



УДК 577.175.8'154

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДЕЛЬТА-СОН-ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА С КЛЕТОЧНЫМИ МЕМБРАНАМИ *in vitro*

© 1999 г. Г. Т. Рихирева, И. Н. Голубев*, С. А. Копыловский, И. А. Прудченко**, И. И. Михалева***

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН;

* ГосНИИ органической химии и технологии;

** Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 29.09.98 г. Принята к печати 26.11.98 г.

Исследовано влияние дельта-сон-индуцирующего пептида (ДСИП) на эритроцитарные мембраны донорской крови человека методом спиновых меток и зондов. Синтезировано спин-меченое производное ДСИП, содержащее остаток 1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпирролин-3-карбоновой кислоты на N-конце молекулы пептида. Анализ спектров ЭПР спин-меченого производного ДСИП, измеренных после его инкубации при 37°C с суспензией эритроцитов человека, выявил увеличение времени вращательной корреляции (τ_c) и параметра упорядоченности (S) по сравнению с контрольными растворами пептида в фосфатном буфере (рН 7.4). Использование парамагнитных зондов – 5-, 12- и 16-доксилстеариновых кислот и 3-доксиландростанола показало, что введение ДСИП в суспензию эритроцитов заметно увеличивает подвижность гидрофобной области мембранного бислоя как на глубине порядка 20–22 Å, так и в его поверхностном слое (4–6 Å). Установлено, что зависимость наблюдаемых эффектов от концентрации ДСИП имеет вид кривой с выраженными экстремумами. Максимальное разупорядочивание мембранных липидов наблюдалось при концентрациях пептида 10^{-9} и 10^{-6} М. Полученные результаты свидетельствуют о том, что *in vitro* ДСИП оказывает отчетливое влияние на структуру плазматических мембран, изменяя физическое состояние их липидных компонентов.

Ключевые слова: ДСИП, дельта-сон-индуцирующий пептид; спиновые метки и зонды; ЭПР, плазматические мембраны; эритроциты человека.

Со времени открытия эндогенного нонапептида (Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu) – дельта-сон-индуцирующего пептида (ДСИП) описано множество его физиологических и биохимических эффектов, которые проявляются особенно отчетливо в условиях стрессовых воздействий на организм и при различных патологиях [1–3]. В последние годы проявляется повышенный интерес к поиску новых лекарственных средств среди эндогенных соединений. Вследствие широкого спектра биологических эффектов, включая антистрессовое и адаптогенное действие, ДСИП является одним из интересных эндогенных биорегуляторных пептидов, перспективных в фармакологическом плане.

Молекулярные механизмы биологического действия ДСИП пока не известны и их изучение представляет определенный интерес. Среди имеющихся представлений преобладает точка зрения

об его модуляторном влиянии на классические нейромедиаторные системы: адренергические, серотонинергические, ГАВА-ергические и др. В наших предыдущих исследованиях, направленных на изучение механизма антистрессового действия ДСИП, были получены убедительные данные о выраженном антиоксидантном эффекте этого пептида [4, 5]. Вследствие того, что ДСИП не обладает собственной антирадикальной активностью, представляется вероятным, что его антиоксидантное действие связано с модуляторным влиянием этого пептида на состояние мембранных структур клеток. В связи с этим мы полагаем, что изучение взаимодействия ДСИП с клеточными мембранами важно для понимания механизма первичных актов его биологического действия.

При выяснении природы молекулярных мишеней, на которые действуют гидрофильные молекулы пептида, необходимо принимать во внимание возможность пассивного транспорта ДСИП через гематоэнцефалический барьер *in vivo* [6], а также через монослой эндотелиальных клеток микросудов мозга *in vitro* [7]. Полагают, что проникновение пептида через мембранные структуры может

Сокращения: ГАВА – γ -аминомасляная кислота; ДСИП – дельта-сон-индуцирующий пептид.

Автор для переписки (тел.: (095) 335-53-66; e-mail: imikha@ibch.siobc.ras.ru).

быть связано с тем, что в водных растворах молекулы ДСИП могут иметь не только линейную конформацию, но и компактную вторичную структуру с амфифильными свойствами [8, 9]. Поэтому первичные рецепторы ДСИП, по-видимому, находятся не только на плазматических мембранах. Однако обнаруженное влияние ДСИП на интенсивность пероксидного окисления липидов в клеточных мембранах [4] и на активность мембранно-связанных ферментов [10] указывает на целесообразность поиска первичных молекулярных мишеней действия ДСИП (т.е. его рецепторов) в мембранах.

Основная задача данного исследования – выяснение возможности прямого взаимодействия ДСИП с мембранными структурами и изменения динамических свойств молекул пептида в результате такого взаимодействия. С этой целью применили два методических подхода. Оценку влияния пептида на физико-химическое состояние мембранных структур проводили с помощью ряда спин-зондов, различающихся по своей локализации в мембране. Динамические свойства молекул пептида характеризовали по изменениям спектров ЭПР водных буферных растворов синтезированного спин-меченого производного ДСИП после добавления суспензии клеток.

В работе использовали мембраны эритроцитов человека. Специальными опытами было показано, что как суспензия эритроцитов, так и выделенные эритроцитарные мембраны дают одинаковые результаты при регистрации спектров ЭПР (данные не приводятся). Поэтому большая часть экспериментов была проведена с целыми клетками.

В качестве парамагнитных зондов были взяты доксильные производные стеариновой кислоты: 5-, 12- и 16-доксилстеариновые кислоты, а также 3-доксиландростанол. Использование этих соединений, различающихся глубиной погружения нитроксильного фрагмента в мембрану, дает возможность получить информацию о состоянии зонда в различных зонах мембраны. По глубине погружения нитроксильных фрагментов в мембрану зонды распределяются следующим образом: 5-доксилстеариновая кислота – 4–6 Å; 12-доксилстеариновая кислота – 14–16 Å; 3-доксиландростанол – 19–21 Å и 16-доксилстеариновая кислота – 20–22 Å [11].

В растворах (при концентрациях, не превышающих 10^{-4} М) нитроксильные зонды имеют практически изотропные триплетные спектры ЭПР. В структурированной мембранной среде спектры ЭПР использованных зондов отличаются степенью анизотропии.

Для оценки влияния ДСИП на физическое состояние эритроцитарных мембран по спектрам ЭПР иммобилизованных зондов рассчитывали

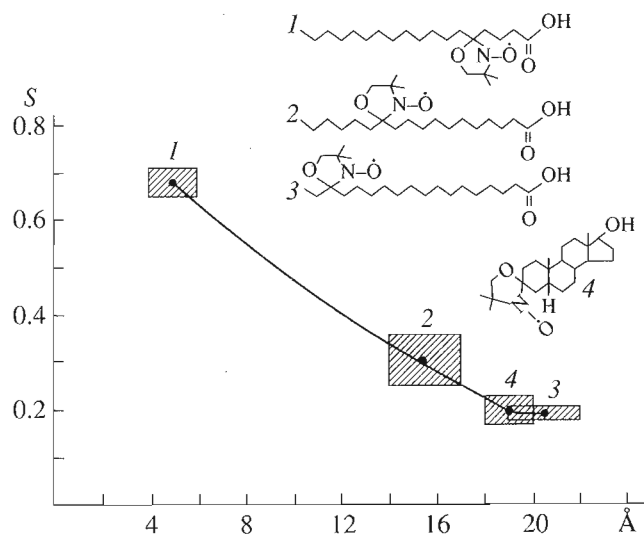


Рис. 1. Зависимость параметра упорядоченности (S) в эритроцитарных мембранах от глубины погружения парамагнитного фрагмента спин-зондов: 5-доксилстеариновая кислота (1), 12-доксилстеариновая кислота (2), 16-доксилстеариновая кислота (3), 3-доксиландростанол (4).

время вращательной корреляции (τ_c), которое характеризует микровязкость окружения нитроксильного фрагмента зонда, а также параметр упорядоченности (S), связанный с молекулярной подвижностью зонда (см. “Эксперимент. часть”).

На первом этапе работы были измерены и сопоставлены спектральные характеристики зондов, иммобилизованных в мембране. Поскольку использовался целый набор спиновых зондов, нитроксильные фрагменты которых располагаются на различной глубине в эритроцитарной мембране, полученная зависимость (рис. 1) параметра S от глубины проникновения парамагнитных фрагментов зондов представляет собой как бы “профиль жесткости” мембраны эритроцитов. При переходе от приповерхностных слоев мембраны до ее внутренних зон спектр ЭПР изменялся от резко анизотропного для 5-доксилстеариновой кислоты (рис. 2а) до слегка анизотропного для 16-доксилстеариновой кислоты (рис. 2б). Это означает, что приповерхностная зона мембраны жестко упорядочена, а ее центральная область значительно более подвижна (разупорядочена). Эти данные, соответствующие современным представлениям о структуре биомембран, послужили основой для дальнейшего изучения влияния ДСИП на структуру эритроцитарных мембран.

Известно, что [12] влияние биологически активных веществ на свойства мембран проявляется в широком диапазоне их концентраций вплоть до сверхмалых доз (10^{-9} – 10^{-16} М). Для выяснения влияния ДСИП на физическое состояние липидов в эритроцитарных мембранах был выбран интервал

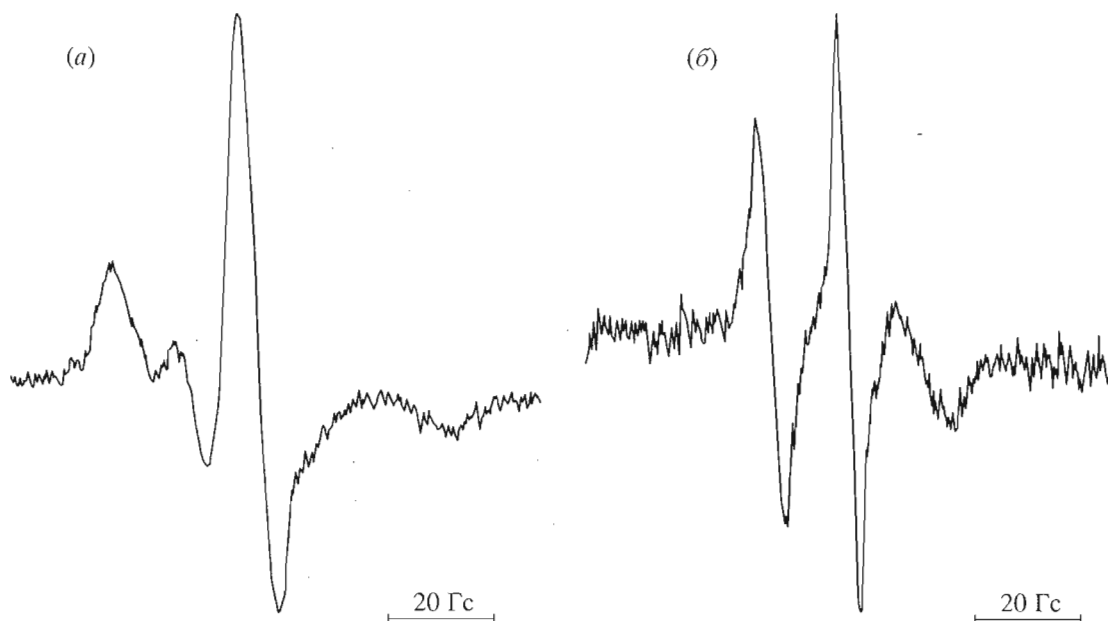


Рис. 2. Спектр ЭПР 10^{-4} М растворов 5-доксилстеариновой кислоты (а) и 16-доксилстеариновой кислоты (б) в фосфатном буфере (рН 7.4) после 30 мин инкубации с эритроцитами.

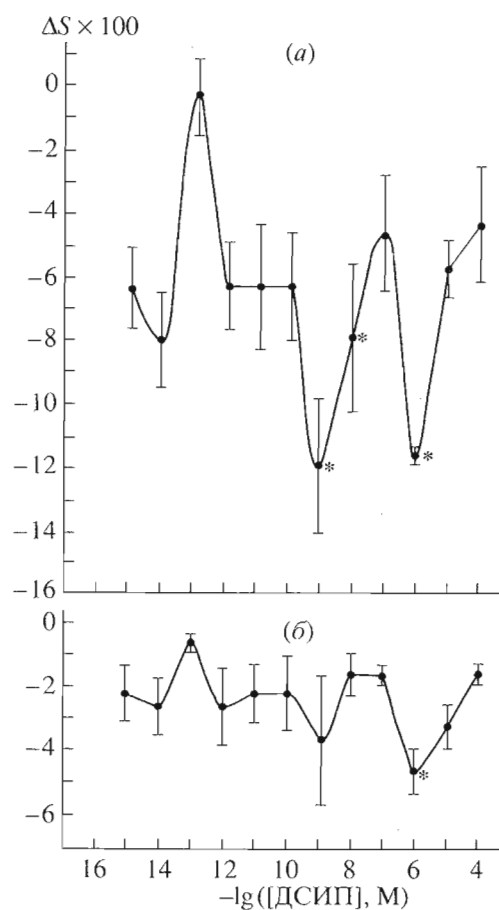


Рис. 3. Изменение параметра упорядоченности ΔS в эритроцитарных мембранах на глубине 20–22 Å (а) и 4–6 Å (б) после инкубации в растворе, содержащем ДСИП в различных концентрациях. * $p < 0.1$ ($n = 3$).

концентраций ДСИП от 10^{-15} до 10^{-4} М (рис. 3). Эффект ДСИП оценивали по разности (ΔS) величин параметра упорядоченности, измеренных в суспензии эритроцитов в присутствии ДСИП и в его отсутствие. Использование в качестве зондов 16- и 5-доксилстеариновых кислот (рис. 3а, б) позволило сделать выводы о влиянии ДСИП на структуру мембран на глубине 20–22 и 4–6 Å соответственно.

При рассмотрении полученных результатов, прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что во всем исследованном интервале концентраций пептида наблюдается уменьшение фактора упорядоченности в обеих зонах мембраны. Это значит, что подвижность зондов увеличивается как в гидрофобной области мембраны, так и в ее более жесткой и более полярной приповерхностной области. Наблюдаемая концентрационная зависимость имеет вид кривой с хорошо выраженными экстремумами: максимальное разупорядочивание мембраны происходит при концентрациях пептида 10^{-9} и 10^{-6} М. Для 5-доксилстеариновой кислоты наблюдался большой разброс данных в области концентрации 10^{-9} М при меньшей амплитуде эффекта. Аналогичная зависимость от концентрации пептида была получена в случае измерения микровязкости липидов (по τ_c , данные не приводятся).

Наличие нескольких экстремумов на кривых зависимости физического состояния липидного окружения зонда (параметры S и τ_c) от концентрации пептида может свидетельствовать о существовании нескольких центров взаимодействия

пептида с мембраной, характеризующихся разным сродством к ДСИП.

Аналогичные результаты были получены при анализе спектров ЭПР и для спин-зонда 3-доксиландростана, ориентированного перпендикулярно поверхности мембраны (не приводятся). При анализе зависимости степени вызванного пептидом разжижения липидов мембраны от исходной жесткости мембран эритроцитов прослеживается следующая тенденция: чем выше параметр S в контроле (без пептида), тем больше амплитуда индуцированного пептидом изменения параметра упорядоченности.

Полученные нами предварительные результаты изучения синаптосомальных мембран, выделенных из головного мозга мышей, показали, что ДСИП оказывает также влияние на спектры ЭПР спин-зонда 5,6-бензо-2,2,4,4-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксила, который локализуется в наиболее жестких липидных слоях, находящихся вблизи белков в приповерхностной области синаптосомальных мембран на глубине 2–4 Å [13].

Таким образом, результаты проведенных экспериментов со спин-зондами *in vitro* показали, что ДСИП оказывает влияние на структуру плазматических мембран, изменяя физическое состояние мембранных липидов. При этом выявлены эффекты разупорядочивания не только достаточно глубокой и наиболее подвижной углеводородной области липидного бислоя на глубине 20–22 Å (16-доксилстеариновая кислота), но и более полярной и жесткой зоны липидов приповерхностного слоя (4–6 Å – 5-доксилстеариновая кислота), а также наиболее жестких прибелковых липидных слоев [14] (синаптосомы – 5,6-бензо-2,2,4,4-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксил).

Чтобы выяснить, что происходит с пептидом при взаимодействии с эритроцитарными мембранами, мы синтезировали его аналог, модифицированный спин-меткой – 1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпирролин-3-карбоновой кислотой по N^{α} -аминогруппе остатка триптофана (см. рис. 4). После инкубации этого аналога с эритроцитами были записаны спектры ЭПР в диапазоне концентраций пептида от 10^{-3} до 10^{-5} М. Верхняя граница концентраций (10^{-3} М) определялась необходимостью избежать искажения спектров из-за обменного уширения, а нижняя – чувствительностью прибора. В связи с этим следует отметить, что в этом интервале концентраций пептида в растворах без эритроцитов (контроль) значения полуширины низкопольной компоненты спектра ЭПР и τ_c были постоянны.

Спин-меченый аналог ДСИП в фосфатном буфере (рН 7.4) обладал практически изотропным триплетным спектром ЭПР (рис. 4). Это связано с значительной вращательной подвижностью спи-

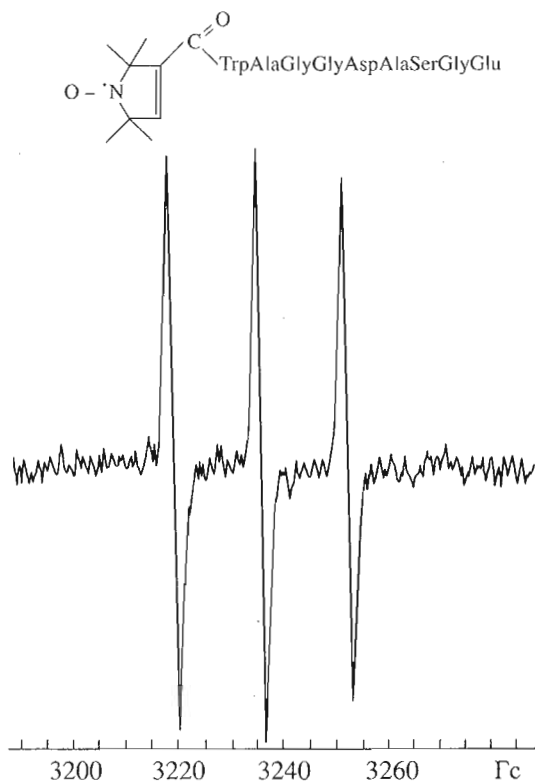


Рис. 4. Спектр ЭПР 10^{-5} М раствора спин-меченого ДСИП в фосфатном буфере (рН 7.4) при 37°C.

нового фрагмента, присоединенного к N -концевому триптофановому остатку. После добавления этого производного в среду с эритроцитами и 30-минутной инкубации его спектральные характеристики изменились. В частности, при взаимодействии ДСИП с эритроцитарной мембраной полуширина низкопольной компоненты триплетного спектра ЭПР увеличивалась в 2 раза по сравнению с раствором (с 1 до 2 Гс). Форма спектра по-прежнему была близка к изотропной. Анализируя зависимость параметров ΔS и $\Delta \tau_c$ от концентрации пептида (рис. 5), можно отметить, что в целом ход кривых для S и τ_c близок, что свидетельствует об одинаковом характере изменений микровязкости окружения парамагнитного фрагмента спин-меченого пептида и его молекулярной подвижности. Однако в случае τ_c имеет место большой разброс данных.

Характер концентрационной зависимости физико-химических параметров среды окружения спин-меченого пептида может быть обусловлен несколькими обстоятельствами. В первую очередь, речь идет о соотношении свободной (растворенной в буфере) и иммобилизованной на мембране форм пептида. В области наибольших концентраций преобладает спектр ЭПР свободного пептида. Можно также ожидать, что на форму кривой может оказывать влияние соотноше-

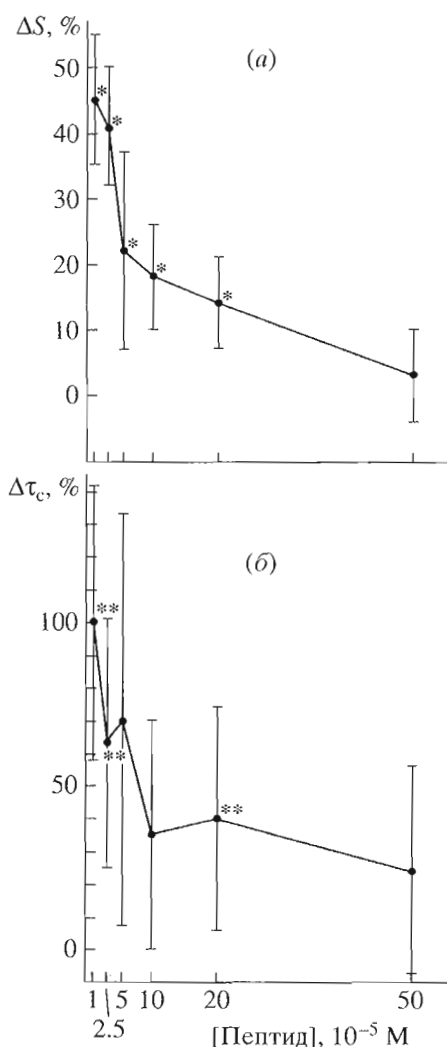


Рис. 5. Зависимость изменения параметра упорядоченности ΔS (а) и времени вращательной корреляции $\Delta\tau_c$ (б) в эритроцитарных мембранах от концентрации добавленного спин-меченого аналога ДСИП. * $p < 0.001-0.02$ ($n = 4$). ** $p < 0.01-0.1$ ($n = 4$).

ние населенностей различных конформационных состояний пептида (линейного и глобулоподобного) [9]. И, наконец, в опытах со спин-зондами было установлено разупорядочивание липидов мембраны под действием ДСИП, что тоже может сказываться на форме кривой в области наименьших концентраций спин-меченого пептида.

Кривую зависимости параметра S от концентрации пептида условно можно разделить на три области. В диапазоне от 5×10^{-4} до 5×10^{-5} М имеет место монотонное увеличение S (рис. 5а). Наиболее вероятно, что это отражает постепенное увеличение доли связанного пептида. В диапазоне $5 \times 10^{-5}-2.5 \times 10^{-5}$ М регистрируется наиболее резкое увеличение параметра упорядоченности. Можно предположить, что в этой области связанная форма спин-меченого пептида преобладает.

В области $(2.5-1.0) \times 10^{-5}$ М наблюдается замедление роста величины S . Можно думать, что в этой области происходят, по крайней мере, два разнонаправленных процесса: дальнейшее увеличение доли связанного спин-меченого пептида (увеличение параметра S) и разупорядочивание структуры эритроцитарных мембран под действием пептида (уменьшение параметра S). Подобная концентрационная зависимость наблюдается и для разности времен вращательной корреляции $\Delta\tau_c$ (рис. 5б) между величинами, измеренными в растворах спин-меченого аналога ДСИП в присутствии эритроцитов и в их отсутствие (контроль).

Суммируя полученные нами результаты изучения характера взаимодействия ДСИП с мембранами, можно отметить следующее. Радиоспектроскопические характеристики спин-меченого пептида в присутствии эритроцитарных мембран отличаются от наблюдаемых характеристик этого же производного в буферном растворе в отсутствие мембран, что свидетельствует о взаимодействии молекул пептида с мембранами. Форма спектра ЭПР пептида, близкая к изотропной в присутствии мембран во всем исследуемом интервале его концентраций, указывает на то, что парамагнитный фрагмент меченого пептида, связанный с N -концевым остатком триптофана, по-прежнему достаточно свободно вращается в окружающей его среде. Поэтому можно полагать, что небольшие изменения радиоспектроскопических параметров спин-меченого производного ДСИП вызваны изменением динамического состояния молекулы пептида при взаимодействии с поверхностными областями мембраны в результате относительно слабой иммобилизации пептида. Нельзя исключить, что даже слабая иммобилизация может вызвать сдвиг равновесия между линейной и компактной амфифильной конформациями пептида. В связи с этим вопрос о том, с белковыми и (или) липидными компонентами поверхности мембраны взаимодействует пептид, пока остается открытым.

Результаты исследования с использованием спин-зондов показали, что ДСИП вызывает заметное изменение физико-химического состояния липидных компонентов мембран. Тот факт, что наиболее отчетливо разупорядочивание липидов регистрировали в центральной гидрофобной области бислоя, объясняется, по-видимому, тем, что в случае плазматических мембран эритроцитов под действием ДСИП имеет место вытеснение ряда белковых молекул, погруженных в мембрану.

Таким образом, под влиянием ДСИП были выявлены отчетливые изменения структуры эритроцитарных мембран, что может иметь прямое отношение к их функциональному состоянию. В данной работе в опытах *in vitro* со спин-зондами

обнаружена зависимость амплитуды эффекта пептида от исходной жесткости мембранных структур (по параметрам упорядоченности и микровязкости). Можно полагать, что, скорее всего, механизмы (направление) модуляторного действия ДСИП начинают реализовываться на самых начальных “физико-химических” этапах воздействия пептида на клетку, т.е. на уровне его взаимодействия с клеточными мембранами. Однако пока не ясно, какой вклад в механизмы модуляторного действия пептида вносит факт существования разных конформационных форм пептида – линейной и глобулоподобной, и что определяет сдвиг равновесия в сторону той или другой конформации в клетке (*in situ*).

Результаты представленной работы обсуждались на X Международной конференции “Магнитный резонанс в химии и биологии” [15].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5-, 12- и 16-доксилстеариновые кислоты, а также 3-доксиландростанол-17 β (Sigma, США), сукцинимидный эфир 1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпирролин-3-карбоновой кислоты (Reanal, Венгрия). Хроматограф System Gold (Beckman, США). Аналитическая колонка Nucleosil 5C18 (4 \times 200 мм) (Macherey-Nagel, Германия). Масс-спектры регистрировали в режиме MALDI-MS (TOF) на приборе Vision 2000 (ThermoBioanalysis, Finnigan MAT). Синтез ДСИП описан ранее в работе [9].

Синтез спин-меченого производного ДСИП. К раствору 10 мг (11.8 мкмоль) ДСИП в 1 мл 5% NaHCO₃ (рН 9.4) добавляли раствор 16.5 мг (59 мкмоль) сукцинимидного эфира 1-оксил-2,2,5,5-тетраметилпирролин-3-карбоновой кислоты в 0.4 мл перегнанного диметилсульфоксида и оставляли при перемешивании на ночь в темноте. Контроль за прохождением реакции проводили при помощи ТСХ в системе хлороформ–ацетон–уксусная кислота (5 : 4 : 1) на пластинках с закрепленным слоем силикагеля фирмы Merck (Германия) и ВЭЖХ при градиентной элюции ацетонитрилом в 0.1% TFA (от 0 до 100% за 20 мин). Реакционную смесь разделяли на колонке 1.5 \times 50 см с сефадексом LH-20 (Pharmacia). В качестве элюента использовали 50% этанол, подаваемый со скоростью 24 мл/ч. Детекцию вели при 226 нм. Фракции, содержащие требуемое вещество, объединяли, упаривали на ротационном испарителе и лиофилизировали. Получено 7 мг (65%) спин-меченого аналога ДСИП со степенью чистоты более 95%.

Получение суспензии эритроцитов и условия инкубации со спин-зондами и пептидами. Источником эритроцитов служила свежая донорская кровь, которую хранили в холодильнике при 5°C не более трех суток после взятия. Эритроциты

отделяли от других клеток крови и отмывали от следов плазмы и содержащего гепарин консервирующего раствора путем 3-кратного центрифугирования в течение 15 мин при 1320 *g* и 10-кратном разбавлении буферным раствором (рН 7.4), содержащим 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgSO₄, 3.5 мМ Na₂HPO₄, 1.5 мМ NaH₂PO₄, 0.1 мМ CaCl₂ и 1 мМ глюкозу. Концентрация эритроцитов в пробах для измерения спектров ЭПР соответствовала (0.8–1.2) $\times 10^9$ клеток в 1 мл. Используемые парамагнитные зонды вводили в суспензию эритроцитов в виде 10 мМ спиртовых растворов для получения окончательной концентрации 0.1 мМ. Инкубацию эритроцитов с пептидами и спин-зондами проводили 30 мин при температуре 37°C. Введение пептидов предшествовало введению зонда. Исследуемые концентрации пептидов получали методом последовательного разведения.

Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре E-4 (Varian, США) при 37°C. Условия записи следующие: развертка магнитного поля – 100 Гс; амплитуда модуляции – 0.5–1.0 Гс; СВЧ-мощность – 10 мВт; время развертки – 8 мин.

Для всех используемых зондов параметр упорядоченности *S* рассчитывали по формуле, взятой из работы [16],

$$S = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{A_{zz} - 0.5(A_{xx} + A_{yy})},$$

где A_{zz} , A_{xx} , A_{yy} – главные компоненты тензора сверхтонкой структуры спектра ЭПР спинового зонда в кристаллической решетке монокристалла (взяты из [14]), A_{\max} – половина расстояния между крайними экстремумами в спектре ЭПР хаотически ориентированного образца (от первого максимума до последнего минимума); A_{\min} – половина расстояния от первого минимума до последнего максимума.

Для быстровращающихся зондов, спектр ЭПР которых был близок к изотропному (16-доксилстеариновая кислота, спин-меченый ДСИП), τ_c рассчитывали по формуле [16]

$$\tau_c = 6.65 \times \Delta H_{+1} [(I_{+1}/I_{-1})^{1/2} - 1] \times 10^{-10} \text{ с},$$

где ΔH_{+1} – полуширина низкочастотной компоненты триплетного сигнала ЭПР, I_{+1} – ее амплитуда, а I_{-1} – амплитуда высокочастотной компоненты.

Для зондов с анизотропным спектром ЭПР (медленное вращение) расчет τ_c производили по формуле [17]

$$\tau_c = a \times (1 - S)^b,$$

где *S* – фактор упорядоченности, *a* и *b* – константы, характеризующие различные типы диффузии.

Результаты исследований обрабатывали статистически с применением *t*-критерия Стьюдента.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50511).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Monnier M., Dudler L., Gaechter R., Schoenenberger G.A. // *Neurosci. Lett.* 1977. V. 6. P. 9–13.
2. Graf M.V., Kastin A.J. // *Peptides*. 1986. V. 7. P. 1165–1187.
3. Inoue S. *Biology of Sleep Substances*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1989.
4. Рихирева Г.Т., Маклецова М.Г., Менджерский А.М., Вартамян Л.С., Гуревич С.М., Лозовская Е.Л., Копыловский С.А., Рылова А.В., Прудченко И.А., Михалева И.И. // *Изв. РАН. Серия биол.* 1993. № 2. С. 243–256.
5. Маклецова М.Г., Рихирева Г.Т., Менджерский А.М., Колесникова Л.В., Копыловский С.А., Михалева И.И. // *Нейрохимия*. 1995. Т. 12. С. 34–39.
6. Kastin A.J., Banks W.A., Castellanos P.F., Nissen C., Coy D.H. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1982. V. 17. P. 1187–1191.
7. Raeissi S., Audus K.L. // *J. Pharmacol.* 1989. V. 41. P. 848–852.
8. Набиев И.Р., Саргсян А.С., Ефремов Е.С., Михалева И.И., Иванов В.Т. // *Биоорг. химия*. 1982. Т. 8. С. 900–904.
9. Gray R.A., Vander Velde D.G., Burke C.J., Manning M.C., Middaugh C.R., Borchardt R.T. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 1323–1331.
10. Khvatova E.M., Rubanova N.A., Prudchenko I.A., Mikhaleva I.I. // *FEBS Lett.* 1995. V. 368. P. 367–369.
11. Панасенко О.М., Вольнова Т.В., Азизова О.А., Владимиров Ю.А. // *Биол. мембраны*. 1988. Т. 5. С. 1186–1191.
12. Лелекова Т.В., Романовский П.Я., Александров П.Н., Ашмарин И.П. // *Бюлл. эксперим. биол. и медицины*. 1989. Т. 57. С. 8–10.
13. Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н. // *Метод спиновых зондов (проблемы и перспективы)* / Ред. Р.И. Жданов. М.: Наука, 1976. С. 212–225.
14. Griffith O.H., Jost P.C. // *Spin Labeling. Theory and Applications* / Ed. L.J. Berliner. New York; San Francisco; London: Acad. Press, 1976. P. 489–569.
15. Рихирева Г.Т., Голубев И.Н., Копыловский С.А., Михалева И.И., Полезина А.С., Прудченко И.А. // *Сб. тез. X Межд. конф. "Магнитный резонанс в химии и биологии"*, Суздаль, 1998. С. 170–171.
16. Кузнецов А.Н. *Метод спинового зонда (основы и применение)*. М.: Наука, 1976.
17. Freed J.H. // *Spin Labeling. Theory and Applications* / Ed. L.J. Berliner. New York; San Francisco; London: Acad. Press, 1976. P. 64–155.

The *in vitro* Interaction of Delta-Sleep-Inducing Peptide with Cell Membranes

G. T. Rikhireva*, I. N. Golubev**, S. A. Kopylovskii*, I. A. Prudchenko***, and I. I. Mikhaleva***

* *Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 117977 Russia*

** *State Research Institute of Organic Chemistry and Technology, sh. Entusiastov 23, Moscow, 111024 Russia*

*** *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

The effect of delta-sleep-inducing peptide (DSIP) on erythrocytic membranes of human donor blood was studied by the spin label and spin probe methods. The spin-labeled derivative of DSIP containing the *N*-terminal residue of 1-oxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-3-carboxylic acid was synthesized. An analysis of the ESR spectra of the spin-labeled DSIP derivative recorded after its incubation with a human erythrocyte suspension at 37°C revealed a decrease in the rotational correlation time (τ_c) and molecular order parameter (*S*) in comparison with the control solutions of the peptide in phosphate buffer (pH 7.4). The application of paramagnetic probes, 5-, 12-, and 16-doxylstearic acids and 3-doxylandrostanol, demonstrated that the introduction of DSIP in an erythrocytic suspension significantly increased the mobility of the hydrophobic area of the membrane bilayer both at a depth of 20–22 Å and in the subsurface area (4–6 Å). The dependence of these effects on the DSIP concentration was shown to have the form of a curve with well-defined extremes. The maximal disordering of membrane lipids was observed at peptide concentrations of 10⁻⁹ and 10⁻⁶ M. These results suggested that DSIP significantly affected the structure of plasmatic membranes *in vitro* by changing the physical state of their lipid components.

Key words: delta-sleep-inducing peptide, DSIP, ESR, human erythrocytes, plasma membranes, spin labels, spin probes

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 335-5366; e-mail: imikha@ibch.siobc.ras.ru.