

Օրիգինալ հոդվածներ • Оригинальные статьи • Original articles

Биол. журн. Армении, 1-2 (55), 2003

УДК 577.34:537+598.1

**ИЗУЧЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР
ТКАНЕЙ ПОЗВОНОЧНЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ**

А.Е. ЗАКАРЯН, Н.М. АЙВАЗЯН, Н.А. ЗАКАРЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики, 375049

Исследована фотоиндуцированная хемилюминесценция (ФХЛ) гомогенатов и общей фракции липидов нервной, сердечной, печеночной и мышечной тканей представителей четырех классов позвоночных. Показано, что уровни свечения гомогенатов после их облучения УФ-светом растут в ряду пойкилотермных позвоночных (рыбы-амфибии-рептилии), и несколько понижаются в гомогенатах тканей млекопитающих. Интенсивности ФХЛ липидов из тканей позвоночных различаются незначительно, что, вероятно, свидетельствует о ведущей роли белковых компонентов клеточных мембран в процессе испускания квантов света при УФ-индуцированной ХЛ.

Ուսումնասիրվել է ողնաշարավորների չորս դասի ներկայացուցիչների ուղեղի, սրտամկանի, լյարդի և մկանի հոմոգենատների և ընդհանուր լիպիդների ֆոտոինդուկցված քիմլյումինեսցենստում (ՖՔԼ): Ցույց է տրվել, որ ՌԻՄ-լույսով ճառագայթելուց հետո հոմոգենատների լուսարձակման մակարդակը աճում է պոյկիլոթերմ ողնաշարավորների շարքում ձկներ - երկկենցաղներ – սողուններ, և փոքր ինչ նվազում է կաթնասունների հյուսվածքների հոմոգենատներում: Ողնաշարավորների հյուսվածքներից լիպիդների ՖՔԼ ինտենսիվությունները իրարից տարբերվում են աննկատ, ինչը, հավանաբար, վկայում է այն մասին, որ ՌԻՄ-ինդուկցված քիմլյումինեսցենստման ժամանակ լույսի քվանտի արձակման գործընթացում զլխավոր դերը պատկանում է բջջաթաղանթի սպիտակուցային բաղադրամասերին:

Photoinduced chemiluminescence (PhChL) was studied in homogenates and lipid fractions from nervous, heart, liver and muscular tissues of representatives of four classes of vertebrates. Levels of homogenate's luminescence after UV-radiation increases in row of poikilothermic vertebrates: fishes – amphibian – reptiles and slightly decrease in homogenates of mammal's tissues. Intensities of PhChL of lipids from tissues of vertebrates are distinguish not to a marked degree, what, probably, testify about key role of protein components of cell membranes as emitters of quantum during UV-induced ChL.

*Фотоиндуцированная хемилюминесценция – ультрафиолетовое излучение –
позвоночные – липиды*

Значение взаимодействия УФ-излучения с компонентами биологических мембран для всех организмов, живущих на Земле, трудно переоценить. При этом в таких многокомпонентных системах, какими являются биологические мембраны, происходит одновременно много фотохимических реакций: фотоинактивация белков в результате фотолиза ароматических аминокислот и

серосодержащих групп, перекисное окисление липидов, фотодеструкция различных коферментов, таких как пиридиннуклеотиды, флавины, коэнзим Q, геминные соединения, которые связаны с ферментными системами, встроенными в мембраны и др.

Однако, затрагивая вопрос о механизмах фото- и радиобиологических процессов, протекающих в мембранах тканей различной функциональной специфичности, зачастую приводящих к повреждению целостности клеток, остается не до конца выясненным, изменения каких именно структур в составе мембран играют ключевую роль в свободнорадикальном процессе их разрушения под воздействием УФ-излучения. Для решения этой проблемы, на наш взгляд, весьма информативным может быть метод хемилюминесцентного анализа (ХЛ-анализа), позволяющий выявить изменения, претерпеваемые биомембраной в режиме реального времени. Результаты исследований последних лет в этой области находят свое применение в различных областях медико-биологических дисциплин [1,6]. Однако вопросы сравнительного анализа УФ-индуцированной ХЛ в тканях организмов, обладающих различной степенью резистентности к коротковолновому излучению, до сих пор не привлекали внимания ученых.

В представленной работе проведено ХЛ-исследование взаимодействия УФ-излучения с тканевыми гомогенатами и чистыми липидными фракциями из различных органов некоторых представителей высших позвоночных.

Материал и методика. Исследования проведены на обыкновенном карасе (*Carassius carassius*), озерной лягушке (*Rana ridibunda*), кавказской агаме (*Stellio caucasicus*) и беспородных белых крысах обоего пола. После декапитации животных отделяли головной мозг, сердце, печень и участок поперечно-полосатой мускулатуры. Фракцию общих липидов выделяли по методике Кейтса [8], затем при помощи вакуумного испарителя избавлялись от смеси хлороформ-метанол и растворяли липидный осадок в нонане для получения 3%-ного раствора. Исследования проводили также на гомогенатах мозговой ткани в буферном растворе (0.175 М KCl, 0.025 М трис-HCl, pH 7.4) с конечной концентрацией 20 мг сырой массы ткани на 1 мл буфера. Измерение интенсивности ХЛ проводили с помощью квантометрической установки, работающей на основе фотоэлектронного умножителя ФЭУ-139 с диапазоном спектральной чувствительности 300-800 нм [7]. Пробы предварительно облучали УФ-лампой MEDICOR, Q-439, Budapest (экспозиция 2.5 мин, расстояние до кюветы 5 см). Время после облучения и до начала измерения 2-2.5 с.

Результаты экспериментов статистически обработаны с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В проведенных экспериментах облучению подвергались гомогенаты мозга, сердца, печени и мышцы исследуемых образцов (рис.1).

При этом уровни свечения гомогенатов мозга заметно низки по сравнению с таковыми гомогенатов сердца и мышц. По уровню интенсивности ХЛ гомогенаты мозга превышают только свечение гомогенатов печени. Как нам кажется, это можно связать с очень низким содержанием интегральных белков в печени позвоночных [9]. Очевидно, что деструктивные процессы в липидных мембранах при УФ-облучении влекут за собой полную инактивацию мембранных белков. Надо полагать, что здесь имеет место каскадообразное усиление фотоиндуцированной хемилюминесценции (ФХЛ),

обусловленное фотолизом свободных белков по следующему механизму: основными мишенями являются триптофан, тирозин и фенилаланин, при фотоионизации которых образуется катион-радикал и сольватированный электрон по схеме:



Катион-радикал ($\cdot AH^+$) — это сильная кислота, которая быстро диссоциирует на протон и нейтральный радикал:



Поскольку наибольшим сродством к электрону обладают цистин и цистеин, они первыми подвергаются разрушению.

Нейтральные радикалы ($A\cdot$) также неустойчивые соединения и вступают в дальнейшие превращения [2].

Уровни интенсивности свечения в сердце и особенно в мышцах по сравнению с гомогенатами остальных тканей довольно высоки. Однако, помимо тканевых различий, наблюдается также иная закономерность, а именно здесь интенсивность ФХЛ гомогенатов повышается по мере возрастания эволюционной организации животных и у пойкилотермных позвоночных образует следующий ряд:

$$ФХЛ_{рыбы} < ФХЛ_{амфибии} < ФХЛ_{рептилии}$$

Только у млекопитающих значения уровней интенсивности ФХЛ исследуемых образцов ниже, чем у амфибий и пресмыкающихся, но выше, чем у рыб.

Как известно из литературных данных, при облучении УФ-светом растворов низкомолекулярных жирных кислот (НЖК) и их эфиров происходит образование гидроперекисей (диеновых конъюгатов). Подобный процесс имеет место также при облучении фосфолипидов [10].

С целью уточнения природы эмиттеров квантов света в данном процессе в следующей стадии эксперимента нами в сравнительном аспекте были изучены и уровни интенсивности ХЛ фракций общих липидов в нонане, выделенных

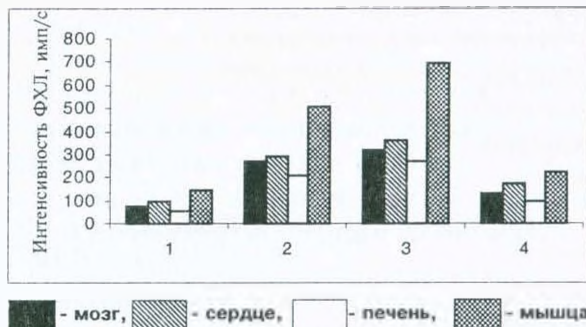


Рис. 1. Интенсивность ФХЛ гомогенатов тканей позвоночных. 1 - карась, 2 - лягушка, 3 - агама, 4 - крыса.

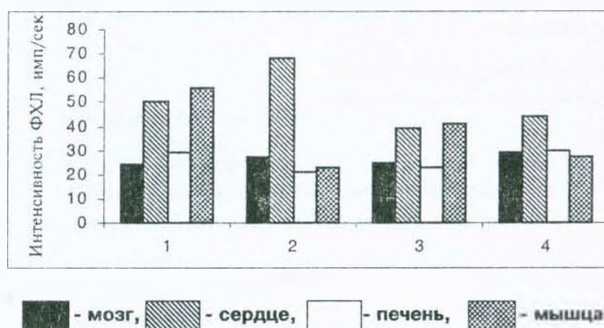


Рис. 2. Интенсивность ФХЛ липидов тканей позвоночных. 1 - карась, 2 - лягушка, 3 - агама, 4 - крыса.

из тканей вышеуказанных представителей позвоночных, предварительно подвергнутых облучению УФ-светом (рис.2). Следует отметить, что свечение липидов примерно на 2 порядка ниже свечения гомогенатов, при этом свечение растворителя (нонан) имеет величину 16 ± 2 имп/сек. Примечательно, что значения ФХЛ липидов мозга всех исследованных животных лежат в пределах близких значений (23-29 имп/сек), что, вероятно, связано с консервативной в аспекте филогенетических изменений природой мозговой ткани, в то время как свечения липидов остальных тканей, состав которых весьма чувствителен к изменению внешних факторов, имеющих важное значение в адаптационных процессах, имеют неодинаковые уровни интенсивности. Подобный результат хорошо согласуется с полученными нами ранее данными об изменении процессов свободнорадикального окисления в различных тканях позвоночных в процессе их филогенеза [4, 5]. По всей видимости, следующее за облучением разрушение мембранных белков может быть обусловлено как светом, поглощаемым белками, так и действием свободных радикалов, образующихся при поглощении УФ-света липидами.

Таким образом, приведенные данные, на наш взгляд, говорят о том, что главными факторами, выступающими в роли основных участников процесса, приводящего к генерации квантов при УФ-облучении, и следовательно, главными факторами, определяющими уровень ФХЛ, являются белковые компоненты мембран, в отличие от спонтанной ХЛ, при которой основными эмиттерами свечения выступают липидные структуры. Основанием к подобным суждениям могут являться также известные литературные данные о тенденции к увеличению содержания мембранных белков в тканях в зависимости от степени дифференциации организма позвоночных [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян Ц.М. Биолог. журн. Армении, 20, 2, 15-23, 1967.
2. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. ПОЛ в биомембранах, М., Наука, 252с., 1972.
3. Забелинский С.А., Чеботарева Л.Ф., Кривченко А.И. Ж. эвол. б/х и физиол., 32, 6, 722-734, 1996.
4. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г. ДАН, 374, 1, 111-114, 2000.
5. Закарян А.Е., Айвазян Н.М., Карагезян К.Г. ДАН, 382, 2, 264-266, 2002.
6. Закарян А.Е., Демин Ю. М., Геворкян М.Л. Ученые записки ЕГУ, 1, 33-36, 1976.
7. Закарян А.Е., Цагикян А.Р., Погосян Г.П. Биол. журн. Армении, 1, 51-54, 1990.
8. Кейтс М. Техника липидологии, М., Мир, с.322, 1975.
9. Медведева Т.Н. Сравнительная биохимия обмена веществ у животных, Куйбышев, 10-23, 1986.
10. Ренби Б., Рабек Я. Фотодеструкция, фотоокисление, фотостабилизация полимеров, М., Мир, 1978.

Поступила 19.VII.2002