

НАТАЛЬЯ ЛЕВИНА, ЮЛО ВАХЕР

## ВЛИЯНИЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРОЛИКОВ В ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

При изучении механизма действия ионизирующих излучений на биологические объекты большой интерес представляет выявление структурных изменений важнейших молекул биосубстратов — белков. Одним из методов, способных улавливать тончайшие изменения в структуре белковых молекул, является люминесцентный анализ. Флуоресценции белков посвящен ряд работ (Баренбойм и др., 1966; Владимиров, 1965; Юденфренд, 1965), направленных в основном на исследование флуоресценции в ультрафиолетовой области спектра. Эта флуоресценция обусловлена наличием в молекуле белка остатков ароматических аминокислот триптофана и тирозина, и в меньшей степени фенилаланина, обладающих системой делокализованных  $\pi$ -электронов в ароматических ядрах и поглощающих свет при длине волн 240—300 нм.

Гораздо менее изучена голубая флуоресценция белков, появляющаяся при возбуждении длинноволновым ультрафиолетом. О механизме ее появления существуют лишь гипотезы. Так, например, С. С. Лерер и Г. Д. Фасман (Lehrer, Fasman, 1964, 1965) предполагают, что видимая флуоресценция белков обуславливается эксимерами остатков ароматических аминокислот. Они показали, что в исследованных ими полипептидах хромофоры образуют конфигурации («стопки»), способные взаимодействовать друг с другом, образуя эксимеры. Установлено, что свойства видимой люминесценции белков являются чувствительными характеристиками исследуемой системы и представляют поэтому большой интерес при изучении действия различных факторов на данную систему (Груздев, Целларнус, 1966).

Исходя из этого, целью настоящей работы было исследование изменения флуоресценции белков плазмы крови в видимой области спектра при действии ионизирующих излучений. Работа В. Д. Скидмора и Ч. Дж. Мак-Галла (Skidmore, McHall, 1969), посвященная этой проблеме и проведенная на крысах, ограничивается изучением раннего периода после облучения организма (первые сутки) и действия сверхлетальных доз (1—10 *крад*). Надо отметить, что приведенные в этой работе выводы об уменьшении интенсивности флуоресценции сыворотки крови в видимой области спектра не вполне убедительны, так как в те же сроки опытов наблюдалось и значительное уменьшение интенсивности флуоресценции в контрольной, необлученной группе животных. Кроме того, авторы не учли возможного уменьшения содержания белков в сыворотке в условиях опытов (голодающие крысы).

В нашей работе впервые изучалось действие гамма-облучения в диапазоне летальных доз на видимую флуоресценцию плазмы крови кроликов в течение длительного времени после облучения (30 суток). Кроме того, исследовалась зависимость флуоресценции плазмы от ряда физических и химических факторов.

### Материал и методика

Опыты проводились на годовалых кроликах породы 'Белый великан' весом 3,5—4,5 кг, которые облучались гамма-лучами в дозах 600, 900 и 1200 *p* при мощности 31,8 *p/мин* на гамма-терапевтическом аппарате «Луч-1» (<sup>60</sup>Co). Флуоресценция плазмы исследовалась за 3 и 1 сутки до и через 4 ч, 1, 4, 8, 10, 18, 22, 26 и 30 суток после облучения.

Кровь брали из ушной вены. Антикоагулянтom служил гепарин, который, по нашим наблюдениям, существенного влияния на флуоресценцию плазмы не оказывал. Для получения плазмы гепаринизированную кровь центрифугировали при 2000 *g* в течение 10 *мин*. Процент белка в плазме определяли рефрактометром РПЛ-3.

Плазму крови разводили дистиллированной водой (1:10) и флуоресценцию определяли при  $22 \pm 2$  °C. Пробы помещали в стеклянные пробирки. Флуоресценцию возбуждали длинноволновым ультрафиолетовым светом от ртутно-кварцевой лампы СВД-120А и осветителя ОИ-18. Первичный светофильтр УФС-3 выделил полосу с максимумом при 365 *нм*. Свет флуоресценции, испускаемый в перпендикулярном направлении к возбуждающему, отделялся от последнего вторичным светофильтром ЖС-3, разлагался в спектр спектрографом ИСП-51. Спектр флуоресценции регистрировали фотоэлектрической приставкой ФЭП-1 и самопишущим потенциометром ПС1-02. После установления на спектрограф дополнительного мотора время записи полного спектра сократилось до 15 *мин*.

Результаты опытов подвергали статистической обработке методом двухфакторного дисперсионного анализа.

### Результаты и обсуждение

**Влияние физико-химических факторов.** При возбуждении длинноволновым ультрафиолетовым светом ( $\lambda = 365$  *нм*) в разведенной плазме крови появляется слабая флуоресценция в области видимого (голубого) света ( $\lambda = 400$ —600 *нм*). Максимум спектра находится при  $\lambda = 465$  *нм* (рис. 1). Чтобы определить, вызвана ли голубая флуоресценция бел-

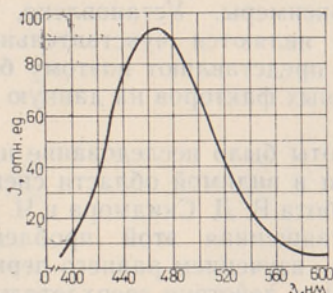


Рис. 1. Спектр флуоресценции плазмы крови при возбуждении длинноволновым ультрафиолетом ( $\lambda = 360$  *нм*).

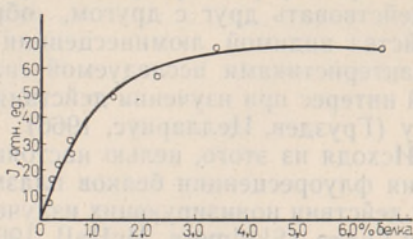


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации белка в растворе плазмы.

ками, мы исследовали зависимость интенсивности флуоресценции от содержания белка в плазме. В области малых концентраций (до 0,8%) интенсивность флуоресценции увеличивается пропорционально концентрации белка, а при дальнейшем увеличении концентрации белка рост

интенсивности флуоресценции замедляется и приближается к определенному предельному значению (рис. 2).

Эти данные показывают, что при изучении изменений флуоресценции плазмы крови необходимо строго учитывать содержание в ней белка. В связи с этим в основной серии наших опытов мы корригировали непосредственно измеренные интенсивности флуоресценции делением ее на концентрацию белка в исследуемой плазме.

Установленная нами зависимость интенсивности флуоресценции растворов плазмы крови от ее рН показана на рис. 3. Максимальная интенсивность наблюдается при рН 8, при котором и проводились последующие измерения.

Исследование зависимости интенсивности флуоресценции от температуры показало, что с повышением температуры она уменьшается. Наблюдаемое температурное тушение объясняется увеличением вероятности безызлучательной дезактивации при увеличении колебательной энергии люминофоров, а также уменьшением вязкости растворителя, что приводит к увеличению тушения разными примесями (Киянская, 1965):

**Влияние гамма-облучения.** Для выяснения возможного непосредственного действия гамма-облучения на люминесцентные свойства белков,

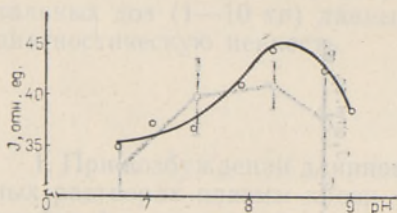


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции разведенной 1:10 плазмы от рН.

плазму крови облучали *in vitro* дозами 1, 10, 100, 1000 кр. Дисперсионный анализ полученных результатов показал, что облучение *in vitro* существенного влияния на флуоресценцию не оказывает. Этим флуоресценция белков в видимой области отличается от ультрафиолетовой, которая, по данным М. С. Бутурлакина и В. П. Шмелева (1969), уменьшается на 35,3% при облучении рентгеновыми лучами в дозе 9,2 кр.

Изучение люминесцентных свойств плазмы крови необлученных и облученных кроликов показало, что форма кривой спектра флуоресценции после облучения не изменяется, но зато возникают значительные колебания интенсивности, измеренной при длине волны максимума спектра ( $\lambda = 465$  нм). Корригированные по проценту белка данные об интенсивности флуоресценции плазмы в различные сроки до и после облучения организма приведены на рис. 4б, а кривые изменения содержания белков в плазме — на рис. 4а. Эти данные показывают, что непосредственно после облучения интенсивность флуоресценции уменьша-

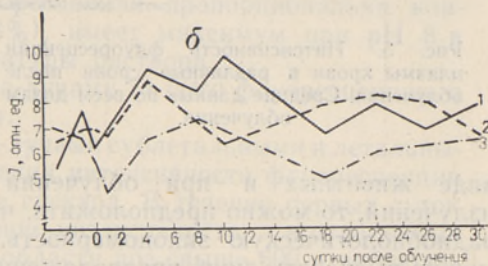
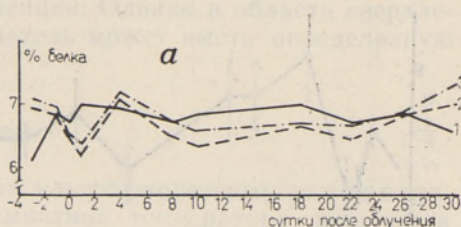


Рис. 4. а — Изменение во времени процентного содержания белка в плазме крови облученных кроликов. Средние данные. б — Интенсивность флуоресценции плазмы крови, отнесенная к проценту белка, в различные сроки после облучения. 1 — 600 р, 2 — 900 р, 3 — 1200 р.

ется. Особенно сильно это наблюдается у кроликов, облученных дозой 1200 р. Через сутки интенсивность флуоресценции продолжает несколько падать при дозе 900 р и более сильно при 1200 р. При дозе 600 р через сутки наблюдается некоторое увеличение интенсивности флуоресценции. На четвертые сутки после облучения отмечается значительное повышение флуоресценции плазмы при всех дозах облучения, и этот уровень сохраняется до 10-х суток. После этого интенсивность флуоресценции плазмы крови кроликов, облученных дозами 600 и 900 р, приближается к норме, а у кроликов, облученных дозой 1200 р, — находится ниже нормы и достигает ее только к 30-м суткам.

Таким образом, в общей картине динамики интенсивности флуоресценции плазмы крови облученных кроликов можно выделить три фазы: уменьшение в течение первых суток, увеличение на 4—10-е сутки и нормализация у выживающих животных после 10-х суток. Отчетливо эти фазы видны на рис. 5, где отмечены усредненные данные по всем дозам облучения. Таким образом, наши данные подтверждают вывод В. Д. Скидмора и Ч. Дж. Мак-Галла (Skidmore, McHall, 1969) о понижении интенсивности видимой флуоресценции в течение первых суток после облучения. Поскольку такой результат был получен на другом

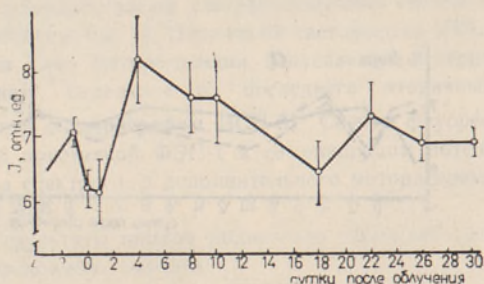


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции плазмы крови в различные сроки после облучения. Средние данные по всем дозам облучения.

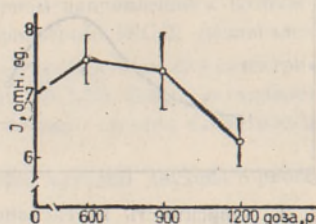


Рис. 6. Зависимость средней интенсивности флуоресценции плазмы крови кроликов от дозы облучения.

виде животных и при облучении другим видом ионизирующих излучений, то можно предположить, что результаты представляют общерадиобиологическую закономерность. О причинах данного явления можно высказать лишь предположения. Ясно лишь одно, что оно вызвано не прямым, а опосредованным действием облучения на организм через нейро-эндокринные и гуморальные механизмы или действие радиотоксинов, освобождающихся из облученных тканей и клеток. Очевидно, уменьшение интенсивности видимой флуоресценции плазмы крови в ранние сроки после облучения не имеет ничего общего с увеличением ультрафиолетовой люминесценции, которая, по-видимому, обуславливается увеличением содержания ароматических аминокислот в плазме крови (Хан-Магометова и др., 1960; Чевлытко и Резников, 1969; Skidmore, McHall, 1969).

Возможно, что при облучении организма в крови изменяется содержание веществ, действующих как тушители или связывающие их, а также не исключена возможность, что происходит видоизменение структуры макромолекул белков, которое обнаруживается в изменении их флуоресцентных свойств. Свой вклад в изменение флуоресцентных свойств плазмы крови может вносить также хорошо известное изменение соотношения белковых фракций плазмы после общего облучения организма

(Кузин, 1962). В нашей работе впервые установлено увеличение видимой флуоресценции плазмы крови в отдаленные сроки после облучения (на 4—10-е сутки у кроликов) сублетальными и летальными дозами.

Статистический анализ показал, что достоверными являются как первоначальное уменьшение интенсивности, так и ее увеличение в отдаленные сроки после облучения животных ( $P < 0,001$ ). Статистически достоверным оказалось и влияние дозы облучения ( $P < 0,001$ ) на исследуемый показатель, которое выражается в уменьшении средней интенсивности флуоресценции при увеличении дозы облучения (рис. 6). Однако статистически значимое ( $P < 0,01$ ) взаимодействие таких факторов, как доза и время после облучения доказывает, что влияние дозы на интенсивность в разные сроки после облучения имеет различный характер. Это проявляется, например, в том, что при дозе 600  $\rho$  фаза уменьшения флуоресценции короче и переходит в фазу увеличения уже через сутки после облучения. Это обстоятельство вносит ограничение в попытки использовать раннее уменьшение видимой флуоресценции плазмы крови в качестве диагностического критерия при лучевых поражениях или в качестве биологического дозиметра, по меньшей мере в области сублетальных доз, тем более, что малые дозы вызывают не уменьшение, а увеличение интенсивности флуоресценции. Однако в области сверхлетальных доз (1—10  $\kappa\rho$ ) данный показатель может иметь определенную диагностическую ценность.

### Выводы

1. При возбуждении длинноволновым ультрафиолетовым светом в водных растворах плазмы крови при комнатной температуре появляется слабая флуоресценция в видимой области спектра с максимумом при  $\lambda = 465$  нм. Интенсивность этой флуоресценции пропорциональна концентрации белков в плазме (до 0,8%), имеет максимум при pH 8 и уменьшается при увеличении температуры раствора.

2. Облучение плазмы крови гамма-лучами *in vitro* флуоресценцию в видимой области спектра не изменяет.

3. При облучении кроликов гамма-лучами сублетальными и летальными дозами происходит фазные изменения интенсивности флуоресценции плазмы крови при неизменной форме спектра. В течение первых суток после облучения происходит уменьшение интенсивности, а в отдаленные сроки, на 4—10 сутки, увеличение. В области доз свыше 600  $\rho$  наблюдается уменьшение интенсивности видимой флуоресценции пропорционально дозе облучения.

### ЛИТЕРАТУРА

- Баренбойм Г. М., Доманский А. И., Туроверов К. К., 1966. Люминесценция биополимеров и клеток. М.—Л.
- Бутурлакин М. С., Шмелев В. П., 1969. Люминесценция водных растворов сывороточного альбумина при раздельном и совместном воздействии ультрафиолетовых и рентгеновых лучей. Радиобиология 9 (6) : 914—915.
- Владимиров Ю. А., 1965. Фотохимия и люминесценция белков. М.
- Груздев А. Д., Целлариус Ю. Г., 1966. Влияние предварительного коротковолнового ультрафиолетового облучения на люминесценцию некоторых биологических объектов, возбуждаемую длинноволновым ультрафиолетом. Биофизика 11 (1) : 181—183.
- Киянская Л. А., 1965. К вопросу о кинетике тушения люминесценции органических веществ в растворах. Изв. АН СССР. Сер. физ. 29 (8) : 1357—1361.
- Кузин А. М., 1962. Радиационная биохимия. М.

- Хан-Магомедова Ш. Д., Гуткина А. В., Мейсель М. Н., Агроскин Л. С., Королёв Н. В., 1960. Ультрафиолетовая люминесценция некоторых органов животных и ее изменения при облучении. *Биофизика* 5 (4) : 446—449.
- Чевлытко А. А., Резников И. В., 1969. Применение люминесцентного метода для изучения сыворотки крови животных, подвергнутых общему рентгеновскому облучению в дозе 600 р. В кн.: *Вопросы радиобиологии*. Минск : 150—153.
- Юденфренд С., 1965. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М.
- Lehrer S. S., Fasman G. D., 1964. Fluorescence studies on poly- $\alpha$ -amino acids. II. Conformation dependent excimer emission band in poly-L-thyrodine and poly-L-tryptophane. *Biopolymers* 2 (2) : 199—203.
- Lehrer S. S., Fasman G. D., 1965. Excimer fluorescence in liquid phenol, p-ethylphenol, and anisole. *J. Am. Chem. Soc.* 87 (21) : 4687—4691.
- Skidmore W. D., McHall C. G., 1969. Fluorescence of serum and urine from rats exposed to mixed gamma-neutron radiations. *Radiation Res.* 38 : 357—364.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
4/VII 1972

NATALIA LEVINA, ULO VAHER

### GAMMAKIIRITUSE MÕJU KÜÜLIKUTE VEREPLASMA FLUORESTSENTSILE NÄHTAVAS PIIRKONNAS

Resümees

Uuriti küülikute vereplasma fluorestsentsi muutusi gammakiirituse mõjul ning selle sõltuvust valgus kontsentratsioonist, pH-st ja temperatuurist. Sedastati, et kiiritus *in vitro* ei mõjosta vereplasma fluorestsentsi. Küülikute kiiritamisel doosidega 600—1200 r tekkivad nende vereplasma fluorestsentsi intensiivsuses faasilised muutused, mis seisnevad fluorestsentsi intensiivsuse nõrgenemises 24 tundi pärast kiiritamist ja tugevnemises 4—10 päeva peale kiiritamist. Arutatakse võimalust kasutada kirjeldatud nähtust testina radiatsioonikahjustuste diagnoosimisel.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saabunud  
4. VII 1972

NATALIA LEVINA, ULO VAHER

### THE EFFECT OF GAMMA-IRRADIATION ON THE VISIBLE FLUORESCENCE OF BLOOD PLASMA OF RABBITS

Summary

The effect of gamma-irradiation ( $^{60}\text{Co}$ ) on fluorescence intensity of blood plasma of rabbits was studied in the visible range of spectrum. The plasma samples were diluted 10-fold with distilled water. Excitation wavelength was 365 nm. Emission spectra were recorded at room temperature, utilizing spectrograph ИСП-51 with photometric unit ФЭП-1 and recorder ЭПС-157. The emission spectrum was at maximum at 465 nm. The fluorescence intensity was directly proportional to the protein content up to 0.8 per cent, and was at maximum at pH 8, decreasing with an increase of the temperature.

The irradiation of blood plasma *in vitro* with gamma-rays in the dose range from 1 to  $10^3$  kR did not change the fluorescence intensity.

After the whole-body exposure of rabbits to gamma-ray doses in the dose range from 600 to 1200 R, statistically significant changes were observed in the fluorescence intensity of the blood plasma. These changes could not be referred to the changes in the plasma protein content. At 24 h after irradiation, a decrease in the plasma fluorescence intensity was stated, followed by an increase in 4—10 days after the exposure. The average fluorescence intensity of the blood plasma decreased proportionally to the dose in the dose range above 600 R.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Institute of Experimental Biology

Received  
July 4, 1972