

УДК 577.336

*Тоомас КЕЭП, Ээси ВАРЬЕНД*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕНИЛ-2-НАФТИЛАМИНА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Некоторые дериваты ариламинонафталена нашли широкое применение в качестве флуоресцентных зондов при исследовании мембран (Владимиров, Добрецов, 1980). В суспензиях биологических или искусственных мембран они распределяются между водной и мембранной фазами, причем флуоресценция связанного зонда в десятки или даже в сотни раз выше по сравнению со свободным. Превращения в мембранах, влияющие на перераспределение зондов, а также на свойства микроокружения зонда в мембранах отражаются на параметрах флуоресценции. Такие превращения можно наблюдать при действии на мембранные структуры самых разнообразных физических и химических факторов.

Для изучения свойств мембран при индукции перекисного окисления липидов (ПОЛ) неоднократно использованы ариламинонафталены: 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС), фенил-2-нафтиламин (ФНА-2), 2-толуидинонафталин-6-сульфонат (Добрецов и др., 1977; Кёэп, 1981; Абдвахитова и др., 1982; Фоменко, 1984; Кудряшов, Пархоменко, 1987; Rice-Evans, Hochstein, 1981). В пораженных перекисным окислением мембранах практически всегда наблюдается подавление флуоресценции данных зондов, что, как полагают, отражает изменения физических свойств мембраны (Абдвахитова и др., 1982; Фоменко, 1984; Rice-Evans, Hochstein, 1981). Однако убедительные свидетельства о непосредственных причинах подавления испускания названных зондов при ПОЛ отсутствуют.

Перекисное окисление липидов — сложный процесс, в ходе которого в мембранах образуется множество химически активных соединений. Не исключено, что именно их действие на молекулу зонда является основным фактором тушения флуоресценции. Так, например, анализ характера зависимости тушения испускания АНС от интенсивности протекания ПОЛ позволяет заключить, что ответ АНС обусловлен накоплением в липидном бислое продуктов перекисного окисления (Добрецов, 1979 и др.). Полагается, что причиной тушения испускания АНС и ФНА-2 в облученных мембранах является действие на зонд продуктов ПОЛ (Кёэп, 1981; Кудряшов, Пархоменко, 1987). Тем не менее, до настоящего времени не имеется прямых экспериментальных доказательств, подтверждающих роль продуктов ПОЛ в подавлении флуоресценции ариламинонафталенов. Полностью отсутствуют данные о конкретных продуктах перекисного окисления, которые могли бы выступать в качестве тушителей испускания зондов этой группы.

Учитывая вышеприведенное, в настоящей работе исследовалось влияние на флуоресценцию ФНА-2 тотальных продуктов ПОЛ. Была предпринята попытка оценить чувствительность ФНА-2 относительно тех или иных химических группировок, образование которых является характерным для ПОЛ. Поскольку в экспериментах с мембранными структурами возникает возможность неоднозначной интерпретации, исследования проводили на модельных системах.

## Материал и методика

В работе был использован фенил-2-нафтиламин, трехкратно перекристаллизованный в этаноле. Органические растворители и карбонильные соединения очищали перегонкой. Линолевою кислоту (ЛК) очищали от продуктов окисления как описано ранее (Gutteridge, Quinlan, 1983). ЛК в объеме 1 мл была добавлена к 30 мл смеси этанол-вода (1:2). После перемешивания раствор трехкратно экстрагировали гексаном (гексановая фракция испарялась на ротаторном испарителе). Полученная ЛК была использована в экспериментах. Липиды экстрагировали из тимуса цыплят метанол-хлороформом (2:1) (Bligh, Dyer, 1959). Липосомы формировали инъекцией этанольного раствора липидов в физиологический раствор при 40°C с перемешиванием на магнитной мешалке в течение 30 мин (Batzri, Korn, 1973). Содержание липидов в суспензии составляло 1 мг/мл.

Окисление ЛК проводили при 60°C и свободном доступе воздуха в течение 24 ч. Перекисное окисление липосом индуцировали гамма-лучами  $Co^{60}$  дозой 200 Гр на установке «Луч-1» с последующей инкубацией липосом при 40°C в присутствии 12 мкМ  $Fe^{2+}$ .

Карбонильные продукты окисления определяли динитрофенилгидразином (Какаџ, Vejdek, 1974). К 0,5 мл этанола, содержащего 0,1 мг ЛК или 0,1 мл липосом, добавляли 0,35 мл 0,2%-ного раствора динитрофенилгидразина в 2 М HCl. После выдерживания проб, в течение 30 мин при 60°C добавляли 1,5 мл 40%-ного KOH и 2,5 мл этанола. Через 30 мин определяли экстинкцию раствора при 430 нм. В качестве стандарта был использован ацетон.

Интенсивность ПОЛ в липосомах определяли по образованию малонового диальдегида (МДА) (Fukuzawa и др., 1981). К 0,5 мл суспензии липосом добавляли 2 мл 15%-ной трихлоруксусной кислоты, 2 мл 0,5%-ной тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и нагревали 15 мин при 100°C. После охлаждения к пробам добавляли 5 мл бутанола и измеряли экстинкцию бутанольной фазы при 532 нм. Результаты выражали в наномолях МДА на 1 мг липида с учетом, что молярная экстинкция МДА равняется  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

В экспериментах с липосомами основной раствор ФНА-2 (4 мМ) в этаноле разбавляли 0,9%-ным NaCl до концентрации зонда 5 мкМ. К 4 мл водного раствора ФНА-2 добавляли 0,1 мл суспензии липосом и через 10—15 мин измеряли интенсивность флуоресценции.

При исследовании влияния на флуоресценцию зонда окисленной или неокисленной линолевой кислоты и карбонильных соединений, ФНА-2 растворяли в амиловом спирте до концентрации 100 мкМ. Для исследования влияния на ФНА-2 свободных радикалов зонд растворяли в этаноле в концентрации 20 мкМ и инкубировали в присутствии перекиси водорода с добавлением ионов  $Fe^{2+}$  или без него. Интенсивность флуоресценции измеряли на аппарате «Анализ-1» при 438 нм и спектры флуоресценций записывали на установке ИСП-51 при возбуждении испусканием линией 366 нм.

Интенсивность свободнорадикальных реакций в растворах окисленной ЛК и перекиси водорода оценивали хемилюминесцентным методом. К 4 мл метанола, содержащего 100 мкМ люминола, добавляли 0,5 мл окисленной ЛК или перекись водорода до концентрации 0,005—0,1 М. Хемилюминесценцию измеряли на установке, созданной из стандартной аппаратуры. Детектором служил ФЭУ-85, работающий в режиме счета импульсов.

## Результаты и обсуждение

ФНА-2 обладает в липосомах интенсивной флуоресценцией. При индукции в липосомальной мембране перекисного окисления наблюдается подавление испускания зонда. Типичная зависимость ответа ФНА-2 на развитие в мембранах процесса ПОЛ представлена на рис. 1, откуда хорошо видно, что подавление флуоресценции ФНА-2 происходит соответственно с накоплением малонового диальдегида, одного из конечных продуктов распада липидов.

Снижение испускания ФНА-2 при активации ПОЛ обосновано двумя основными причинами: изменением физических свойств липидного бислоя (структура, вязкость, полярность) и/или действием продуктов ПОЛ. Чтобы исключить влияние физических свойств мембраны на флуоресценцию зонда, мы исследовали воздействие ПОЛ на ФНА-2 в системе, не содержащей мембранные структуры.

В качестве модели использовался растворенный в амиловом спирте ФНА-2 с добавлением окисленной или неокисленной ЛК. Отметим, что в окисленной ЛК содержатся соединения того же типа, которые образуются в мембранах при ПОЛ. Как видно из результатов (рис. 2), окисленная ЛК вызывает сильное подавление испускания ФНА-2. Это не обусловлено кислотной группировкой ЛК, так как неокисленная ЛК, а также энантовая кислота существенно не влияют на флуоресценцию зонда. Отсюда следует, что среди продуктов окисления ненасыщенных жирных кислот имеются соединения, подавляющие флуоресценцию ФНА-2. При выяснении конкретных соединений, обуславливающих ответ ФНА-2, следует, по-видимому, учитывать возможное действие на зонд как свободных радикалов, так и гидроперекисей, спиртов, кетонов и альдегидов. Влияние свободных радикалов на ФНА-2 проверялось нами введением в этанольный раствор зонда перекиси водорода с добавлением  $Fe^{2+}$  или без него. При использовании перекиси водорода в концентрациях  $10^{-4}$ — $10^{-2}$  М не наблюдалось снижения интенсивности испускания ФНА-2. После выдерживания зонда в присутствии  $H_2O_2$  происходит даже некоторое возрастание

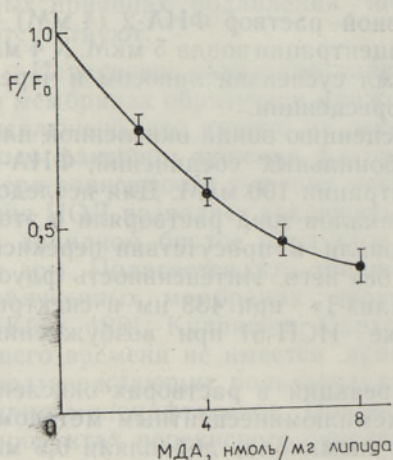


Рис. 1. Подавление флуоресценции ФНА-2 при индукции в липосомах перекисного окисления.  $F_0$  и  $F$  — интенсивность флуоресценции ФНА-2 в неокисленных и окисленных липосомах соответственно.

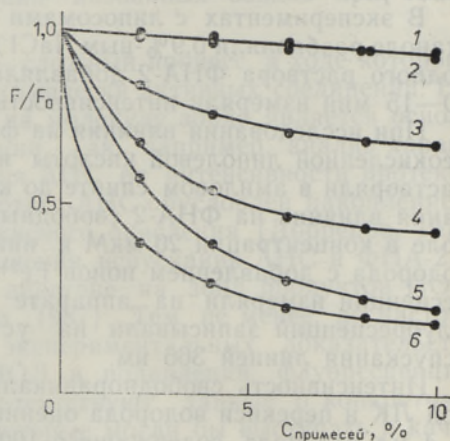


Рис. 2. Влияние неокисленной ЛК (1), энантовой кислоты (2), ацетона (3), энантового альдегида (4), окисленной ЛК (5) и ацетальдегида (6) на интенсивность флуоресценции ФНА-2.  $F_0$  и  $F$  — интенсивность флуоресценции ФНА-2 в амиловом спирте без и с присутствием примесей соответственно.

Изменение интенсивности флуоресценции ФНА-2 ( $F_0/F$ )\* при инкубации зонда в присутствии  $H_2O_2$  (М) без и с добавлением  $Fe^{2+}$

Интенсивность	Время инкубации					
	$H_2O_2$			$H_2O_2 + 6 \text{ мкм } Fe^{2+}$		
	10 мин	2 ч	24 ч	10 мин	2 ч	24 ч
0	1	1	1	1	1	1
$10^{-4}$	0,98	1,05	1,06	1,02	1,08	1,10
$10^{-3}$	0,99	1,01	1,06	1,02	1,08	1,11
$10^{-2}$	0,98	1,01	1,02	1,00	1,07	1,09
$10^{-1}$	0,88	0,89	0,87	0,90	0,95	0,97
1	0,49	0,49	0,45	0,50	0,49	0,46

\*  $F_0$  и  $F$  — интенсивность флуоресценции в отсутствии и присутствии  $H_2O_2$  соответственно.

тание флуоресценции (таблица). К существенному тушению эмиссии приводит  $H_2O_2$  в концентрации порядка 1 М. При сравнении интенсивности свободнорадикальных процессов выявилось, что 10%-ная окисленная ЛК обладает примерно той же интенсивностью стационарной хемилюминесценции, что и перекись водорода в концентрации порядка  $10^{-3}$ — $10^{-2}$  М. Как отмечалось выше,  $H_2O_2$  при такой концентрации не снижает флуоресценцию ФНА-2. Из этого вытекает, что хотя свободные радикалы подавляют флуоресценцию, их содержание в окисленной ЛК является слишком низким для выявления эффекта тушения испускания зонда. Поэтому свободные радикалы, вероятно, не играют главной роли в подавлении флуоресценции ФНА-2 препаратами окисленной ЛК. Гидроперекиси и спирты в продуктах окисленной ЛК являются полярными соединениями. Как известно ранее, полярные соединения обуславливают не только тушение, но и длинноволновый сдвиг максимума флуоресценции ариламинонафталиновых зондов (Владимиров, Добрецов, 1980). Поскольку при измерениях флуоресценции использовалась относительно полярная среда — спирт, а при добавлении препаратов окисленной ЛК тушение испускания не сопровождалось изменением положения максимума спектра, то маловероятно, что гидроперекисные или спиртовые группировки в продуктах окисленной ЛК имеют значение в изменении флуоресценции зонда. Среди конечных продуктов окисления ненасыщенных жирных кислот карбонильные соединения составляют значительную часть. Их концентрация в наших экспериментах с окисленной ЛК составляла 0,5 М. Из рис. 2 видно, что как длинно-, так и короткоцепочечные альдегиды (энантовый и ацетальдегид) обуславливают существенное тушение эмиссии ФНА-2. Несколько менее эффективным действием обладают кетоны (ацетон). При использовании карбонильных соединений в концентрациях до 10% положение максимума спектра флуоресценции ФНА-2 не изменялось. Вышеприведенное позволяет полагать, что одним из основных компонентов окисленной ЛК, обуславливающих тушение испускания зонда, являются карбонильные продукты.

При рассмотрении вопроса о причинах подавления флуоресценции ФНА-2 в липосомах, пораженных перекисным окислением, следует иметь в виду, что концентрация в липосомальной суспензии малонового диальдегида сравнительно низкая ( $10^{-9}$ — $10^{-8}$  М на 1 мг липида). МДА в такой концентрации, по-видимому, не может вызывать существенное подавление испускания ФНА-2. Согласно нашим, а также литературным данным (Nakazawa и др., 1984), общее содержание карбонильных продуктов ПОЛ в суспензиях липосом более чем в 100 раз выше по сравнению с МДА и составляет  $10^{-7}$ — $10^{-6}$  М на 1 мг липида. Это соответствова-

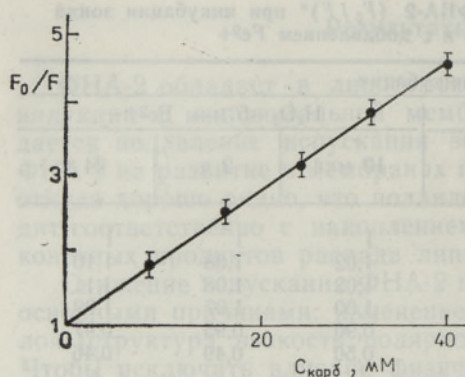


Рис. 3. Тушение флуоресценции ФНА-2 в зависимости от концентрации карбонильных продуктов окисленной ЛК в амиловом спирте.

$F_0$  и  $F$  — интенсивность флуоресценции ФНА-2 в амиловом спирте без и с добавлением окисленной ЛК соответственно.

ло бы концентрации карбонильных продуктов ПОЛ в липосомальной мембране примерно  $10^{-2}$ — $10^{-1}$  М при условии, что большая часть из них остается в мембране. Если учесть, что сильное тушение флуоресценции ФНА-2 в амиловом спирте происходит при концентрации ацетона порядка  $10^{-1}$ —1 М, ацетальдегида, энантиомерного альдегида или карбонильных продуктов окисленной ЛК порядка  $10^{-2}$ — $10^{-1}$  М, то имеется основание полагать образование карбонильных соединений, особенно альдегидов, одним из наиболее вероятных факторов снижения флуоресценции ФНА-2 в мембранных структурах при активации процесса ПОЛ (рис. 2, 3). Сходные результаты были нами получены с использованием АНС и фенил-1-нафтиламина (данные не приведены). Можно полагать, что тушение флуоресценции под действием альдегидов является общим свойством ариламинонафталиновых зондов.

Было предложено использовать АНС для определения в мембранах продуктов ПОЛ для быстрого контроля за ходом этого процесса (Добрецов и др., 1977; Добрецов, 1979). Однако не было исследовано, какие продукты ПОЛ обуславливают ответ АНС. Вышеприведенное позволяет ФНА-2 рекомендовать для определения содержания карбонильных продуктов окисления в препаратах жирных кислот (рис. 3). Поскольку ФНА-2 проникает в липидную фазу мембран, в регион образования продуктов перекисного окисления, его можно использовать в качестве чувствительного индикатора для установления активации в мембранах или в клетках процесса ПОЛ, избегая какие-либо процедуры экстракции. По чувствительности применение ФНА-2 в определении ПОЛ не уступает использованию ТБК-теста.

## ЛИТЕРАТУРА

- Абдвахитова А. К., Пархоменко И. М., Соколова Т. Н. Исследование изменений клеточных мембран фибробластов китайского хомячка при лазерном и рентгеновском облучениях с помощью флуоресцентного зонда // Радиобиология, 1982, 22, № 2, 155—159.
- Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследованиях биологических мембран. М., 1980.
- Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды: оптические свойства и взаимодействие с мембранами // Итоги науки и техники. Биофизика. М., 1979, II, 101—188.
- Добрецов Г. Е., Петров В. А., Борщевская Т. А., Деев А. И., Владимиров Ю. А. Влияние перекисного окисления липидов на физическую структуру фосфолипидных мембран // Вопр. мед. химии, 1977, 23, № 6, 818—821.
- Кудряшов Ю. Б., Пархоменко И. М. Молекулярно-клеточные механизмы биологического действия малых доз рентгеновского излучения на изолированные клетки млекопитающих // Радиобиология, 1987, 27, № 3, 297—302.
- Кёзн Т. В. Влияние гамма-облучения на перекисное окисление липидов и структуру мембран изолированных ядер тимоцитов и эритроцитов // Изв. АН ЭССР. Биол., 1981, 30, № 4, 267—276.

- Фоменко Б. С. Структурные окисления липидов, обнаруживаемые с помощью 2,6-ТНС и флуорескамина // Радиобиология, 1984, 24, № 1, 21—24.
- Batzri, S., Korn, E. Single bilayer liposomes prepared without sonication // Biochim. Biophys. Acta, 1973, 298, N 4, 1015—1019.
- Bligh, E. C., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, N 8, 911—918.
- Fukuzawa, K., Chida, H., Tokumura, A., Tsukatani, A. Antioxidative effect of  $\alpha$ -tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbate- $\text{Fe}^{2+}$  induced lipid peroxidation // Arch. Biochem. and Biophys., 1981, 206, N 1, 173—180.
- Gutteridge, J. M., Quinlan, G. J. Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test // J. Applied Biochem., 1983, 5, N 4—5, 293—299.
- Kakač, B., Vejdeck, Z. J. Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen. B. 1. Weicheim, 1974, 217—221.
- Nakazawa, T., Teryama, K., Okukaki, H., Ykawa, O. Localization of lipid peroxidation products in liposomes after  $\gamma$ -irradiation // Biochim. Biophys. Acta, 1984, 796, N 2, 323—329.
- Rice-Evans, C., Hochstein, P. Alterations in erythrocyte membrane fluidity by phenylhydrazine-induced peroxidation of lipids // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, 100, N 4, 1537—1542.

Институт экспериментальной биологии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
10/XII 1987

После переработки  
15/III 1988

Toomas KÕOP, Eesi VARJEND

#### FENÜÜL-2-NAFTÜÜLAMIINI KASUTAMINE LIPIIDIDE PEROKSÜDATSIOONIL MOODUSTUVATE KARBONÜÜLSETE PRODUKTIDE MÄÄRAMISEKS MEMBRAANIDES

On näidatud, et liposomaalsetes membraanides toimub lipiidide peroksüdatsiooni (LP) tagajärjel fenüül-2-naftüülamiini (FNA-2) emissiooni nõrgenemine. Analooilise fluorestsentsi muutuse põhjustavad lahusesse viidud oksüdeeritud linoolhappe preparaadid (OLH) või karbonüülised ühendid. Viimaste hulgast kõige efektiivsemad on aldehüüdid. FNA-2 fluorestsentsi sumbumine muutub märgatavaks alates karbonüülsete ühendite kontsentratsioonist 0,01 M nii membraanides LP korral kui ka lahusesse viidud OLH või aldehüüdide puhul. Esitatud tulemuste põhjal järeldatakse, et membraanides on LP tõttu toimuva fluorestsentsi nõrgenemise peapõhjustajaks lipiidide lagunemisel tekkivad karbonüülised ühendid, põhiliselt aldehüüdid. Autorid soovivad kasutada FNA-2 kui tundlikku indikaatorit LP karbonüülsete produktide määramiseks membraanides.

Toomas KÕOP, Eesi VARJEND

#### THE USE OF PHENYL-2-NAPHTHYLAMINE IN MEMBRANES FOR DETERMINATION OF CARBOXYLIC PRODUCTS FORMATION BY LIPID PEROXIDATION

The influence of the aldehydes, ketones, free radicals, oxidized and not-oxidized linolic acid (LA) and lipid peroxidation (LP) in liposomes on the phenyl-2-naphtylamine (PNA) fluorescence was investigated. The effective quenchers of the fluorescence among the compounds used were the aldehydes and oxidized LA. Similar changes in the PNA fluorescence were observed when LP in the liposomes was activated.

The PNA may be recommended as a sensitive indicator for the determination of carboxylic products formation by LP in the membranes.