расплавленной глобулы каталитическая активность АХЭ равна нулю. Поэтому состояние X на схеме (II) – это состояние промежуточное между нативным состоянием и расплавленной глобулой. Таким образом, между нативным состоянием и полностью денатурированным состоянием тетрамера существуют два устойчивых состояния – состояние X («псевдонативное», каталитически активное) и расплавленная глобула (каталитически неактивное). Если исходить из этого предположения, схема денатурации АХЭ может усложниться.

Промежуточное состояние каталитически активно, но его удельная активность меньше, чем в нативном состоянии. В то же время это состояние отделено от нативного состояния и денатурированного состояния довольно высокими энергетическими барьерами, так как в противном случае оно не могло бы проявиться кинетически, т.е. оно не могло бы быть достаточно заселенным. Таким образом, имеют место три потенциальных ямы, соответствующих трем устойчивым конформационным состояниям АХЭ. Энергетический профиль пути от нативного состояния к денатурированному в этом случае можно представить в виде следующей схемы (рис. 4).

Одним из важных вопросов, который возникает при анализе кинетики термоденатурации АХЭ мембран эритроцитов, является природа промежуточного состояния. Поскольку оно является каталитически активным, переход из нативного состояния в промежуточное может быть одним из механизмов регуляции активности фермента *in vivo*. Димерная структура фермента эритроцитарных мембран позволяет предположить, что промежуточное состояние представляет собой одну из конформаций димера. Если же и мономерные формы АХЭ могут обладать двухэкспоненциальной кинетикой термоденатурации, то тогда нужно выяснить, как зависит энергетический ландшафт третичной структуры фермента от температуры. Из-за разной зависимости электростатических и гидро-

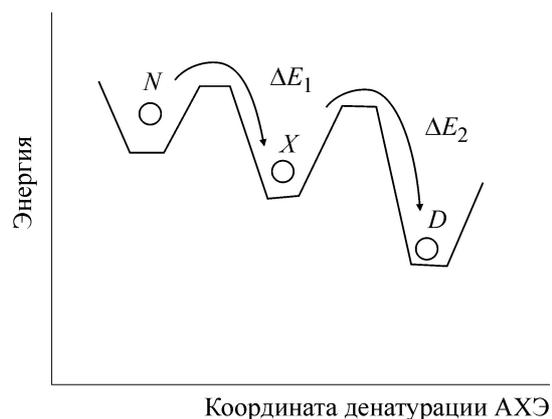


Рис. 4. Схема процесса денатурации АХЭ.

фобных взаимодействий от температуры энергетический ландшафт для молекулы фермента может существенно изменяться при изменении температуры.

Необходимо разобраться, что же представляют из себя эти состояния.

Было показано, что тетрамерная форма G4 АХЭ из электрического органа *Electrophorus electricus* в зависимости от рН и температуры может кристаллизоваться *in vitro* в двух структурах – компактной и более свободной [24]. В компактной форме два из четырех активных центров экранированы соседними субъединицами, и поэтому недоступны субстрату. Авторы работы [25], используя методы молекулярной динамики, показали, что димеры, из которых состоит тетрамер, должны обладать значительной подвижностью. Они оценили, что в растворе среднее время экранировки двух активных центров в тетрамере составляет 20%, открытому состоянию соответствует 80%. Среднее время нахождения тетрамера в открытом состоянии составляет 300 нс, а в закрытом состоянии – 50 нс. Таким образом, в растворе компактная и свободная формы тетрамера взаимопревращаются. Сведениями о существовании открытой и закрытой форм димерной АХЭ эритроцитов мы не располагаем. Однако можно предположить применимо к нашему случаю, что быстрая стадия термоденатурации АХЭ может быть связана с переходом более «рыхлой» формы димера в компактную с частичной потерей активности фермента. Медленная стадия термоденатурации, возможно, отражает переход субъединиц димера в состояние расплавленной глобулы с полной потерей активности.

Авторы работы [23], анализируя совокупность полученных данных относительно денатурации мономерной солюбилизированной АХЭ из мышц ланцетника, выдвинули предпо-

ложение, что мономерная форма АХЭ может сворачиваться в две отличающиеся друг от друга структуры – стабильную и нестабильную. Отсюда две стадии термоденатурации препарата фермента. Добавление ингибиторов, по мнению авторов, переводит нестабильную конформацию в стабильную. Тем самым кинетика становится монофазной. Это предположение, если оно окажется верным, вполне может объяснить и наши результаты. Исходя из того, что нет литературных данных о существовании двух генетических вариантов АХЭ в эритроцитарных мембранах млекопитающих, мы попытались объяснить двухфазность кинетики термоденатурации АХЭ на уровне димера. Поскольку димер АХЭ состоит из двух мономеров, можно предположить, что один мономер находится в стабильной конформации, а второй – в нестабильной. Такая кинетика термоденатурации эритроцитаной АХЭ должна в нашем случае описываться параллельной схемой и соответственно уравнением (Ia).

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные одинаково хорошо описываются как уравнением (Ia), так и уравнением (IIa). Поэтому исходя только из тех результатов, которыми мы располагаем, выбор между этими вариантами сделать затруднительно.

Интересно отметить, что константы скорости термоденатурации мономерной АХЭ из мышц ланцетника, указанные в работе [23], и мембран эритроцитов крыс, представленные в нашем исследовании, существенно отличаются. Термоденатурацию в работе [23] осуществляли при температуре 37°C, и в контроле константа скорости термоденатурации составила 0,41 мин⁻¹ для k_1 и 0,06 мин⁻¹ для k_2 . В наших экспериментах минимальная температура инкубации при исследовании термоденатурации равнялась 40°C, при этом $k_1 = 0,0892$ мин⁻¹, а $k_2 = 0,0050$ мин⁻¹. Из этого следует, что в димере стабильность АХЭ значительно выше. Ранее в работе [26] при исследовании кинетики термоденатурации АХЭ из мышц диафрагмы крыс и мышцей было обнаружено, что мономерные формы фермента более термолабильны, чем тетрамерные формы. Авторы связывали эти различия с наличием дисульфидных связей, объединяющих субъединицы вместе. Каков биологический смысл димеризации АХЭ? Олигомеризация обычно приводит к увеличению стабильности белка [27]. Кроме того, усложнение четвертичной структуры дает дополнительные возможности для регуляции активности фермента.

Обнаруженные различия в скоростях денатурации мономерной АХЭ из мышц ланцетника

и димерной АХЭ эритроцитов крыс могут быть связаны не только с олигомеризацией фермента, повышающей его стабильность, но и обусловлены также эффектами липидной матрицы, с которой связан фермент. Известно, что различные изоформы АХЭ у млекопитающих генерируются посредством альтернативного сплайсинга единственного гена. При этом каталитический домен у всех форм одинаков, а различия касаются короткого С-концевого домена. Этот домен участвует в формировании различных полимерных форм фермента [28]. Показано, что димерные формы АХЭ эритроцитов и электрического органа ската *Torpedo Californica* встраиваются в мембрану посредством гликофосфоинозитольного якоря. Гликофосфоинозитольный якорь АХЭ в мембране погружен в липидные рафты – мембранные микродомены, богатые гликофинголипидами и холестерином [29].

Милкани с соавт. [30] исследовали выделенную вместе с гликофосфоинозитольным якорем АХЭ из эритроцитов человека. Они обнаружили, что активность АХЭ в буфере без детергента в два раза ниже, чем в его присутствии. Активность фермента была также выше в случае его включения в липосомы, липидные моно- и бислои. Авторы пришли к выводу, что АХЭ более активна в присутствии детергента из-за наличия амфифильного гликофосфоинозитольного якоря, встраивающего в мицеллы детергента, что способствует стабилизации фермента.

Действительно, несмотря на то, что каталитические субъединицы АХЭ находятся в экстраклеточном пространстве, фермент «чувствует» липидное микроокружение мембраны [31]. Отсюда можно предположить, что показанная нами кинетика денатурации АХЭ, находящейся в составе мембраны, связана не только с изменениями в структуре фермента, но и с его липидной подложкой. Влияние липидного состава мембраны на температурную зависимость активности АХЭ [32] согласуется с таким предположением. Изменения характера зависимости скорости денатурации от времени могут быть обусловлены фазовыми переходами в рафтах в некотором узком диапазоне времени, или их латеральными перемещениями, агрегацией или напротив, расслоением. Тогда мембрана может зафиксировать две возможные конформации димера.

Изменение термостабильности АХЭ, обнаруженное нами при гипотермии, возможно, отражает локальные изменения физико-химического состояния мембраны эритроцита в месте прикрепления фермента при переходе от нормотермии к гипотермии. Ранее, используя флуоресцентный зонд пирен, мы оценили физико-

химическое состояние мембраны эритроцитов крыс при гипотермии. Полученные данные свидетельствуют о зависимости от длительности гипотермии изменения структурно-динамических характеристик мембран эритроцитов. После полтора часового пролонгирования гипотермии повышается текучесть липидного бислоя мембран эритроцитов, по сравнению с нормой [11]. Интересно то, что изменения кинетических характеристик АХЭ коррелировали с показаниями зондовой флуоресценции.

Обнаруженные изменения структурно-динамических характеристик мембран эритроцитов при умеренной гипотермии (30°C) могли быть связаны с изменением липидного состава мембран. Анализ состава фосфолипидов мембран эритроцитов при гипотермии показал, что количество холинсодержащих фосфолипидов уменьшается, а фосфатидилэтаноламина и его плазмогенной формы – увеличивается [33]. По мере снижения температуры тела в мембранных липидах повышается количество лизофосфолипидов, что может оказать существенное влияние на вязкость липидов мембран. Однако вопрос о том, каким образом осуществляется влияние липидного микроокружения на структурные параметры АХЭ, связанной с ней только лишь посредством гликофосфоинозитольного якоря, остается открытым. Полученные нами данные позволяют выдвинуть гипотезу о важной роли физико-химического состояния липидной подложки в поддержании структурной стабильности АХЭ.

Следует отметить, что при острой гипотермии может изменяться не только фосфолипидный и жирнокислотный состав эритроцитарных мембран, но и происходить их окислительная модификация. Было показано, что при кратковременной гипотермии в эритроцитах и плазме крови увеличивается содержание продуктов перекисного окисления липидов [34]. Накопление гидрофильных продуктов перекисного окисления липидов в мембранах может способствовать дестабилизации связанного с мембраной АХЭ. АХЭ прилегает к фосфолипидным головкам мембраны, между аминокислотными остатками фермента и головками фосфолипидов могут возникнуть электростатические взаимодействия. Окисление фосфолипидов при гипотермии может привести к нарушению электростатических взаимодействий и снижению, тем самым, энергии активации перехода белка в квазинативное состояние.

Интересно то, что обнаруженные нами различия в значениях констант скорости денатураций быстрой и медленной стадий значительны, а в энергиях активации соответствующих

стадий выражены не столь существенно, в то время как константа скорости химической реакции зависит от E_a в соответствии с уравнением Аррениуса следующим образом:

$$k = k_0 e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

Объяснение данному факту можно дать исходя из элементарных представлений химической кинетики, если обратиться к уравнению Эйринга. Согласно данному уравнению скорость химического процесса определяется изменением его свободной энергии [1]:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp(-\Delta G^*/RT),$$

где k – константа скорости реакции, k_B – константа Больцмана, h – постоянная Планка, ΔG^* – свободная энергия активации.

В то же время изменение свободной энергии какого-либо процесса можно вычислить по следующей формуле:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

Из формулы видно, что вклад в изменение свободной энергии вносит как энтальпия активации ΔH , так и энтропия активации ΔS .

Изменение энтальпии можно вычислить по формуле:

$$\Delta H = E_a - RT.$$

Это означает что оно, главным образом, связано с изменением E_a . В нашем случае E_a констант скоростей быстрой и медленной фазы отличаются не столь значительно, сколько сами скорости. Это говорит о том, что эти две стадии термоденатурации отличаются не только энергиями (энтальпиями) активации, но и энтропиями активации. При этом изменения E_a компенсируются изменениями энтропии активации. Другими словами, вторая стадия термоденатурации имеет не только высокую E_a , но и высокую энтропию активации. Это значит, что переход из промежуточного состояния в денатурированное (или в состояние расплавленной глобулы) сопровождается более значительными изменениями структуры молекулы фермента, чем переход из нативного состояния в промежуточное. Это согласуется с тем, что промежуточное состояние ближе по структуре к нативному, чем к денатурированному, так как промежуточное состояние каталитически активно.

Исследование показало, что умеренная гипотермия способствует снижению стабильности АХЭ эритроцитов. Об этом свидетельствует

значительное повышение скорости денатурации АХЭ при всех температурах инкубации (рис. 2). При этом температурная зависимость констант скорости денатурации значительно снижается, отсюда снижаются и вычисленные эффективные энергии активации. Интересно то, что изменения константы скорости денатурации медленной фазы не столь выражены и однозначны. Тем не менее зависимость данного параметра от температуры тоже уменьшается, как и в случае константы скорости быстрой фазы. Поскольку основной вклад в кинетику денатурации вносит быстрая стадия, то можно в целом сделать вывод о том, что стабильность АХЭ при гипотермии значительно снижается. При этом уменьшается и доля фермента, находящегося в промежуточном состоянии, что, скорее всего, может быть связано со снижением времени жизни промежуточного состояния.

Важно отметить, что гипотермия способствует уменьшению удельной активности промежуточной формы. Это можно объяснить тем, что у АХЭ эритроцитов гипотермированных крыс нативное состояние быстрее переходит в менее стабильное промежуточное состояние. При этом параметр β становится температурозависимой величиной: при увеличении температуры инкубации он снижается. Самое простое объяснение такому факту заключается в предположении, что при разных температурах инкубации структура промежуточного состояния разная, т.е. траектория от нативного состояния до денатурированного зависит от температуры. Естественно ожидать, что при более высоких температурах стабилизируется менее компактная конформация промежуточного состояния, которая обладает меньшей удельной активностью.

Энергия активации первой стадии при гипотермии уменьшается на 93,3 кДж/моль. Это разница примерно соответствует двум дополнительным слабым связям, стабилизирующим исходное состояние в контроле. E_a второй стадии уменьшается на 69,1 кДж/моль. Эта величина также находится в пределах энергий разрыва слабых связей. Таким образом, снижение стабильности АХЭ при гипотермии связано, скорее всего, с разрывом нескольких слабых связей, вследствие чего меньше энергии требуется для денатурации фермента.

Кратковременная гипотермия 30°C приводит к увеличению констант скорости обеих стадий денатурации по сравнению с контролем при температуре инкубации 40°C. Однако при более высоких температурах инкубации константы скорости в контроле и при гипотермических состояниях становятся ближе друг к

другу. Почему при высоких температурах различие между контролем и гипотермией уменьшается? Можно предположить, что высокие температуры сами дестабилизируют структуру АХЭ, поэтому эффекты гипотермии на кинетику денатурации оказываются не столь выраженными, как при низких температурах денатурации.

Известно, что структурная стабильность и каталитическая активность имеют отрицательную корреляцию [2], т.е. чем ригиднее структура белка, тем медленнее он работает. Поэтому стабилизация структуры может сопровождаться уменьшением каталитической активности и наоборот. Следует отметить, что при умеренной кратковременной гипотермии каталитическая эффективность АХЭ мембран эритроцитов значительно повышается [11]. При этом основной вклад в изменение эффективности катализа внесило снижение константы Михаэлиса, что свидетельствовало в пользу предположения о структурных изменениях в самой молекуле фермента.

Каковы же молекулярные механизмы изменений термостабильности эритроцитарной АХЭ, сопряженных с изменениями ее активности, за столь непродолжительный период (0,5–3 ч) снижения температуры тела? Термостабильность фермента весьма чувствительна к изменениям в структуре фермента [12]. Поскольку в эритроцитах отсутствует белоксинтезирующий аппарат и неизвестны генетически детерминированные структурные варианты ферментов, изменения термостабильности фермента связаны, скорее всего, с его химической модификацией. В качестве такого механизма может выступать фосфорилирование/дефосфорилирование ферментного белка. Как показано в работе [35], фосфорилирование приводит к увеличению активности АХЭ в несколько раз, но не изменяет значение K_M фермента. Хотя в крови имеются эктопротеинкиназы и фосфатазы [36], есть ли возможность для фосфорилирования экспансированных в плазму субъединиц АХЭ эритроцитов пока неизвестно.

АХЭ весьма чувствительна к действию активных форм кислорода. Их эффекты на АХЭ зависят от вида активных форм кислорода, их концентрации и длительности воздействия. Так, было показано, что инкубирование гомогенатов мозга в среде с $FeSO_4$ (84 мкМ) и аскорбиновой кислоты (400 мкМ) способствует в течение первых 15 мин активации фермента, а через 1,5 ч – ингибированию [37]. Обнаружено, что перекись водорода оказывает дозозависимый эффект на активность и кинетические характеристики АХЭ. Инкубирование растворимой и мембра-

носвязанной эритроцитарной АХЭ [38], а также рекомбинантной АХЭ человека [39] в среде, содержащей низкие концентрации H_2O_2 (10^{-6} М), приводило к повышению активности фермента, в то же время как высокие концентрации H_2O_2 (10^{-3} М) оказывали существенный ингибирующий эффект. Обнаруженные эффекты H_2O_2 авторы связывают либо с модификацией липидной матрицы эритроцитарных мембран [38], либо с изменением степени окисленности остатков метионина, цистеина и триптофана в ферменте [39]. Было показано, что активность АХЭ из клеток нейробластомы человека при 24-часовой инкубации с H_2O_2 (в диапазоне концентраций 1–1000 мкМ) сильно увеличивается. Результаты кинетического исследования показали, что H_2O_2 влияет на V_{max} , а не K_m , и изменяет сигмоидную кинетику, наблюдаемую в контрольных образцах, на гиперболическую кинетику [40]. Кроме того, H_2O_2 (в диапазоне 100–1000 мкМ) уменьшала общее содержание АХЭ и модифицировала ее изоферментный профиль.

Таким образом, множество экспериментальных данных свидетельствует о том, что H_2O_2 может играть регуляторную роль в функционировании АХЭ.

В свете этих данных следует еще раз отметить, что при кратковременной гипотермии у крыс ранее нами была обнаружена положительная корреляция между повышением активности АХЭ [11] и степенью окислительной модификации липидов и белков мембран эритроцитов [9]. Мы предположили, что активация АХЭ при гипотермии может быть результатом «мягкой» окислительной модификации фермента под действием активных форм кислорода на начальных этапах гипотермии. В этом случае «мягкая» окислительная модификация фермента может перевести его в квазинативное состояние, как это имело место при модификации тиоловых групп АХЭ электрического органа *Torpedo California* хлоридом ртути [21]. Такое состояние при повышении температуры может переходить в состояние расплавленной глобулы. В квазинативном состоянии, обусловленном влиянием активных форм кислорода, АХЭ подвергается более быстрой денатурации, чем нативном, о чем свидетельствуют полученные нами значения констант скорости денатурации и энергии активации денатурации АХЭ эритроцитов гипотермированных животных. В пользу такого предположения может свидетельствовать работа Вейнера и сотр. [41], в которой показано, что при инкубации очищенной АХЭ из электрического органа *Torpedo Californica* в течение двух–пяти часов в среде, генерирующей кисло-

родные радикалы (аскорбат– H_2O_2 – Fe^{3+}), происходит переход фермента в частично развернутое состояние, похожее на расплавленную глобулу, с повышенной чувствительностью к протеолизу. Можно предположить, что в таком состоянии фермент будет очень чувствителен к воздействию и других физико-химических факторов, в том числе и к температуре.

Обращает на себя внимание тот факт, что снижение термостабильности АХЭ, обнаруженное нами при кратковременной гипотермии, оказалось обратимым в случае пролонгирования гипотермии в течение трех часов. Было показано, что пролонгирование умеренной гипотермии в течение трех часов способствует снижению интенсивности свободнорадикальных процессов в клетках, в том числе и в эритроцитах, за счет увеличения содержания компонентов антиоксидантной защиты (глутатиона и сульфгидрильных групп мембранных белков) и повышения активности супероксиддисмутазы [42]. Это согласуется с данными работы [43], в которой была обнаружена прямая корреляция между общей антиокислительной активностью плазмы крови и активностью АХЭ мембран эритроцитов человека: чем выше антиокислительная активность, тем выше активность фермента.

Поскольку каталитические субъединицы АХЭ эритроцитов ориентированы в экстраклеточное пространство, то вполне логично, что активность фермента регулируется антиоксидантным статусом плазмы. Возможно, что пролонгирование гипотермии посредством повышения активности антиоксидантной защиты плазмы и эритроцитов способствует восстановлению окисленных остатков аминокислот и повышению эффективных энергий активации термоденатурации АХЭ до уровня контроля. Обнаружено, что посредством восстановления и окисления важнейших аминокислотных остатков АХЭ дрозофилы может быть изменена ее термостабильность [44]. Таким образом, обнаруженные нами ранее изменения активности АХЭ и его кинетических характеристик, а также термостабильности АХЭ хорошо коррелируют с данными об изменении интенсивности свободнорадикальных процессов в эритроцитах при умеренной гипотермии различной длительности.

С другой стороны, старые или поврежденные при кратковременной гипотермии эритроциты могут подвергаться атаке со стороны фагоцитов, выводиться из кровотока или, как нами показано [45], подвергаться внутрисосудистому гемолизу, а в кровь поступать из костного мозга новые эритроциты [34]. Структур-

но-функциональные характеристики АХЭ, в том числе термостабильность, более молодой популяции эритроцитов могут отличаться от длительно циркулирующей популяции, поскольку было показано, что активность АХЭ зависит от возраста эритроцитов [43].

Таким образом, результаты данного исследования, свидетельствующие о снижении стабильности структуры АХЭ, а следовательно, повышении ее лабильности согласуются с полученными нами ранее данными о повышении каталитической эффективности фермента при низких температурах тела. С этой позиции можно предположить, что изменение термостабильности АХЭ при гипотермии носит адаптивный характер и позволяет компенсировать воздействие низкотемпературного фактора путем лабиализации структуры фермента. Такая форма адаптации широко известна у пойкилотермов и хорошо описана в классических работах Хочачко и Сомеро [1].

Особый интерес представляет тот факт, что пролонгирование гипотермии до трех часов способствует повышению термостабильности АХЭ, о чем свидетельствует повышение E_a денатурации, достигающее уровня контроля. Ранее при исследовании активности и кинетических характеристик АХЭ нами было показано, что пролонгирование гипотермии способствует их нормализации [11]. Таким образом, данные настоящего исследования хорошо коррелируют с результатами предыдущих исследований и указывают на то, что изменения термостабильности и активности АХЭ зависят от длительности гипотермии и носят обратимый характер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Hochachka and G. Somero, *Biochemical adaptation* (Oxford University Press, 2002).
2. P. A. Fields, Y. S. Kim, J. F. Carpenter, et al., *J. Exp. Biol.* **205**, 1293 (2002).
3. Н. Д. Озернюк, *Температурные адаптации* (Изд-во МГУ, М., 2000).
4. О. В. Липина и В. И. Луговой, *Биофизика* **41** (3), 678 (1996).
5. W. Z. Martini, *Metab. Clinic. Exp.* **56**, 214 (2007).
6. D. Blagojević, In *Systems biology of free radicals and antioxidants*, Ed. by I. Laher (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2014), pp. 376–392.
7. Э. З. Эмирбеков и Н. К. Кличханов. *Свободнорадикальные процессы и состояние мембран при гипотермии* (Изд-во ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2011).
8. N. Alva, J. Palomeque, and C. Teresa, *Oxid. Med. and Cell. Long.* Article ID 957054, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/957054> (2013).
9. М. А. М. Аль-Рабии, М. Д. Астаева и Н. К. Кличханов, *Естеств. науки* **50** (1), 35 (2015).
10. F. A. Carvalho, J. P. Lopes de Almeida, T. Freitas-Santos, et al., *J. Membrane Biol.* **228**, 89 (2009).
11. Н. К. Кличханов, А. М. Джафарова и М. А. М. Аль-Рабии, *Биол. мембраны* **34** (3), 201 (2017).
12. А. Е. Любарев и Б. И. Курганов, *Успехи биол. химии* **40**, 43 (2000).
13. I. N. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.* **100** (1), 119 (1963).
14. D. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al., *J. Biol. Chem.* **193** (1), 265 (1951).
15. Y. L. Ellman, K. D. Courtney, V. J. Andres, et al., *Biochem. Pharmacol.* **7** (1), 88 (1961).
16. М. Х. Тикра, А. М. Джафарова, Н. К. Кличханов др., *Вестн. Дагест. гос. универ.*, № 1, 107 (2011).
17. Ч. Кантор и П. Шиммель, *Биофизическая химия* (Мир, М., 1985).
18. W. K. W. Luk, V. P. Chen, R. C. Y. Choi, et al., *FEBS J.* **279**, 3229 (2012).
19. J. Massoulié, N. Perrier, H. Noureddine, et al., *Chem. Biol. Interact.* **175**, 30 (2008).
20. O. I. Maloletkina, K. A. Markossian, L. V. Belousova, et al., *Biophys. Chem.* **148** (1–3), 121 (2010).
21. I. Shin, D. Kreimer, I. Silman, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (10), 2848 (1997).
22. C. B. Millard, V. L. Shnyrov, S. Newstead, et al., *Prot. Sci.* **12** (10), 2337 (2003).
23. B. Perrin, M. Rowland, M. Wolfe et al., *Invert. Neurosci.* **8**, 147 (2008).
24. Y. Bourne, J. Grassi, P. E. Bougis, et al., *J. Biol. Chem.* **274**, 30370 (1999).
25. A. A. Gorfе, B. Lu, Z. Yu, et al., *Biophys. J.* **97**, 897 (2009).
26. J. A. Edwards and S. Brimijoin, *Biochem. Biophys. Acta* **742** (3), 509 (1983).
27. V. Levi, J. Rossi, P. Catello, et al., *Biophys. J.* **82**, 437 (2002).
28. M. Zimmermann, *British J. Pharmac.* **170**, 953 (2013).
29. M. G. Paulick and C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **47**, 6991 (2008).
30. E. Milkani, A. M. Khaing, F. Huang, et al., *Langmuir* **26** (24), 18884 (2010).
31. Z. Arsov, M. Schara, M. Zorko, et al., *Eur. Biophys. J.* **33**, 715 (2004).
32. S. Tsakiris, *Z. Naturforsch. C.* **40**, 97 (1985).
33. А. М. Каландаров, Б. А. Фейзуллаев, С. А. Забелинский и др., в сб. *Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины*, под ред. Т. П. Шкурат и А. Е. Панич (Изд. ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2008), сс. 27–28.
34. М. А. М. Аль-Рабии, Дис. ... канд. биол. наук. (Дагестанский гос. университет, Махачкала, 2016).
35. M. Grifman, A. Arbel, D. Ginzberg, et al., *Molec. Brain Res.* **51**, 179 (1997).
36. G. Yalak and V. Vogel, *Sci. Signaling* **5** (255), doi: 10.1126/scisignal.2003273 37 (2012).

37. S. Tsakiris, P. Angelogianni, K. H. Schulpis, et al., Clin. Biochem. **33**, 103 (2000).
38. K. U. Schallreuter, S. M. A. Elwary, N. C. J. Gibbons, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. **315**, 502 (2004).
39. E. M. Molochkina, O. M. Zorina, L. D. Fatkullina, et al., Chem.-Biol. Interact. **157–158**, 401 (2005).
40. A. Garcimartín, M. E. López-Olivab, M. P. González et al., Redox Biol. **12**, 719 (2017).
41. L. Weiner, D. Kreimer, E. Roth, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **198** (3), 915 (1994).
42. М. А. М. Аль-Раби, Ш. И. Чалабов, М. Д. Астаева и др., Современ. проблемы науки и образования, № 3; URL: www.science-education.ru/123-17364 (2015).
43. R. Jha and S. I. Rizvi, Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky, Olomouc, Czech. Repub. **153** (3), 195 (2009).
44. I. Fremaux, S. Mazères, A. Brisson-Lougarre, et al., BMC Biochem. **3**, <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/3/21> (2002).
45. Э. З. Эмирбеков, А. А. Сфиев и Н. К. Кличханов, Проблемы криобиологии **4**, 31 (1991).

The Kinetics of Thermal Denaturation of Acetylcholinesterase of Rat Red Blood Cell Membrane during Moderate Hypothermia

N.K. Klichkhanov and A.M. Djafarova

Dagestan State University, ul. Gadjeva 43a, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000 Russia

The thermostability of acetylcholinesterase of rat erythrocyte membranes in norm and moderate hypothermia was studied. It is shown that the kinetics of the thermal denaturation of acetylcholinesterase is nonlinear and corresponds to a model that involves the two-step denaturation, fast and slow, of the enzyme native form. The rate constants of the fast phase, k_1 , are much higher than those of the slow phase, k_2 , while the energy of the fast phase activation is lower only by 19.4% compared to that of the slow one. Short-term moderate hypothermia is shown to increase k_1 and decrease the index of relative activity of the intermediate form of acetylcholinesterase (parameter β), leading to lowering the activation energies of both stages significantly and parameter β becomes more temperature dependent. The prolongation of hypothermia up to 3 hours contributes, mainly, to a decrease in k_1 and k_2 relative to short-term hypothermia, and the activation energy of denaturation increases. The obtained data support the hypothesis according to which the structure of acetylcholinesterase is labilized at the initial stages of the development of the hypothermic state and stabilized during prolonged hypothermia.

Keywords: acetylcholinesterase, kinetics of thermal denaturation, erythrocyte membrane, hypothermia, rats