

Естественные науки. 2022. № 3 (8). С. 4–14.

Yestestvennyye nauki = Natural Sciences. 2022; no. 3(8):4–14 (In Russ.)

Научная статья

УДК 577.3

doi 10.54398/1818507X_2022_3_4

**ЭФФЕКТЫ ГИПОТЕРМИИ
НА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
БЕЛКОВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС**

Кличханов Н. К.¹, Джафарова А. М.²✉

^{1,2}Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

²albinal9764@mail.ru ✉

Аннотация. Известно, что снижение температуры тела крыс до 30 °С (умеренная гипотермия) сопровождается развитием окислительного стресса, выраженность которого зависит от длительности гипотермии. Окислительные модификации белков могут способствовать существенным изменениям их структурно-динамических свойств, чувствительными индикаторами которых могут быть спектральные характеристики. Целью данного исследования явилось исследование эффектов гипотермии на флуоресцентные характеристики белков мембран эритроцитов крыс. Обнаружено, что кратковременная гипотермия приводит к существенному снижению суммарной флуоресценции мембранных белков. Причём наибольший вклад в данное снижение вносят остатки триптофана. Пролонгирование гипотермии способствует дальнейшему снижению как суммарной, так и триптофановой флуоресценции белков. Существенные изменения при гипотермии затрагивают и вторые производные спектров, которые позволяют предположить существенные изменения локализации ароматических флуорофоров в белках эритроцитарных мембран. Интересно то, что кратковременная гипотермия сопровождается отсутствующей на контрольных спектрах небольшой вспышкой тирозиновой флуоресценции, которая сохраняется и при пролонгировании гипотермии. Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее выраженные структурно-конформационные изменения в белках мембран эритроцитов происходят на начальных этапах снижения температуры тела крыс.

Ключевые слова: гипотермия, крысы, эритроциты, мембраны, белки, флуоресцентные характеристики

Для цитирования: Кличханов Н. К., Джафарова А. М. Эффекты гипотермии на флуоресцентные характеристики белков мембран эритроцитов крыс // Естественные науки. 2022. № 3 (8). С. 4–14. https://doi.org/10.54398/1818507X_2022_3_4.

THE EFFECTS OF HYPOTHERMIA ON THE FLUORESCENT CHARACTERISTICS OF RAT ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEINS

Klichkhanov N. K.¹, Jafarova A. M.²✉

^{1,2}Dagestan State University, Makhachkala, Russia

²albinal9764@mail.ru✉

Abstract. The decrease in body temperature in rats to 30 °C (moderate hypothermia) is accompanied by the development of oxidative stress, the severity of which depends on the duration of hypothermia. Oxidative modifications of proteins can contribute to significant changes in their structural and dynamic properties, sensitive indicators of which can be spectral characteristics. The aim of this study was to investigate the effects of hypothermia on the fluorescent characteristics of rat erythrocyte membrane proteins. It was found that short-term hypothermia leads to a significant decrease in the total fluorescence of membrane proteins. Moreover, the most significant contribution to this decrease is made by tryptophan residues. Prolongation of hypothermia contributes to a further decrease in both total and tryptophan fluorescence of proteins. Significant changes during hypothermia also affect the second derivatives of the spectra, which suggest significant changes in the localization of aromatic fluorophores in erythrocyte membrane proteins. It is interesting that short-term hypothermia is accompanied by a small flash of tyrosine fluorescence, absent in the control spectra, which persists even after prolongation of hypothermia. The data obtained indicate that the most pronounced structural-conformational changes in the proteins of erythrocyte membranes occur at the initial stages of a decrease in body temperature of rats.

Keywords: hypothermia, rats, erythrocytes, membranes, proteins, fluorescent characteristics

For citation: Klichkhanov N. K., Jafarova A. M. Effects of hypothermia on the fluorescent characteristics of rat erythrocyte membrane proteins. *Yestestvennye nauki = Natural Sciences*. 2022; no. 3(8):4–14. https://doi.org/10.54398/1818507X_2022_3_4.

Температура — один из важнейших экологических факторов, определяющих скорости физико-химических процессов и стабильность биологических структур. Поэтому изменение температуры окружающей среды требует выработки у живых организмов различных адаптивных механизмов. У животных различают две стратегии адаптации — резистентную и толерантную. Гомойотермия является резистентной стратегией, так как при существенном изменении температуры окружающей среды включаются механизмы терморегуляции, направленные на поддержание постоянной температуры тела. Однако при интенсивной теплоотдаче, терморегуляторные механизмы могут не справиться со своей задачей, и температура тела может значительно снизиться. Эти состояния животного, называемые гипотермическими, очень опасны для высших позвоночных, что требует немедленной реакции со стороны организма, направленной на его выживание.

На начальных этапах гипотермия сопровождается возбуждением симпатической нервной системы, провоцируя дрожь, гипертонию, тахикардию, тахипноэ и сужение сосудов. Изменения микроциркуляции могут привести к снижению кровотока, седиментации эритроцитов, увеличению вязкости крови, которая увеличивает снижение доступности кислорода в тканях,

что приводит к ситуации гипоксии, ацидоза [8]. Системным эффектом этих реакций является повышенная продукция активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса [7; 8; 10]. Было обнаружено, что при кратковременной умеренной гипотермии (температура тела 30 °С) и её пролонгировании в течение 1,5 ч существенно активируются процессы окислительной модификации как липидов, так и белков мембран эритроцитов крыс [1]. Окислительная деструкция липидов и белков мембран может сказаться на структуре и свойствах связанных с мембранами ферментов, рецепторов, транспортных белков. В частности, было показано, что при кратковременной умеренной гипотермии активность и кинетические характеристики АХЭ в составе мембран эритроцитов существенно изменяются [5]. Исследование кинетики тепловой денатурации АХЭ указало на существенные модификации в структуре фермента [4], в которых определённую роль могут играть и АФК. Подобные изменения, скорее всего, затрагивают и другие мембранно-связанные белки эритроцитов, приводя к модуляции их функциональной активности. Одним из чувствительных методов регистрации структурно-динамических изменений мембранных белков является флуоресцентная спектроскопия. Целью данной работы явилось исследование эффектов умеренной гипотермии на флуоресцентные характеристики белков эритроцитов крыс.

Материалы и методы исследования. Животные. Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 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. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная (5 °С) вода. Температуру тела крыс снижали равномерно со скоростью 0,28 °С/мин. до 30 °С (кратковременная умеренная гипотермия), поддерживали этот уровень гипотермии в течение 90 и 180 мин. (пролонгированная умеренная гипотермия). Температуру измеряли в прямой кишке на глубине 4–5 см ректальным цифровым термометром MS6501.

Получение препарата эритроцитарных мембран. После декапитации животного кровь собирали в пробирку с гепарином. Для осаждения эритроцитов кровь центрифугировали при 3 000 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 минус 20 °С и использовали на следующие сутки. Белок во фракции мембран эритроцитов определяли по методу Лоури [14].

Измерение собственной флуоресценции. Измерения собственной флуоресценции белков мембран эритроцитов проводили на спектрофлуориметре

“Hitachi F-7000” (Япония) с автоматической коррекцией спектров. Спектр флуоресценции снимали в диапазоне $290 \text{ нм} \leq \lambda \leq 400 \text{ нм}$ при длине волны возбуждения 280 нм (суммарная флуоресценция) и 295 нм (триптофановая флуоресценция). Обработку спектров производили в программе “Origin 8.6”.

Статистическая обработка результатов. Обработку данных произведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета «СТАТИСТИКА». Достоверность различия определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости $P \leq 0,05$. Среднестатистические спектры флуоресценции получали путём усреднения спектральных линий, полученных в повторных экспериментах ($n = 8$) с использованием Фурье-фильтрации (по пяти точкам).

Результаты исследования и их обсуждение. Исследование суммарной флуоресценции белков мембран эритроцитов ($\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$), представленное на рисунке 1, показало, что спектры эмиссии имеют симметричную колоколообразную форму с максимумом интенсивности флуоресценции (I_{max}) при 333 нм. Такое положение максимума указывает на то, что основной вклад во флуоресценцию вносят триптофановые остатки белков, локализованные в одинаковом гидрофобном и достаточно жёстком окружении. Этот факт хорошо согласуется с литературными данными, в соответствии с которыми суммарная флуоресценция белков в основном определяется количеством и локализацией остатков триптофана [6]. Известно, что тирозин и триптофан присутствует в трансмембранных фрагментах всех белков. Триптофан в достаточно большом количестве присутствует в мембранных белках эритроцитов. Показано, что в субъединицах спектрина содержится 42 остатка триптофана. Они участвуют в стабилизации спектрина и размещены в его очень стабильных фрагментах [11].

Из рисунка 1 видно, что в спектре флуоресценции мембранных белков контрольных животных свечение остатков тирозина практически не регистрируется. Известно, что значительная доля энергии возбуждения, полученная тирозиновыми остатками, может мигрировать на триптофанилы и высвечиваться в качестве триптофанового компонента [3]. Такой перенос энергии называется Фёрстеровским резонансным переносом энергии — это безызлучательный переход энергии от возбуждённого флуорофора-донора к флуорофору-акцептору, находящемуся в основном состоянии. При этом донор и акцептор должны располагаться очень близко, на расстоянии Фёрстеровского радиуса (1–10 нм). Исходя из этого, можно предположить, что в белках мембран эритроцитов контрольных крыс ароматические радикалы локализованы, главным образом, в очень близком соседстве в гидрофобном окружении.

Из рисунка 1 видно, что уже на начальных этапах умеренной (30 мин.) гипотермии происходит существенное снижение интенсивности суммарной флуоресценции белков мембран эритроцитов. В частности, I_{max} (максимальная интенсивность флуоресценции) у гипотермированных животных снижается на 23,7 % (контроль — 600 отн. ед., гипотермия 30 мин. — 458 отн. ед.;

$P \leq 0,05$). Пролонгирование гипотермии до 90 мин. не оказывает дальнейшего эффекта, однако пролонгирование в течение 180 мин. способствует ещё более выраженному падению суммарной флуоресценции. Так, I_{\max} относительно контроля снижается на 33,4 % (контроль — 600 отн. ед., гипотермия 180 мин. — 400 отн. ед.; $P \leq 0,05$).

Изменения затрагивают и характер спектров флуоресценции: происходит сдвиг пика флуоресценции в коротковолновую область:

(333 нм (контроль) → 332 нм (гипотермия 30 и 90 мин.) → 330 нм (гипотермия 180 мин.).

Кроме того, спектры флуоресценции явно демонстрируют, что гипотермия сопровождается спектральной асимметрией с формированием слабого плеча на $\lambda = 312$ нм. Данный пик соответствует флуоресценции аминокислотных остатков тирозина.

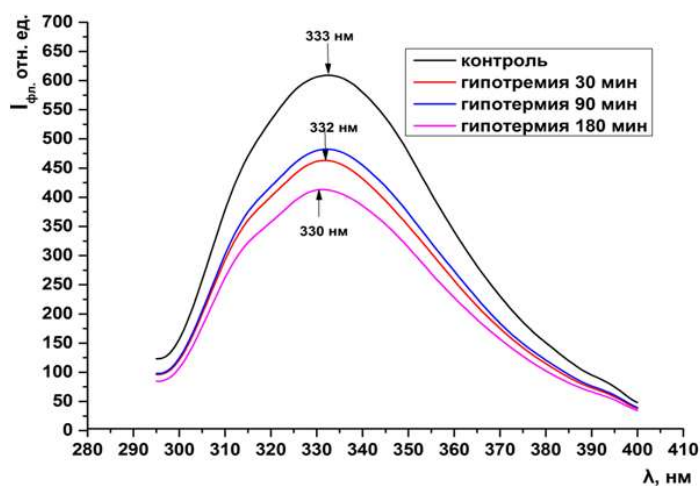


Рисунок 1 — Спектры суммарной флуоресценции белков эритроцитарных мембран крыс в норме и при гипотермии различной длительности

Для получения более детальной информации о дифференцированном вкладе различных остатков ароматических аминокислот в спектры флуоресценции, а также об их микроокружении целесообразно применять вторые производные спектров флуоресценции (2ПСФ). Анализ вторых производных суммарной флуоресценции белков мембран выявил основной отрицательный пик на 312 нм у крыс при всех исследованных физиологических состояниях (рис. 2). Как уже упоминалась ранее, данный пик соответствует флуоресценции тирозина.

В белках мембран эритроцитов контрольных животных на 2ПСФ суммарной флуоресценции наряду с основным отрицательным пиком обнаруживаются ещё три отрицательных пика на 328, 336, 347 нм. Эти пики соответствуют флуоресценции триптофановых остатков, имеющих разное по степени полярности окружение (рис. 2). Из рисунка 2 видно, что при кратковременной гипотермии в спектре, кроме основного отрицательного пика (330 нм), все другие пики исчезают. Пролонгирование гипотермии в течение

90 мин. способствует появлению плеча на 336 нм и восстановлению отрицательного пика на 347 нм, который сохраняется и при дальнейшем пролонгировании гипотермии.

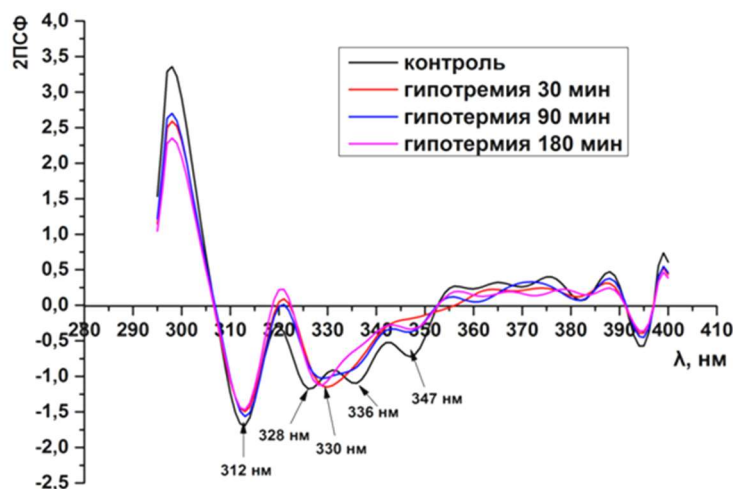


Рисунок 2 — Вторые производные спектров (2ПСФ) суммарной флуоресценции белков эритроцитарных мембран крыс в норме и при гипотермии различной длительности

Поскольку основной вклад во флуоресценцию мембранных белков эритроцитов вносят остатки триптофана, нами была проанализированы спектры триптофановой флуоресценции в контроле и при гипотермии. Как видно из рисунка 3, при кратковременной умеренной гипотермии интенсивность триптофановой флуоресценция белков мембран становится существенно меньше. Так, I_{\max} снижается на 14 % (контроль — 265 отн. ед., гипотермия 30 мин. — 228 отн. ед.; $P \leq 0,05$). В динамике пролонгирования гипотермии происходит дальнейшее, более выраженное по сравнению с кратковременной гипотермией, снижение флуоресценции данного флуорофора. В частности, I_{\max} снижается на 31,4 % (контроль — 265 отн. ед., гипотермия 180 мин. — 182 отн. ед.; $P \leq 0,05$).

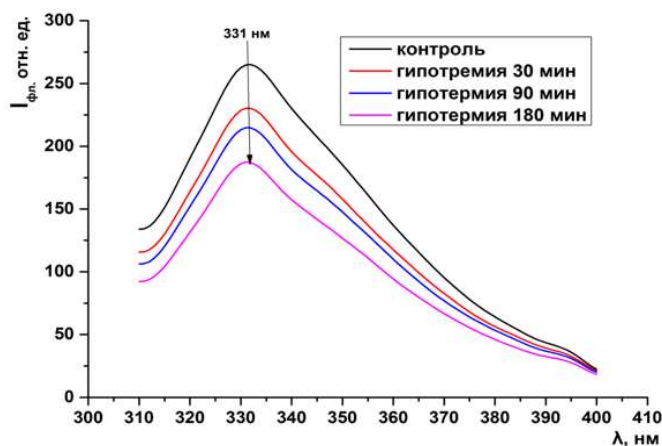


Рисунок 3 — Спектры триптофановой флуоресценции белков эритроцитарных мембран крыс в норме и при умеренной гипотермии различной длительности

Для того чтобы разделить вклад отдельных триптофановых остатков в общую триптофановую флуоресценцию были анализированы вторые производные спектров. Из рисунка 4 видно, что на 2ПСФ триптофановых остатков в белках мембран эритроцитов контрольных животных имеет место основной отрицательный пик на 330 нм и дополнительный на 350 нм, типичные для триптофановой флуоресценции. Кратковременная и пролонгированная 90-минутная гипотермия приводит к появлению пика на 347 нм, 180 мин. пролонгированной гипотермии на 354 нм. Из полученных данных следует, что гипотермия затрагивает периферические хромофоры мембранных белков эритроцитов (исчезновение, смещение и появление новых пиков), тогда как триптофановые остатки в центре глобулы сохраняют своё положение в максимуме свечения на 330 нм.

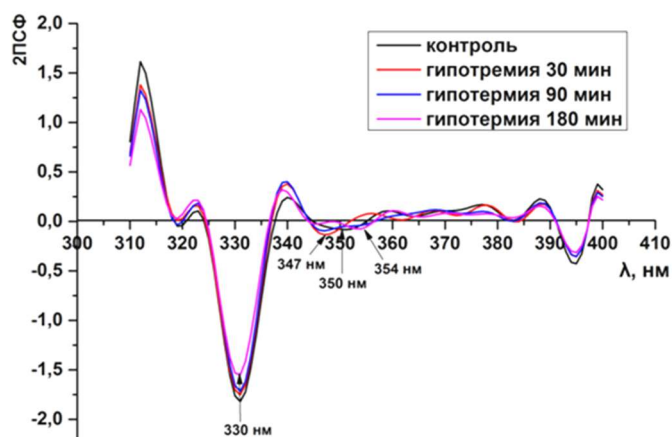


Рисунок 4 — Вторые производные спектров (2ПСФ) триптофановой флуоресценции белков мембран эритроцитов крыс в норме и при умеренной гипотермии различной длительности

Таким образом, кратковременная гипотермия приводит к существенному снижению суммарной флуоресценции мембранных белков. Причём наиболее значимый вклад в это снижение вносят остатки триптофана, что также подтверждается исследованием триптофановой флуоресценции. Пролонгирование гипотермии способствует дальнейшему снижению как суммарной, так и триптофановой флуоресценции белков. Существенные изменения при гипотермии затрагивают и 2ПСФ, которые позволяют предположить существенные изменения локализации триптофанилов в белках эритроцитарных мембран. Интересно то, что кратковременная гипотермия сопровождается отсутствующей на контрольных спектрах небольшой вспышкой тирозиновой флуоресценции, которая сохраняется и при пролонгировании гипотермии.

Снижение триптофановой флуоресценции при гипотермии может быть обусловлено двумя причинами. Во-первых, оно может быть связано с его непосредственным окислением АФК. Известно, что триптофановые остатки являются наиболее чувствительными к модификации в условиях окислительного стресса и поэтому являются одними из индикаторов интенсивности окислительного стресса. Проведённое ранее исследование спектральных

характеристики белков мембран митохондрий при кратковременной гипотермии также выявило снижение как суммарной, так и триптофановой флуоресценции в белках мембран митохондрий [7].

In vitro было показано, что АФК оказывают существенное влияние на содержание триптофана в белках мембран. В частности, гидроксильный радикал приводил к снижению концентрации триптофана в митохондриальных мембранах клеток сердца крысы [9]. В этой же работе обнаружено, что в изолированном саркоплазматическом ретикулуме крысы, подвергнутом воздействию радикалов кислорода, происходили структурные изменения, сопровождающиеся деградацией триптофана. Наряду с этим происходит накопление битирозина и продуктов перекисного окисления липидов.

Вместе с тем показано, что триптофан участвует также в защите клеток от свободных радикалов, являясь их ловушкой. Показано, что трансмембранные домены интегральных белков, которые характеризуются высокой конденсацией тирозина и триптофана, играют антиоксидантную роль внутри липидного бислоя и защищают клетки от окислительных повреждений [15]. Известно, что длинноцепочечные ацилпроизводные триптофана и тирозина являются сильными ингибиторами ПОЛ и гибели клеток, вызванной окислительными повреждениями [12].

Процесс деградации остатков триптофана, происходящий под влиянием АФК, может активизировать окислительные повреждения эритроцитов. Значительное снижение концентрации триптофана в начале гипотермии, обнаруженное нами, означает потерю защитных способностей мембраны эритроцитов. Следует обратить особое внимание, что в течение первых 30 мин. достижения гипотермического состояния падение интенсивности суммарной флуоресценции белков мембран эритроцитов является более резко выраженным по сравнению с последующим пролонгированием этого состояния до 180 мин. То есть наиболее интенсивные окислительные процессы, способствующие существенной модификации молекулярных структур, происходят на начальных этапах достижения гипотермического состояния. Интересно то, что эффекты кратковременной гипотермии более ярко выражены в исследовании суммарной белковой флуоресценции, нежели триптофановой. Следовательно, снижение общей флуоресценции мембранных белков эритроцитов обусловлено не только окислением триптофановых хромофоров, но и хромофоров тех ароматических аминокислот, с которых энергия возбуждённого состояния способна переноситься на триптофан (тирозина и фенилаланина).

Следует обратить внимание на то, что никаких изменений в положении пика тирозиновой флуоресценции при гипотермии не происходит (на вторых производных у всех исследованных групп крыс максимум флуоресценции тирозина приходится на 312 нм). Известно, что спектры флуоресценции хромофоров тирозина по положению и форме практически не отличаются при значительных отклонениях свойств окружения [3]. Так, тирозин интенсивно флуоресцирует в растворе при денатурации белков различными агентами, сохраняя положение максимума.

Возгорание тирозиновой флуоресценции на спектрах флуоресценции белков гипотермированных крыс также свидетельствовать о конформационных изменениях структуры мембранных белков. В результате этих изменений расстояние между остатками тирозина и триптофана увеличивается, что снижает вероятность Фёрстеровского резонансного переноса энергии на триптофанилы и может указывать о конформационных перестройках белков в липидной матрице. В результате таких пертурбаций интенсивность свечения триптофана при гипотермии снижается.

Одной из возможных причин снижения триптофановой флуоресценции могут быть существенные конформационные изменения мембранных белков, в результате которых хромофорные группы триптофанилов становятся более доступными для молекул воды с растворёнными в ней тушителями (в частности, прооксидантами) флуоресценции. Причиной таких перестроек может являться не только собственно окислительная модификация белков, но дезорганизация эритроцитарной мембраны в результате интенсификации процессов перекисного окисления липидов.

Ряд литературных данных, в том числе и собственных, указывают на то, что под действие холодового стресса в начале гипотермии интенсифицируются процессы образования АФК в различных тканях, приводящие к окислительной модификации липидов и белков мембран клеток [7; 8; 10]. Было обнаружено, что в белках мембран эритроцитов происходит активация процессов окислительной модификации [1]. Но пролонгирование умеренной гипотермии в течение трёх часов способствует снижению интенсивности свободнорадикальных процессов в клетках, в том числе и в эритроцитах, за счёт увеличения содержания компонентов антиоксидантной защиты (глутатиона и сульфгидрильных групп мембранных белков) и повышения активности СОД [2]. Однако в соответствии с результатами данного исследования нормализации в спектрах флуоресценции белков эритроцитов при пролонгировании гипотермии не происходит. Вероятно, это связано с тем, что окисление ароматических радикалов в мембранных белках носит, в отличие от тиоловых групп, необратимый характер и требует активации механизмов деградации и замены повреждённых белков для сохранения функциональных свойств мембран эритроцитов.

Список литературы

1. Аль-Рабии, М. А. М. Свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии разной длительности / М. А. М. Аль-Рабии, М. Д. Астаева, Н. К. Кличханов // *Естественные науки*. — 2015. — № 50 (1). — С. 35–42.
2. Аль-Рабии, М. А. М. Осмотическая резистентность эритроцитов крыс и концентрация тиоловых групп белков их мембраны зависят от длительности умеренной гипотермии / М. А. М. Аль-Рабии, Ш. И. Чалабов, М. Д. Астаева, Н. К. Кличханов. — URL: www.science-education.ru/123-17364.
3. Дюбко, Т. С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. Собственная флуоресценция белков / Т. С. Дюбко // *Вестник Харьковского национального университета имени А. Н. Каразина. Серия: биология*. — 2006. — № 3 (729). — С. 221–231.

4. Кличханов, Н. К. Кинетика тепловой денатурации ацетилхолинэстеразы мембран эритроцитов крыс при умеренной гипотермии / Н. К. Кличханов, А. М. Джафарова // Биофизика. — 2018. — № 63 (4). — С. 677–689.
5. Кличханов, Н. К. Кинетические характеристики ацетилхолинэстеразы и структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов крыс при умеренной гипотермии / Н. К. Кличханов, А. М. Джафарова, М. А. М. Аль-Рабии // Биологические мембраны. — 2017. — № 34 (3). — С. 201–214.
6. Онищенко, Е. Н. Влияние низкомолекулярных криопротекторов и замораживания на флуоресцентные свойства микросомальных белков / Е. Н. Онищенко, Т. С. Дюбко, А. Ю. Семенченко // Актуальные проблемы медицины и биологии. — Киев, 2004. — С. 106–117.
7. Халилов, Р. А. Интенсивность свободно-радикальных процессов в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности / Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, С. И. Хизриева, В. Р. Абдуллаев. // Цитология. — 2019. — № 91 (7). — С. 1–12.
8. Эмирбеков, Э. З. Свободно-радикальные процессы и состояние мембран при гипотермии / Э. З. Эмирбеков, Н. К. Кличханов. — Ростов-на-Дону : Южный федеральн. ун-т, 2011. — 199 с.
9. Babusikova, E. Oxidative alternations in rat heart homogenate and mitochondria during ageing / E. Babusikova, M. Jesenak, P. Racay, D. Dobrota, P. Kaplan // Gen. Physiol. Biophys. — 2008. — № 27. — P. 115–120.
10. Blagojević, D. Free radical biology in hypothermia / D. Blagojević // Systems biology of free radicals and antioxidants / ed. I. Laher. — Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2014. — P. 376–392.
11. Chakrabarti, A. Spectrin organization and dynamics: new insights / A. Chakrabarti, D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay // Biosci. Rep. — 2006. — № 26. — P. 369–386.
12. Cibulka, R. Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure / R. Cibulka, J. Racek // J. Physiol. Res. — 2007. — № 56. — С. 697–705.
13. Dodge, I. N. The preparation and hemical characteristics of hemoglobin — free shosts of human erythrocyts / I. N. Dodge, C. Mitchell, D. Hanahan // Arch. Biochem. and Biophys. — 1963. — № 100 (1). — P. 119–130.
14. Lowry, D. H. Protein measurement with the Folin-phenol reagent / D. H. Lowry, H. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — № 193 (1). — P. 265–275.
15. Olszewska, M. Oxidative stress modulates the organization of erythrocyte membrane cytoskeleton / M. Olszewska, J. Wiatrow, J. Bober et al. // Postepy Hig. Med. Dosw. — 2012. — № 66. — P. 534–554.

References

1. Al-Rabii, M. A. M., Astaeva, M. D., Klichhanov, N. K. Svobodno-radikalnye processy v krvi krysv pri umerennoy gipotermii raznoy dlitelnosti. *Estestvennye nauki = Natural Science*. 2015; 50 (1): 35–42.
2. Al-Rabii, M. A. M., Chalabov, Sh. I., Astaeva, M. D., Klichhanov, N. K. Osmoticheskaia rezistentnost yeritrotsitov krysv i kontsentratsiya tiolovykh grupp belkov ih membrany zavisiyat ot dlitelnosti umerennoy gipotermii. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education*. Available at: www.science-education.ru/123-17364.
3. Dyubko, T. S. O nekotorykh aspektakh primeneniya fluorestsentsnogo analiza v kriobiologii. Sobstvennaya fluorestsentsiya belkov. *Vestnik Kharkovskogo natsionalnogo universiteta imeni A. N. Karazina. Seriya: biologiya = Bulletin of A. N. Karazin Kharkiv National University. Series: biology*. 2006; 3(729):221–231.

4. Klichkhanov, N. K., Dzhafarova, A. M. Kinetika teplovoy denaturatsii atsetilkholinesterazy membran eritrotsitov kry's pri umerennoy gipoteramii. *Biofizika = Biophysics*. 2018; 63 (4): 677–689.

5. Klichkhanov, N. K., Dzhafarova, A. M., Al-Rabii, M. A. M. Kineticheskie kharakteristiki atsetilkholinesterazy i strukturno-funktsionalnoe sostoyanie membran eritrotsitov kry's pri umerennoy gipotermii. *Biol. Membrany = Biol. membranes*. 2017; 34(3):201–214.

6. Onishchenko, E. N., Dyubko, T. S., Semenchenko, A. Yu. Vliyanie nizkomolekulyarnykh krioprotektorov i zamorazhivaniya na fluorestsentnye svoystva mikrosomalnykh belkov. *Aktualnye problemy meditsiny i biologii = Actual problems of medicine and biology*. Kiev; 2004:106–117.

7. Khalilov, R. A., Dzhafarova, A. M., Khizrieva, S. I., Abdullaev, V. R. Intensivnost svobodnoradikalnykh protsessov v mitokhondriyakh pecheni kry's pri umerennoy gipotermii razlichnoy dlitelnosti. *Tsitologiya = Cytology*. 2019; 91(7):1–12.

8. Yemirbekov, Ye. Z., Klichkhanov, N. K. Svobodnoradikalnye protsessy i sostoyanie membran pri gipotermii. Rostov-on-Don: South Federal University, 11:199 p.

9. Babusikova, E., Jesenak, M., Racay, P., Dobrota, D., Kaplan, P. Oxidative alternations in rat heart homogenate and mitochondria during ageing. *Gen. Physiol. Biophys.* 2008; 27:115–120.

10. Blagojević, D. Free radical biology in hypothermia. *Systems biology of free radicals and antioxidants*. Ed. By I. Laher. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2014:376–392.

11. Chakrabarti, A., Kelkar, D. A., Chattopadhyay, A. Spectrin organization and dynamics: new insights. *Biosci. Rep.* 2006; 26:369–386.

12. Cibulka, R., Racek, J. Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure. *J. Physiol. Res.* 2007; 56:697–705.

13. Dodge, I. N., Mitchell, C., Hanahan, D. The preparation and hemical characteristics of hemoglobin – free shosts of human erythrocyts. *Arch. Biochem. and Biophys.* 1963; 100(1):119–130.

14. Lowry, D. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–275.

15. Olszewska, M., Wiatrow, J., Bober, J. et al. Oxidative stress modulates the organization of erythrocyte membrane cytoskeleton. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2012; 66:534–554.

Информация об авторах

Кличханов Н. К. — доктор биологических наук, профессор;
Джафарова А. М. — кандидат биологических наук, доцент.

Information about the authors

Klichkhanov N. K. — Doctor of Biological Sciences, Professor;
Jafarova A. M. — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article. The authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 16.09.2022; одобрена после рецензирования 19.09.2022; принята к публикации 20.09.2022.

The article was submitted 16.09.2022; approved after reviewing 19.09.2022; accepted for publication 20.09.2022.