

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГАНГЛИОЗИДОВ НА СТРУКТУРНУЮ ЛАБИЛЬНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ БИОМЕМБРАН МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Э. Е. МХЕЯН, Э. С. СЕКОЯН, С. А. БАДЖИНЯН,
 О. П. СОЦКН, С. Э. АКОПОВ

Установлено, что ганглиозиды повышают интенсивность флуоресценции 1-антлин-
 нафталин-8-сульфоната (АНС⁻), связанного с сывороточным альбумином человека,
 между тем как квантовый выход флуоресценции триптофанилов белка они уменьшают.
 Указанные эффекты возрастают с увеличением концентрации ганглиозидов и удлинени-
 ем времени их контакта с сывороточным альбумином человека. Путем конформаци-
 онных изменений ганглиозиды вызывают сокращение расстояния между тирозином и
 триптофаном, а также между триптофаном и поверхностно расположенными зондами,
 что свидетельствует о приближении триптофана к поверхности белковой глобулы.
 Кроме того, они способствуют росту квантового выхода флуоресценции АНС⁻, свя-
 занного с липосомами.

Изучение мембранных механизмов, обеспечивающих проявление био-
 логической активности ганглиозидов, в том числе обнаруженного впер-
 вые нами их вазоконстрикторного действия [1], позволило установить,
 что нейрональные ганглиозиды обнаруживают способность вызывать
 конформационные изменения микросомальных мембран. Одновременно
 нами была выявлена возможность внедрения гидрофобной части молеку-
 лы ганглиозидов вглубь мембраны при их длительном контакте с мик-
 росомами мозга и печени и выдвинуто предположение о роли медленных
 конформационных изменений в белках [2].

В настоящем исследовании ставилась задача дальнейшего изучения
 механизмов действия ганглиозидов на мембранные структуры путем
 флуоресцентного анализа, влияния их на сывороточный альбумин чело-
 века (САЧ) и липосомы из яичного лецитина. Целесообразность про-
 ведения подобных исследований обусловлена тем, что, как свидетель-
 ствуют данные литературы, САЧ и липосомы могут служить моделями
 белковой и липидной фаз биологических мембран [3].

Материал и методика. Использовали сывороточный альбумин человека фирмы
 «Reanal» и липосомы, полученные из яичного лецитина по методу Паладиано-Алоса и
 Миллера [4]. Опыты проведены с помощью отрицательно заряженного зонда 1-ант-
 линнафталин-8-сульфоната (АНС⁻) и регистрации собственной флуоресценции трип-
 тофанилов белка. Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуорометре MPF-2A
 фирмы «Hitachi» (Япония), с автоматической коррекцией на чувствительность; спек-
 тры поглощения—на спектрофотометре USP-2. В тех случаях, когда оптическая

плотность превышала 0,1, учитывался эффект внутреннего фильтра [5]. Квантовый выход флуоресценции измерялся относительным методом [6]. Эффективность переноса энергии в случае миграции с тирозина на триптофан рассчитывалась по формуле

$$\gamma = \frac{q_{\text{ТФ}}^{\text{ТФ}} - q_0^{\text{ТФ}} q_{\text{ТФ}}^{\text{ТФ}}}{q_{\text{ТФ}}^{\text{ТФ}} - q_{\text{ТФ}}^{\text{ТФ}}} \quad [7], \text{ в остальных случаях — по формуле } \gamma = \frac{q_{\text{ТФ}} - q_0}{q_0} \quad [8] \text{ Ганглиозиды выделяли из серого вещества головного мозга людей, погибших от несчастных случаев, по методу Богоча в нашей модификации [9]:}$$

гликозиды выделяли из серого вещества головного мозга людей, погибших от несчастных случаев, по методу Богоча в нашей модификации [9]:

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные о влиянии ганглиозидов на флуоресценцию АНС-, связанного с САЧ, в условиях различной продолжительности контакта ганглиозидов с белком (рис. 1).

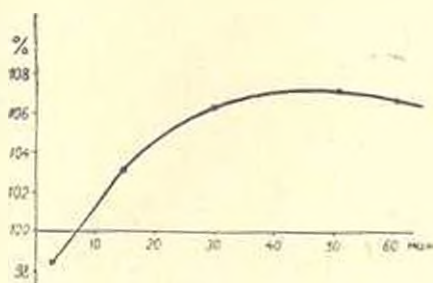


Рис. 1.

Рис. 1 Влияние ганглиозидов ($2 \cdot 10^{-4}$ ммоль) на интенсивность флуоресценции АНС-, связанного с САЧ, в зависимости от времени инкубации их с белком.

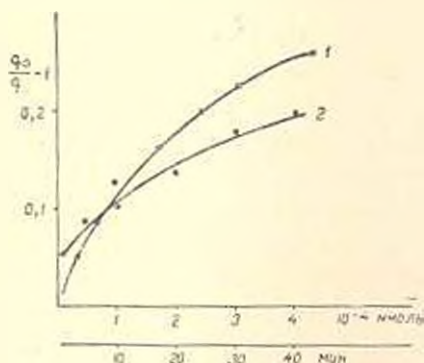


Рис. 2.

Рис. 2 Тушение ганглиозидами флуоресценции триптофанов САЧ в зависимости от концентрации (1) и времени их контакта с белком (2).

Как следует из графика, ганглиозиды в начальный момент контакта с белком вызывают некоторое тушение флуоресценции зонда, затем этот эффект сменяется усилением флуоресценции, которая достигает максимума к 30-й мин инкубации ганглиозидов с белком. Через 24 час. после преникубации отмечается еще больший рост интенсивности флуоресценции зонда. Потенцирующий эффект после 30-й мин инкубации белка с ганглиозидами растет с увеличением концентрации последних в среде. При этом имеет место взаимодействие двух противоположных эффектов: увеличение константы связи и уменьшение количества центров связывания. Равнодействующая этих двух сил регистрируется нами в виде увеличения интенсивности флуоресценции зонда, чем и можно объяснить ее относительно малый рост. По-видимому, в начальный момент контакта ганглиозидов с белком превалирует эффект изменения заряда белка, затем, в результате медленных конформационных изменений, происходит изменение константы связи с ростом квантового выхода флуоресценции белка и тушающий эффект сменяется противополо-

ложным. Измерение квантового выхода белка относительно триптофана подтверждает подобное предположение, при этом указанный показатель при концентрации ганглиозида 10^{-4} ммоль возрастает на 8, $2 \cdot 10^{-1}$ — на 10 и $4 \cdot 10^{-4}$ ммоль — на 13%.

Нами изучалось также влияние ганглиозидов на флуоресценцию триптофанилов белка. Как следует из рис. 2 (кр. 1), под воздействием ганглиозидов происходит выраженное падение квантового выхода флуоресценции триптофанилов, причем тушащий эффект возрастает с ростом их концентрации в среде (рис. 2). Обращает на себя внимание, что указанная зависимость, выраженная в Штерн-Фольмеровских координатах, представлена не прямой, а изогнутой линией, что свидетельствует либо о наличии двух или более видов центров связывания, либо о кооперативности связывания ганглиозидов с белком. Тушащий эффект ганглиозидов усиливается по мере увеличения времени их контакта с белком (рис. 2, кр. 2), что подтверждает предположение о медленных конформационных изменениях в САЧ.

В последующих опытах изучалось изменение эффективности миграции энергии с тирозина на триптофан белка, а также с триптофана белка на зонды АНС- и акридиновый оранжевый (AO^+). Согласно данным таблицы, ганглиозиды ($2 \cdot 10^{-4}$ ммоль) вызывают понижение эффективности миграции энергии с тирозина на триптофан, одновременно наблюдается аналогичный эффект в отношении переноса энергии с триптофана на АНС- и AO^+ (табл.). Эти данные указывают на уменьше-

Таблица

Изменение эффективности миграции энергии под воздействием ганглиозидов (п. 6)

Донор	Акцептор	Контроль	Ганглиозиды, $2 \cdot 10^{-4}$ ммоль	Ганглиозиды, $4 \cdot 10^{-4}$ ммоль
Триптофан	АНС-	$0,31 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,03$
Триптофан	AO^+	$0,18 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,01$
Тирозин	триптофан	$0,21 \pm 0,018$	$0,26 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,02$

ние расстояния между указанными элементами. Поскольку использованные нами заряженные зонды в отличие от нейтральных не проникают в гидрофобные карманы белковой глобулы, а находятся близко к поверхности [10], полученные результаты можно интерпретировать как выход единственного триптофанила белка на поверхность белковой глобулы. Об этом свидетельствует и длинноволновый сдвиг максимума флуоресценции, говорящий о повышении полярности окружения триптофанила [11], что связано, по-видимому, с увеличением доступа полярного растворителя — воды — к триптофанилу белка.

Интересные данные получены в экспериментах с изучением влияния ганглиозидов на флуоресценцию АНС-, связанного с липосомами из яичного лецитина. Как следует из рис. 3, под воздействием ганглиозидов происходит значительное увеличение квантового выхода флуоресценции

зонда (рис. 3). Для изучения характера связывания АНС- с липосомами были построены графики Скэтчарда [12]. Концентрацию связанного и свободного зонда рассчитывали по Добренову [13]. Как следует из рис. 4, график Скэтчарда представляет собой прямую линию, что свидетельствует о наличии всего одного вида центров связывания зонда с липосомами. Константа связи АНС- с липосомами составляла $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$, что приблизительно равно константе связи для ТНС- [14]. Концентрация центров связывания составляла 10^{-3} моль. Под воздействием ганглиозидов концентрация центров связывания практически не изменялась, а константа связи возрастала до $7 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$.

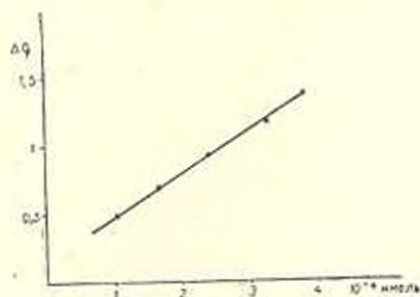


Рис. 3

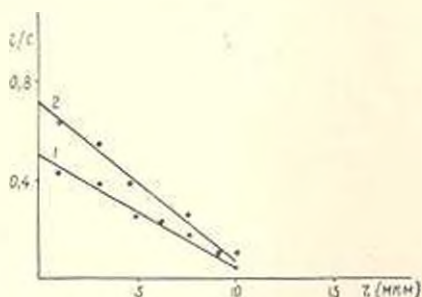


Рис. 4.

Рис. 3. Рост квантового выхода флуоресценции связанного с липосомами АНС- под действием различных концентраций ганглиозидов.

Рис. 4. Связывание АНС- с липосомами в отсутствие ганглиозидов (1) и при концентрации их $2 \cdot 10^{-4}$ моль (2) (график Скэтчарда).

Следовательно, ганглиозиды вызывают значительные конформационные изменения в липосомах. Препарация их в течение 1 час. не вызывала существенных сдвигов в характере влияния ганглиозидов на липосомы. После 24-часовой препарации при $3-4^\circ$ наблюдалось снижение активирующего действия ганглиозидов на флуоресценцию связанного с липосомами АНС- на $48,1 \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$).

Сопоставляя приведенные здесь данные с результатами, полученными нами ранее, можно заметить однозначность и сходство эффектов ганглиозидов на биологические мембраны, САС и липосомы. Во всех случаях наблюдается рост квантового выхода флуоресценции АНС- с увеличением константы связывания зонда. Наиболее выраженно этот эффект проявляется на биологических мембранах и липосомах, в меньшей степени на белке. Следовательно, ганглиозиды, по-видимому, имеют сродство и к белковым и к липидным компонентам мембран. Это в свою очередь дает основание считать, что они могут действовать на участках белково-липидных контактов, тем более что с этими участками мембран, по имеющимся литературным данным, связывается и АНС- [15].

Ереванский государственный медицинский институт,
кафедра общей и клинической химии, кафедра фармакологии

Поступило 10 V 1978 г.

**ԳԱՆԳԼԻՈՋԻՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՌԻՈՄԵՄԲՐԱՆՆԵՐԻ ԿՈՄՊՈՆԵՆՏՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՅՎԱՆՔԱՅԻՆ ԼԱՐՎՈՒԹՅԱՆ
ՎՐԱ՝ ՖԼՈՒՐԵՍԵՆՏ ԱՆԱԼԻԶԻ ՄԵԶՈՑՈՎ**

Է. Խ. ՄԽԵԼՅԱՆ, Է. Ս. ՍԵԿՈՅԱՆ, Ս. Ա. ԲԱԶԻՆՅԱՆ, Օ. Պ. ՍՈՇԿԻ, Ս. Է. ՉԱԿՈՊՈՎ

Բացահայտված է, որ գանգլիոզիդները մեծացնում են մարդկանց շիճուկային ալբումինի հետ կապված 1—անիլինանաֆթալին—8—սուլֆանատի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը, մինչդեռ գանգլիոզիդների ազդեցության ներքո սպիտակուցի ախտոֆանիլների ֆլուորեսցենցիայի բվանտային էլրը նվազում է: Էներգիայի միզրացիայի ուսումնասիրությունը ցույց է տալիս, որ գանգլիոզիդները կոնֆորմացիոն փոփոխությունների միջոցով կրծատում են թրոպինի և տրիպտոֆանի միջև էղամ տարածությունը, որը կարելի է դիտել որպես տրիպտոֆանի մոտեցում դեպի սպիտակուցային զոբոուայի մակերևուր:

Ստացված տվյալները վկայում են, որ գանգլիոզիդները նպաստում են լիպոսոմների հետ կապված գոնդի ֆլուորեսցենցիայի բվանտային էլրի մեծացմանը:

**THE INELUENCE OF GANGLIOSIDES ON THE STRUCTURAL
INSTABILITY OF BIOMEMBRANE COMPONENTS BY THE METHOD
OF FLUORESCENT ANALYSIS**

E. E. MKHETIAN, E. S. SEKON, S. A. BAZGIAN,
O. P. SOTSKII, S. E. AKOPOV

The Influence of gangliosides on the conformation of albumen and liposom has been studied. It has been indicated that gangliosides change the conformation of albumen molecules, whereas triptofan proteins transpass to the surface of the globule.

It has also been determined that gangliosides cause conformating compensation in liposoms of the egg lecithine.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мирзоян С. А., Мхелян Э. Е., Секоян Э. С., Соцкий О. П. ДАН СССР, 201, 2, 507, 1971.
2. Мирзоян С. А., Мхелян Э. Е., Секоян Э. С., Соцкий О. П., Акопов С. Э. Журн. эксперим. и клинич. мед., в печати.
3. Данилов В. С., Шенченко А. С., Ребров В. П., Орлов С. Н. Биофизика, 20, 822, 1975.
4. Parahadjopoulos D., Miller N. Biochim. Biophys. Acta, 135, 624, 1967.
5. Паркер С. Фотолюминесценция растворов, М., 1972, 210.
6. Parker C. A., Rees W. T. Analyst, 85, 857, 1960.
7. Kronman M. J., Holmes L. G. Photochem. Photobiol., 14, 113, 1971.
8. Азфигова Е. Я., Лухтштейн Г. Н. Мол. биол., Итоги науки и техники, 8, 1975.
9. Мхелян Э. Е., Шахбатьян Ш. Л. Вопросы биохимии мозга, 10, 187, 1975.
10. Добрецов Г. Е., Биофизика, Итоги науки и техники, 4, 1975.
11. Бурштейн Э. А. Докт. дисс., Пушкино, 1973.
12. Scatchard G. Ann. N. Y., Acad. Sci., 51, 660, 1949.
13. Добрецов Г. Е. Мол. биол. Итоги науки и техники, 6, 1975.
14. Huang Ching-hsien, Chertton J. Biochemistry, 11, 735, 1972.
15. Rodd G. K., Vanderkool J. Biochim. Biophys. Acta, 265, 509, 1972.