

1. Collins W. E., Jeffery G. M. J. of Parasitology, 48, 521—525, 1973.
2. Jeffery G. M. J. of Parasitology, 48, 601—606, 1962.
3. Leef J., Strome C. P., Beaudoin R. L. Bullet. in of the World Health Organization. 57, 87—91, 1979.
4. Mitchell C. et al. Glinical and experimental immunology, 28, 276—279, 1977.
5. Rowe A. W., Eyster E., Kellner A. Cryobiology, 119—128, 1968.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 9, 1982

УДК 576.3+577.3+578.088

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ В ИССЛЕДОВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ И МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАН

С. А. БАДЖИНЯН

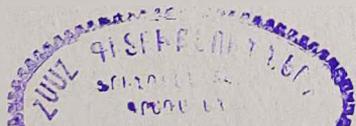
Рассматриваются литературные и собственные данные о применении флуоресцентных зондов в исследовании структурных изменений биологических и модельных мембран при воздействии на них различных биологически активных соединений. Приведены используемые при исследовании различных мембранных процессов флуоресцентные зонды, описаны их свойства и характеристика.

*Ключевые слова:* биологические мембраны, модельные мембраны, флуоресцентные зонды, липосомы.

Изучение молекулярной организации и функционирования мембран клеток и внутриклеточных структур в настоящее время является одним из ведущих направлений современной биологии.

Исследование физической структуры биологических мембран представляет некоторую сложность. Сложный состав, гетерогенность, высокое светорассеяние суспензии мембран в значительной мере затрудняют применение оптических методов и интерпретацию результатов. Кроме того, большинство физико-химических и оптических методов дает информацию о мембране в среднем, тогда как структурные изменения при ее функционировании происходят, возможно, только в отдельных активных участках. В последние годы после публикации работ Добрецова [3, 6, 13] для исследования мембран стали применяться флуоресцентные зонды (ФЗ). ФЗ связываются не со всей мембраной, а только с определенными для каждого ФЗ ее участками. Если в участке связывания происходит изменение заряда, микровязкости или информации, то зонд реагирует на них изменением флуоресценции. В сравнении с другими оптическими методами флуоресценция менее чувствительна к светорассеянию, а флуориметры более доступны для парамагнитных зондов, чем спектрометры ЭПР.

В настоящее время имеется много данных о применении десятков флуоресцентных зондов для изучения самых разнообразных модельных и изолированных мембран, а также интактных клеток.



Многие биологически важные соединения—белки, каротиноиды, хлорофилл, флавины и др.—обладают собственной флуоресценцией. Параметры флуоресценции весьма чувствительны к структуре окружения флуоресцирующего хромофора, поэтому собственная флуоресценция всех этих веществ широко используется для изучения их химических превращений, межмолекулярных взаимодействий, конформационных переходов биополимеров и т. д.

Вместе с тем в исследовании биомембран в последние годы нашли широкое применение флуоресцирующие красители, добавляемые к мембранным системам *извне*. С их помощью в настоящее время изучаются транспорт веществ (в том числе ионов) через мембраны и структурные перестройки, связанные с функционированием мембранных систем как в изолированном состоянии, так и непосредственно в клетках и тканях. При этом удается решить такие вопросы, которые другими существующими методами решить трудно или невозможно. Обычно считается, что зонды связываются с мембраной нековалентно в отличие от «флуоресцентных меток», связанных химической связью.

Таким образом, флуоресцентными зондами являются соединения, которые, во-первых, добавляются к мембранной системе *извне*, не образуя с мембраной ковалентной связи, во-вторых, флуоресцируют, причем из параметров флуоресценции можно извлечь определенную информацию о структуре и функции мембраны.

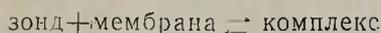
*Применяемые зонды.* В настоящее время известно около 40 различных соединений, применяющихся в качестве флуоресцентных зондов. Используемые ФЗ можно разделить на несколько групп: 1. ФЗ, несущие заряд положительный (аурамин, акридиновый оранжевый, этидий, пиронин) или отрицательный (АНС, ТНС и др.). 2. ФЗ, не имеющие заряда, но обладающие значительным дипольным моментом (ДМХ и МБА). 3. ФЗ, не имеющие заряда и значительного дипольного момента (неполярные ФЗ): перилен, метилантрацен, пирен, ретинол.

Все ФЗ имеют гидрофобный радикал, один—дипольный момент, а другие—заряженную группу. Исходя из этого, предполагается [25], что гидрофобные ФЗ внедряются в углеводородную область фосфолипидной мембраны, а амфифильные (т. е. имеющие гидрофобную и заряженную группы) локализуются на поверхности раздела мембрана-растворитель.

*Определение параметров связи зонда с мембраной.* При использовании ФЗ необходимо знать параметры их связи с мембраной. Так, если зонд имеет заряженную группу и поэтому может располагаться только на поверхности мембраны, то число мест его связывания характеризует доступную для зонда поверхность. Для гидрофобного зонда могут быть доступны также и внутренние слои мембраны. Данные такого типа использовались для построения структурных моделей мембран [3]. Энергия связи заряженного зонда с мембраной зависит от ее заряда, что можно использовать для оценки заряда. Различные ионы, влияя на заряд мембраны, тем самым изменяют константу связывания зонда, что применяется при исследовании взаимодействия ионов с мембраной. Наконец, изменение флуоресценции зонда может быть обусловлено как из-

менением структуры участка связывания, так и изменением сродства зонда к мембране [11]; для выбора одной из этих двух возможностей необходимо контролировать величины параметров связывания.

Взаимодействие зонда с мембраной можно представить как реакцию:



константа связи

$$K_c = \frac{r}{c(N-r)}, \quad (1)$$

где  $r$  и  $c$ —молярные концентрации связанного и свободного зонда соответственно,  $N$ —молярная концентрация участков связывания.

Физический смысл  $K_c$  очевиден: константа связывания тем больше, чем выше изменение свободной энергии при переходе моля зонда из воды в мембрану. Зная  $r$  и  $c$  при разных соотношениях концентраций зонд/мембрана, экспериментатор может графически определить  $K_c$  и  $N$ , строя график зависимости  $r/c$  от  $r$  (метод Скэтчарда [20]).

При исследовании кооперативных связываний уравнение Скэтчарда принимает следующий вид:

$$K_c = \frac{r}{c^m(N-r)}, \quad (2)$$

где  $m$ —коэффициент Хилла, характеризующий степень кооперации.

Поскольку зонд дает информацию о свойствах участка связи, необходимо знать место его расположения в мембране. Полагают, что зонд в принципе может быть связан с белками или липидной фазой; в последнем случае он расположен на поверхности, в области глицериновых остатков или гидрокарбоновой внутренней части фосфолипидных районов мембраны [9, 25]. Зонды, несущие заряд, скорее всего располагаются в полярном поверхностном слое; в пользу этого предположения свидетельствуют данные рентгеноструктурного анализа комплекса АНС с лецитином [16].

*Положение максимума флуоресценции.* При поглощении света и переходе в возбужденное состояние происходит увеличение дипольного момента молекулы [10, 11]. В случае АНС и ТНС дипольный момент возрастает на десятки дебаев [7, 10, 15]. В результате должна произойти взаимная переориентация возбужденного зонда и молекул полярного растворителя, на которую расходуется часть энергии поглощенного кванта. Это одна из причин того, почему излученный квант будет более длинноволновым, чем поглощенный (закон Стокса). Чем меньше поляризуются молекулы растворителя и жестче структура растворителя, тем меньше разница между энергией поглощенного и излученного квантов, т. е. меньше стоксовский сдвиг. Теоретически связь между стоксовским сдвигом и разницей дипольных моментов ( $M_e - M_g$ ) зонда соответственно в основном ( $M_g$ ) и возбужденном ( $M_e$ ) состояниях задает уравнением [3]:

$$\frac{1}{\lambda_{\text{полг}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{фл}}} \simeq \frac{2}{hc^2} \left( \frac{D-1}{2D+1} - \frac{n-1}{2n^2+1} \right) \frac{(M_e - M_g)^2}{a^3} + \text{const},$$

где  $a$ —радиус Онгагера зонда,  $h$ —постоянная Планка,  $c$ —скорость света,  $D$ —диэлектрическая проницаемость,  $n$ —показатель преломления растворителя [1, 5].

На рис. 1 приведены результаты исследования по изучению ганглиозидов на максимум флуоресценции АНС, связанной с эритроцитарными мембранами [4]. Показанный на графике коротковолновый сдвиг максимума флуоресценции свидетельствует о понижении полярности микроокружения зонда.

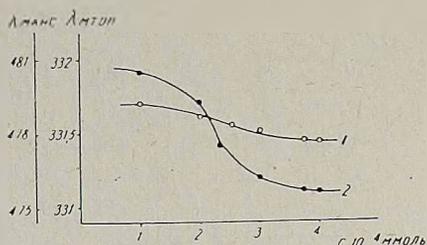


Рис. 1. Сдвиг максимума флуоресценции АНС<sup>-</sup> (1) и триптофанов белка эритроцитарных мембран (2).

Вместе с тем полярность окружения—далеко не единственный фактор, влияющий на  $\lambda_m$ . К другим важным факторам относятся следующие. А. Специфические взаимодействия между зондом и молекулами растворителя, особенно при возбужденном состоянии зонда. Б. Образование димеров и эксимеров зонда. Гидрофобные зонды в воде или, наоборот, зонды с большим дипольным моментом в неполярной среде легко образуют ассоциаты, что сильно отражается на всех спектральных параметрах. В возбужденном состоянии дипольный момент возрастает, что еще более усиливает ассоциацию зондов в неполярной среде («эксимеры»). Это свойственно, в частности, пиренсульфонату в субмитохондриальных частицах [8, 25]. В. Конформация, которую принимает зонд в участке связывания. При достаточной жесткости участка гибкие зонды могут принять конформацию, определяемую его геометрией и жесткостью. Возможно,  $\lambda_m$  флуоресценции АНС зависит от данного фактора [13]. Г. Если, например, интенсивность флуоресценции двух различных форм зонда, допустим, связанного с биоструктурой и свободного, близки, то измеряемая  $\lambda_m$  является просто промежуточной для двух крайних форм. Тогда переход зонда из данного состояния в другое будет сопровождаться кажущимся сдвигом  $\lambda_m$ , который в ряде случаев обычно интерпретируется как «изменение полярности участка связи» [17]. Этот случай можно отличить от предыдущих, измеряя ширину спектра флуоресценции: сосуществование нескольких форм зонда с разными  $\lambda_m$  должно вызвать уширение максимума.

Таким образом, положение максимума флуоресценции зонда несет большую и разнообразную информацию о ближайшем окружении, а не только характеризует «полярность». Эта информация может быть расшифрована как путем всестороннего изучения поведения данного зонда, так и использования различных зондов.

*Микровязкость в мембранах.* Понятие «вязкость» не вполне точно, когда речь идет о подвижности флуоресцентного зонда в асимметричной, сложной по химической организации системе, какой являются фосфоли-

гидные, а тем более биологические мембраны. Скорость вращения или поступательной диффузии зонда определяется микроструктурой его непосредственного окружения в мембране, что дает основание пользоваться термином «микровязкость».

Одним из наиболее оптимальных методов оценки «микровязкости» является метод с применением ФЗ пиреном. Пирен позволяет судить о подвижности концов жирнокислотных цепей, расположенных в глубине мембраны [3, 23]. Как видно из рис. 2, спектр флуоресценции пирена состоит из двух компонентов: коротковолновый соответствует флуоресценции мономеров пирена, длинноволновый — флуоресценции эксимеров [3]. Соотношение интенсивностей  $I_b/I_m$  зависит от скорости латеральной диффузии пирена в глубине мембраны [23]. Однако величина  $I_b/I_m$  не

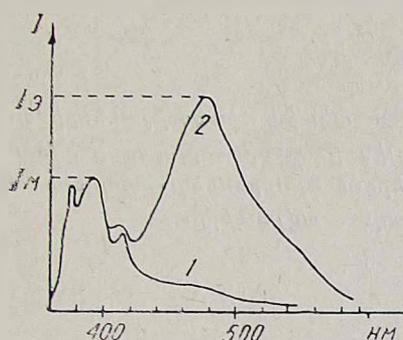


Рис. 2.

Рис. 2. Изменение формы спектра флуоресценции пирена в липосомальных мембранах (0,3 мг/мл) в зависимости от отношения пирен/липид.  $I_b$  и  $I_m$  — интенсивность флуоресценции эксимеров и мономеров пирена.

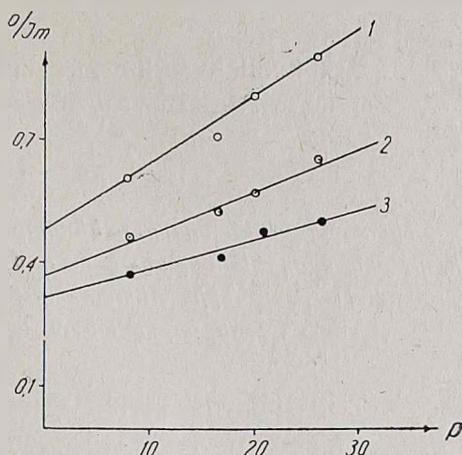


Рис. 3.

Рис. 3. Влияние простагландинов  $E_1$  и  $F_2$  на диффузию пирена в липосомальных мембранах. 1 — контроль, 2 — ПГЕ<sub>1</sub> концентрации  $10^{-8}$  М; 3 — ПГF<sub>2a</sub> концентрации  $10^{-8}$  М.

может служить параметром, характеризующим диффузию пирена в мембране, если наблюдается изменение квантового выхода флуоресценции эксимеров. Чтобы обойти эту трудность, можно применять иной способ расчетов степени эксимерации пирена. Согласно Вандеркои и Галлис, кинетика эксимерации пирена должна подчиняться уравнению Штерна-Фольмера [23]:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + kP, \quad (4)$$

где  $\tau_0$  и  $\tau$  — время жизни возбужденного состояния мономеров пирена в отсутствие и при наличии эксимеризации соответственно;  $P$  — концентрация пирена в мембране;  $K$  — константа скорости эксимеризации. Поскольку эксимеризация соответствует динамическому тушению [23], то интенсивность флуоресценции мономеров пирена  $I_m = \tau PC$ , где  $s$  — константа, не зависит от эксимеризации. Тогда

$$\frac{PC}{I_m} = \frac{1}{\tau_0} + kP. \quad (5)$$

Следовательно, график зависимости  $P/I_m$  от  $P$  представляет собой прямую линию, наклон которой пропорционален константе диффузии. Этот наклон уже не зависит от  $\tau_0$  или от времени жизни эксимеров, т. е. от наличия тушителей в мембране. Данные по эксимеризации пирена в липосомах, модифицированных простагландином  $E_1$ , рассчитанные этим методом, показывают (рис. 3), что скорость эксимеризации пирена действительно снижается на  $15 \pm 5\%$  в результате влияния простагландина [2].

Сектор радиобиологии  
Минздрава Армянской ССР.

Поступило 29.V 1981 г.

**ՖԼՈՒՐԵՍԵՆՏՆԱՅԻՆ ԶՈՆԴՆԵՐԻ ՕԳՏԱԳՈՐԾՈՒՄԸ ԲԶԶԱՅԻՆ  
ԵՎ ՄՈԴԵԼԱՅԻՆ ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՈՒՄ**

Ս. Ա. ԲԱԶԺԻՅԱՆ

*Դիտարկվում են տարբեր կենսաբանական ակտիվ միացությունների ազդեցության տակ կենսաբանական և մոդելային թաղանթների կառուցվածքային փոփոխությունների հետազոտություններում ֆլուորեսցենտ զոնդերի օգտագործման վերաբերյալ գրական և սեփական տվյալները:*

**THE USE OF FLUORESCENT PROBES IN THE CELL  
AND MODEL MEMBRANE STUDY**

S. A. BADJINIAN

Some data on the use of fluorescent probes in the investigation of structural changes of biological and model membranes under the influence of various biologically active compounds are studied.

The properties and characteristics of the fluorescent probes that are used to examine different membrane processes are described.

**Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. Бахшиев Н. Г. Кн.: Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий. Л., 1972.
2. Бороян Р. Г., Баджинян С. А., Акопов С. Э. Тез. докл. Всесоюзн. симп. «Простагландины и кровообращение», 7, 1980.
3. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Кн.: Флуоресцентные зонды в исследов. биол. мембран. М., 1980.
4. Мхелян Э. Е., Соцкий О. П., Баджинян С. А., Акопов С. Э. Биофизика. 25, 4, 638, 1980.
5. Рейхардт Х. Кн. Растворители в органической химии. Л., 1973.
6. Azzi A. Meth. Enzympl., 32, 234, 1974.
7. Brand L., Gohike J. Biochem. et bioph. Acta, 12, 261, 1962.
8. Brocklehurst J., Freedman R., Hancock D., Radda G. Bloch. J., 116, 721, 1970.
9. Freedman R., Radda G. Ibid. 3, 150, 1969.
10. Edelmann G., Mcllure W. Accounts. Chem. Res., 1, 65, 1971.

11. *Hawkins H., Freedman R.* JEBS Lett., 31, 301, 1974.
12. *Galla H., Sackmann E.* Bloch. Bioph. Acta., 339, 103, 1974.
13. *Gameran A., Jensen L.* Amer. Chem. Soc., 92, 4200, 1970.
14. *Chen R.* Arch. Bloch. Bioph., 172, 32, 1976.
15. *McClure W., Edelman G.* Ibid. 5, 1908, 1966.
16. *Lesslauer W., Cain J., Blasie J.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 1499, 1972.
17. *Phillips S., Cramer W.* Biochemistry, 12, 1170, 1973.
18. *Sellskar C., Brand L.* Science, 171, 799, 1971.
19. *Sellskar C., Brand L. J.* Amer. Chem. Soc., 93, 5414, 1971.
20. *Scatchard G.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 660, 1949.
21. *Sterno, Volmer M.* Phys. Z., 20, 183, 1919.
22. *Trauble H., Overath R.* Ibid., 307, 491, 1973.
23. *Vanderkool J., Callis J.* Biochemistry (Wash.), 13, 4000, 1974.
24. *Vaughan W., Weber G.* Biochemistry, 9, 464, 1970.
25. *Waggoner A., Stryer L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 579, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXV, № 9, 1982

УДК 612.117.7: 616.155.392

## ИЗУЧЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИИ

С. А. ГОНЯН, Э. А. КАРАГУЛЯН

Исследовано изменение электрокинетического потенциала и кислотной резистентности эритроцитов мышей в процессе развития асцитной карциномы Эрлиха при действии сарколизина и некоторых ненасыщенных лактонов.

Установлена связь между эффективностью ингибирующего действия этих веществ и изменением исследованных параметров.

*Ключевые слова:* эритроциты, электрокинетический потенциал, опухолеобразование.

При злокачественных новообразованиях кровь больного претерпевает ряд физико-химических изменений. Поэтому для раннего выявления опухолеобразования исследования биофизических параметров крови могут иметь диагностическое значение. Изучение этих показателей в динамике опухолеобразования даст возможность также следить за эффективностью действия лечебных средств.

Биофизическим методом исследования физико-химических изменений, происходящих в крови организма-опухоленосителя, могут служить методы микроэлектрофореза и кислотной резистентности эритроцитов. Метод кислотных эритрограмм, предложенный Пительзоном и Терсковым, был использован многими авторами для исследования физико-химического состояния эритроцитов при различных заболеваниях [1, 2]. В работах Харамоненко, Ракитянской, Зериал, Вилкинс [3, 4] было показано, что величина электрокинетического ( $\xi$  дзетта) потенциала эритроцитов и лейкоцитов, измеренная методом клеточно-электрофореза, меняется в зависимости от различных патологических состоя-