

Тоомас КЕЭП

ОБ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВАХ НЕКОТОРЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ПРИ ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ

Флуоресцентные зонды нашли широкое применение в мембранологии (Radda, Vanderkooi, 1972; Добрецов, 1975; Badley, 1976) после достигнутого благодаря их использованию успеха в исследованиях биоэнергетики мембран митохондрий (Azzi, 1969; Chanse, 1970). Достоинство этого метода состоит в том, что разные типы флуоресцентных зондов связываются с различными областями мембран, и по изменениям параметров флуоресценции зондов можно судить о характере и масштабе изменений в структуре тех или иных областей мембран. Хотя в качестве таких индикаторов используют флуоресцентные зонды в сравнительно низких концентрациях, обычно порядка 10^{-5} — 10^{-6} М, не исключено их собственное влияние на исследуемые свойства объекта или на протекающие в нем процессы. В этом направлении в настоящее время опубликовано несколько работ. Показано, что один из наиболее широко применяемых флуоресцентных зондов — 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС) — подавляет активность Na, K-АТФазы и транспорт анионов в мембранах эритроцитов, а также митохондриальное дыхание (Fortes, Ellory, 1975; Kinnaly, Tedeschi, 1978; Dissing и др., 1979). Следует добавить, что во всех случаях влияние АНС на исследуемый процесс обнаруживалось в концентрациях его 10^{-3} — 10^{-4} М. Изменения функций мембран наблюдаются и при связывании с ними зондов других типов. Так, например, как АНС, так и его структурный аналог N-фенил-1-нафтиламин ингибируют микросомальное гидроксилрование (Lang и др., 1979). Однако отсутствуют сведения о действии флуоресцентных зондов на процессы, протекающие в липидной фазе мембран, в частности на реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ).

В настоящем сообщении приводятся результаты исследования антиокислительных свойств АНС, локализирующегося в околоповерхностных слоях мембран, и липорастворимого N-фенил-2-нафтиламина (ФНА), а также о применении их для выявления изменений свойств различных областей мембран в ходе реакций ПОЛ.

Методика

Эритроциты выделяли из венозной крови кроликов центрифугированием при 3000 g и промывали трижды изотоническим фосфатным буфером. Тени эритроцитов выделяли по методу Доджа (Dodge и др., 1963) в модификации Таверна (Taverna, Langdon, 1973), замыкали в изотоническом буфере (рН 7,4) в течение 5 мин при 37 °С и после их

осаждения при 20 000 *g* суспендировали в той же среде. Суспензии теней эритроцитов с содержанием белка 2 *мг/мл* разделяли на несколько порций, часть из которых использовали в качестве контроля, а часть облучали дозами 5—20 *кР* для активации ПОЛ. В серии исследования антиокислительных свойств флуоресцентных зондов тени эритроцитов облучали дозой 20 *кР* в присутствии ФНА ($5 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-7}$ *М*) или АНС ($5 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ *М*). Облучение проводили на установке «Луч-1» (^{60}Co) мощностью 290 *Р/мин* при температуре 0—4°. Пробы для анализов брали непосредственно после облучения теней эритроцитов, а также после их 30- или 60-минутной инкубации в присутствии 12 *мкМ* FeSO_4 и 0,8 *мМ* аскорбиновой кислоты при температуре 20 или 37°. Интенсивность протекания процессов ПОЛ оценивали по продуктам их разложения, дающим окрашенный комплекс с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Wilbur и др., 1949). Для этого в суспензиях теней эритроцитов осаждали нерастворимые в 15%-ной трихлоруксусной кислоте компоненты, добавляли к супернатантам равные объемы 0,5%-ного водного раствора ТБК и нагревали в течение 15 *мин* при 100°. Экстинкцию измеряли при $\lambda = 532$ *нм* на спектрофотометре «Спектротом 204». Результаты выражали в наномолях малонового диальдегида (МДА) на 1 *мг* белка, учитывая, что молярная экстинкция МДА равняется $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (Владимиров, Арчаков, 1972, 242).

Об изменении свойств глубинных и околоповерхностных областей мембран при ПОЛ судили по интенсивности флуоресценции связанных с ними зондов. С этой целью одновременно при взятии проб для определения ТБК-активных продуктов часть суспензии теней эритроцитов добавляли к растворам ФНА или АНС и через 10 *мин* измеряли интенсивность их флуоресценции. При этом концентрация ФНА составляла $5 \cdot 10^{-6}$ *М* и концентрация АНС — $5 \cdot 10^{-5}$ *М*; содержание белка в пробе 0,05 *мг/мл*. Во второй серии опытов флуоресцентные зонды добавляли к суспензиям теней эритроцитов дважды, преследуя при этом две цели. Во-первых, для выявления антиокислительных свойств зондов ФНА или АНС добавляли к суспензиям перед облучением. Во-вторых, для тестирования изменений липидной фазы мембран при ПОЛ определенные порции суспензий, инкубированные пострадиационно в присутствии Fe^{2+} в течение 30 *мин*, добавляли к раствору ФНА. Флуоресцентные зонды, добавленные к суспензиям до облучения, не оказывали существенного влияния на результаты исследования липидной фазы мембран с помощью ФНА, поскольку суспензии теней эритроцитов разбавлялись раствором ФНА в 40 раз. Флуоресценцию определяли на флуорометре «Анализ-1» с применением в качестве вторичных светофильтров интерференционные с максимумами пропускания при 413 или 438 *нм* для ФНА и 480 *нм* для АНС с возбуждением при 366 *нм*. Белок определяли по биуретовой реакции (Gonnall и др., 1949). Результаты являются средними 3—5 опытов и обработаны статистически.

Результаты и обсуждение

Непосредственно после гамма-облучения теней эритроцитов активации ПОЛ по продуктам их разложения не отмечалось (рис. 1, 1'). Пострадиационное увеличение количества ТБК-активных веществ наблюдалось лишь после инкубации суспензий в присутствии Fe^{2+} . Таким образом, в зависимости от интенсивности ПОЛ в глубинных и околоповерхностных слоях мембран происходят изменения, о масштабе которых можно судить по подавлению интенсивности флуоресценции связанных с мембранами ФНА или АНС (рис. 1, 2 и 3). При этом в глубине угле-

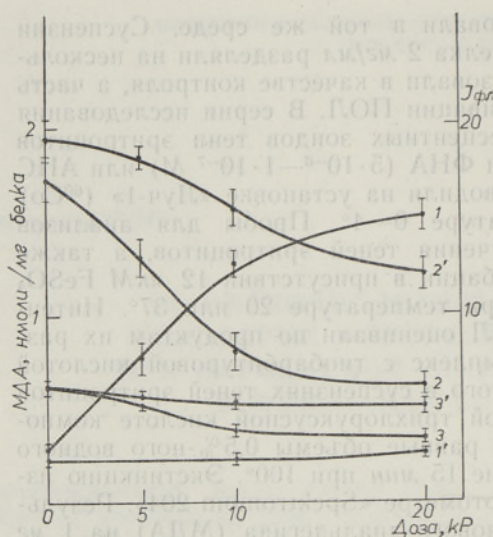


Рис. 1. Накопление ТБК-активных продуктов и изменение интенсивности флуоресценции ФНА и АНС ($I_{фл}$ в относительных ед.) в зависимости от дозы облучения теней эритроцитов. 1, 1' — накопление ТБК-активных продуктов, 2, 2' — интенсивность флуоресценции ФНА, 3, 3' — интенсивность флуоресценции АНС; 1, 2, 3 — 60 минут инкубации с $FeSO_4$ и аскорбиновой кислотой при $37^\circ C$; 1', 2', 3' — непосредственно после облучения, без добавок.

водородного слоя, где располагается ФНА, изменения более существенны, чем в околоповерхностных слоях мембран. Однако липидная фаза поражена и перед деструкцией ее жирнокислотного компонента, так как ФНА дает ответ не только после, но и до накопления ТБК-активных продуктов (рис. 1, 2'). По сходству кривых 2 и 2' на рис. 1 можно предположить, что кривая 2' также отображает изменения свойств мембран при ПОЛ. Как известно, при ПОЛ в жирнокислотных ацилах липидов протекает целый ряд реакций, в ходе которых этапу накопления ТБК-активных веществ предшествует образование гидроперекисей липидов (Владимиров, Арчаков, 1972). Кроме того, в мембранах эритроцитов названные этапы ПОЛ разделены значительным интервалом времени (Куликов, Колесникова, 1974). Учитывая вышесказанное, в основе изменений мембран, изображенных на кривой 2', должны лежать перестройки, обусловленные возникновением в липидах гидроперекисных группировок. Таким образом, метод флуоресцентных зондов в сочетании с ТБК-тестом, позволяет дифференцировать в мембранах эритроцитов различные этапы ПОЛ.

Хотя незаряженный ФНА оказался чувствительным индикатором повреждения липидной фазы мембран эритроцитов, применение его в целях наблюдения за динамикой изменений свойств мембран в ходе реакции ПОЛ ограничено, поскольку он обладает свойствами антиоксидлителя (рис. 2). Присутствие во время облучения теней эритроцитов ФНА в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М несколько подавляет, а в концентрации $1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-6}$ М полностью ингибирует образование МДА. Как видно по рис. 3 АНС в зависимости от его концентрации в суспензиях теней эритроцитов во время облучения также оказывает влияние на протекание реакции ПОЛ. Полное ингибирование образования ТБК-активных продуктов наблюдается в пределах концентрации АНС $1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-5}$ М. Отсюда следует, что оба зонда — ФНА и АНС — являются эффективными ингибиторами ПОЛ, по крайней мере на стадии разложения гидроперекисей липидов. Кроме того, судя по тестированию изменения липидного компонента мембран зондом ФНА, в мембранах эритроцитов, облученных в присутствии ФНА и АНС в концентрациях $5 \cdot 10^{-6}$ или $5 \cdot 10^{-5}$ М соответственно, свойства глубоких слоев не отличаются от таковых у необлученных (рис. 2 и 3, 2 и 2'). Это показывает, что при использовании в достаточных concentra-

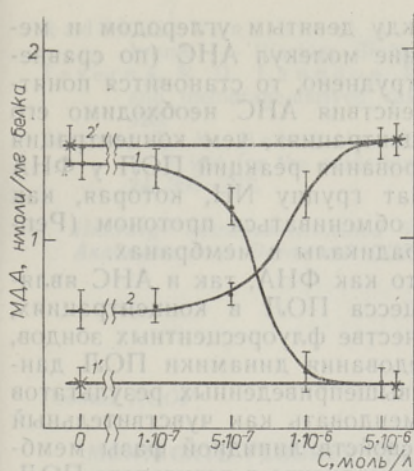


Рис. 2. Ингибирование реакции ПОЛ в зависимости от концентрации ФНА (моль/л), присутствующего в суспензиях теней эритроцитов во время их облучения. 1, 1' — ТБК-активные продукты, 2, 2' — интенсивность флуоресценции ФНА; 1, 2 — облученные дозой 20 кР тени эритроцитов, 1', 2' — необлученные тени эритроцитов.

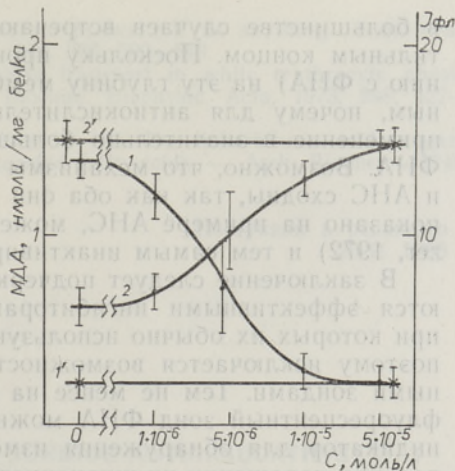


Рис. 3. Ингибирование реакции ПОЛ в зависимости от концентрации АНС (моль/л), присутствующего в суспензиях теней эритроцитов во время их облучения. Условные обозначения см. на рис. 2.

циях ФНА или АНС как антиокислителей в мембранах эритроцитов не происходит изменений, характерных для реакций ПОЛ на этапах до разложения гидроперекисей липидов (ср. на кривой 2' рис. 1 точки для контрольных и облученных дозой 20 кР теней эритроцитов). Следовательно, применяемые нами флуоресцентные зонды ингибируют и стадию образования гидроперекиси липидов. Поскольку возникновение радикалов в липидах в присутствии кислорода должно привести к образованию в жирнокислотных ацилах гидроперекисных группировок, то ФНА и АНС должны действовать как антиокислители на самых ранних этапах ПОЛ, т. е. инактивировать возникшие радикалы. Исходя из этого предположения, можно объяснить и ингибирование зондами образования ТБК-активных продуктов, учитывая, что при инкубации теней эритроцитов в течение реакций ПОЛ оказывали влияние ионы двухвалентного железа. Усиливающее действие Fe^{2+} на процесс ПОЛ состоит в том, что, разлагая продукты окисления липидов, ионы Fe^{2+} продуцируют новые радикалы, дающие начало новым цепям окисления (Владимиров, Арчаков, 1972). При инактивации радикалов (в данном случае флуоресцентными зондами) происходит обрыв цепей окисления, и зависимость от Fe^{2+} процесс затухает.

Более выраженные антиокислительные свойства ФНА по сравнению с таковыми АНС связаны, по-видимому, не с различиями в структуре их молекул, а с их различным местонахождением в мембранах. Показано, что незаряженный ФНА проникает в мембранах вглубь углеводородного слоя (Сергеев и др., 1974), а его аналог АНС благодаря наличию отрицательного заряда локализуется вблизи заряженных группировок в околоповерхностных областях мембран (Colley, Metcalfe, 1972). Кроме того, реакции ПОЛ возникают и протекают в мембранах в первую очередь в полиненасыщенных жирнокислотных ацилах в области локализации двойных связей, которые в липидах высших организмов

в большинстве случаев встречаются между девятым углеродом и метильным концом. Поскольку проникновение молекул АНС (по сравнению с ФНА) на эту глубину мембран затруднено, то становится понятным, почему для антиокислительного действия АНС необходимо его применение в значительно больших концентрациях, чем концентрация ФНА. Возможно, что механизмы ингибирования реакций ПОЛ у ФНА и АНС сходны, так как оба они содержат группу NH, которая, как показано на примере АНС, может легко обмениваться протоном (Penzer, 1972) и тем самым инактивировать радикалы в мембранах.

В заключение следует подчеркнуть, что как ФНА, так и АНС являются эффективными ингибиторами процесса ПОЛ в концентрациях, при которых их обычно используют в качестве флуоресцентных зондов, поэтому исключается возможность исследования динамики ПОЛ данными зондами. Тем не менее на основе вышеприведенных результатов флуоресцентный зонд ФНА можно рекомендовать как чувствительный индикатор для обнаружения изменений свойств липидной фазы мембран при поражении их жирнокислотного компонента в результате ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
- Добрецов Г. Е. Применение флуоресцентных зондов для исследования мембран. — В кн.: Биофизика. Итоги науки и техники. М., 1975, 4, 86—132.
- Куликов В. Ю., Колесникова Л. И. Применение комплекса физико-химических методов регистрации реакции перекисления липидов в эритроцитарных мембранах человека. — В кн.: Физико-химические основы функционирования надмолекулярных структур клетки, ч. 2. М., 1974, 5—7.
- Сергеев П. В., Владимиров Ю. А., Сейфулла Р. Д., Данилов С. М., Денисов Ю. П. Применение флуоресцентных зондов для изучения взаимодействия стероидов с биомембранами. — В кн.: Структурная лабильность мембран и ее роль в регуляции функциональной активности клеток. Минск, 1974, 78.
- Azzi, A. Redistribution of the electrical charge of the mitochondrial membrane during energy conservation. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 37, 254—260.
- Badley, R. A. Fluorescent probing of dynamic and molecular organisation of biological membranes. — *Modern fluorescence spectroscopy*. New York, 1976, 2, 91—168.
- Chance, B. Fluorescent probe environment and the structural and charge changes in energy coupling of mitochondrial membranes. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 67, 560—571.
- Colley, C. M., Metcalfe, J. C. The localisation of small molecules in lipid bilayers. — *FEBS Lett.*, 1972, 24, 241—246.
- Dissing, S., Jesaitis, A. J., Fortes, P. A. G. Fluorescence labeling of the human erythrocyte anion transport system. Subunit structure studied with energy transfer. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 553, 66—83.
- Dodge, J. T., Mitchell, C., Hanahan, D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 100, 119—130.
- Fortes, P. A. G., Ellory, J. C. Assymmetric membrane expansion and modification of active and passive cation permeability of human red cells by the fluorescent probe 1-anilino-8-naphthalene sulphonate. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 413, 65—78.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, 751—766.
- Kinnally, K. W., Tedeshi, H. Metabolic effects of some electrofluorometric dyes. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 503, 380—388.
- Lang, M., Koivusaari, U., Heitanen, E. Microsomal drug metabolism and the interaction of three fluorescent probes with microsomes at different temperatures. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 539, 195—208.
- Penzer, G. R. 1-anilino-8-naphthalene-8-sulphonate The dependence of emission spectra on molecular conformation studied by fluorescence and proton magnetic resonance. — *Europ. J. Biochem.*, 1972, 25, 218—228.

- Radda, G., Vanderkool, J. Can fluorescent probes tell us anything about membranes? — *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **265**, 509—549.
- Taverna, R. D., Langdon, R. G. Glycose transport in white erythrocyte ghosts and membrane-derived vesicles. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **298**, 422—428.
- Wilbur, K. M., Bernheim, F., Shapiro, O. W. The tiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids. — *Arch. Biochem.*, 1949, **24**, 305—313.

*Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР*

Поступила в редакцию
26/II 1980

Toomas KÕOP

МОНINGATE ФЛУОРЕСТСЕЕРУВАТЕ СОНДИДЕ АНТИОКСÜДАТИИВТЕСТ ОМАДУСТЕСТ, МИС ИЛМНЕВАД ЛИПИДИДЕ ПЕРОКСÜДАТСИОНИ ПУХУЛ ЕРÜТРОТСÜÜТИДЕ МЕМБРААНИДЕС

Artiklis on käsitletud fluorestseeruvate sondide N-fenüül-2-naftüülamiini (FNA) ja I-anilinaftaliin-8-sulfonaadi (ANS) kasutamist erütrotsüütide membraanides kulgeva lipiidide peroksüdatsiooni (LP) uurimisel ning nende toimet LP aktiivsusele. Esitatud tulemuste põhjal soovitatakse kasutada FNA-d kui tundlikku indikaatorit LP kestel tekkivate membraanikahjustuste hindamisel. Juhitakse tähelepanu FNA-l ja ANS-il ilmnenud antioksidatiivsetele omadustele. LP inhibeerub täielikult, kui FNA või ANS-i kontsentratsioon on vastavalt $5 \cdot 10^{-6}$ ja $5 \cdot 10^{-5}$ M. Seetõttu tuleb FNA ja ANS-i abil erütrotsüütide membraanides LP tõttu tekkivaid kahjustusi uurides arvestada sondide endi mõju LP protsessile.

Toomas KÕOP

ON THE ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF SOME FLUORESCENT PROBES UNDER LIPID PEROXIDATION IN ERYTHROCYTE

The employment of fluorescent probes N-phenyl-2-naphthylamine (PNA) and 1-anilino-naphthalene-8-sulphonate (ANS) at the investigation of lipid peroxidation (LP) in erythrocyte membranes and the influence of these membranes on LP activity have been considered in this report. The studies reported here suggest that PNA may be used as a sensitive indicator of membrane damage that has occurred in the course of lipid peroxidation. Attention is paid to the show of antioxidative properties of PNA and ANS. LP is inhibited wholly under the concentration of PNA of $5 \cdot 10^{-6}$ M and the concentration of ANS of $5 \cdot 10^{-5}$ M. Therefore, studying the damages of erythrocyte membranes by PNA and ANS it is necessary to take into consideration the influence of these probes on the LP themselves.