

DOI: 577.336-612.014.464

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОЗОНА НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

И.А. МУСИНА, И.А. БЕЛЫХ, Е.В. ОНИЩЕНКО, В.Д. ЗИНЧЕНКО, Т.С. ДЮБКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАНУ, ул. Переяславская, 23, Харьков 61015

e-mail: irina_m_82@mail.ru

Поступила в редакцию 27 декабря 2005 г.

Методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии изучали спектральные характеристики клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, модельных мембранных систем (микросомы) и некоторых биополимеров (сывороточный альбумин быка (САБ) и холинэстераза (ХЭ)) до и после воздействия разных доз озона. Показано, что действие озона на изучаемые объекты имеет четкий дозозависимый характер. Установлено пороговое значение дозы озона, при которой начинает проявляться деструктивное действие озона на клетки дрожжей. Обнаружено повышение микровязкости мембранных липидов микросом под действием озона. При высоких дозах озона интенсивность собственной флуоресценции ХЭ и САБ снижается вплоть до полного исчезновения, что указывает на глубокую деструкцию этих молекул под действием озона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: озон, спектроскопия, флуоресценция, дрожжи, микросомы, биополимеры.

В связи с расширяющимся применением озона в медицине в последнее время возрастает интерес к исследованию механизмов влияния озона на биологические объекты.

Известно, в высоких дозах озон ингибирует физиологические функции биологических систем. Этот вид действия озона на живые системы считается основным. Однако, известны данные о том, что в малых дозах озон может вызывать активацию некоторых функций биологических объектов [1].

Целью настоящей работы явилось изучение дозовых эффектов действия озона на биологические объекты различного уровня организации, модельные мембранные системы и некоторые биополимеры с использованием методов спектрофлуориметрии и спектрофотометрии.

Предметом исследования были хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, микросомы из печени крыс, бычий сывороточный альбумин (САБ) а также холинэстераза (ХЭ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы суспензий дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* с концентрациями от $2,35 \times 10^6$ до 25×10^6 кл/мл смешивали в объемном соотношении 1:1 с физиологическим раствором, содержащим озон в концентрации 4 мг/л. Исследовали спектры собственной флуоресценции дрожжей при возбуждении на длинах волн 300 нм (общая флуоресценция белков), 296 нм (флуоресценция триптофановых остатков), 340 нм (флуоресценция рибонуклеиновых кислот), 340 нм (флуоресценция производных никотинамиддинуклеотида). Также регистрировали спектры возбуждения образцов в максимуме рифлюоресценции белков (337 нм) и в области 400 нм, где регистрируется флуоресценция производных никотинамиддинуклеотида. Кроме того, записывали синхронные спектры флуоресценции дрожжевых клеток в области 200-500 нм со сдвигом щелей 10 нм. Спектры флуоресценции получали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian) с автоматической коррекцией спектров. Ширины входной и выходной щелей монохроматоров составляли 10 нм. Все спектральные измерения выполнялись при 20°C в стандартных кварцевых кюветках 1x1x3 см.

На основании анализа спектров флуоресценции определяли дозу озона, приходящуюся на клетку, выше которой спектры претерпевают значительные изменения.

В работе использовали микросомы из печени крыс с концентрацией белка 0,1 мг/мл, которые получали методом дифференциального центрифугирования при 105 000 g, в течение 90 мин в среде, содержащей 1,15 % KCl и 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,4 [2]. Осадок микросом ресуспендировали в 50 мМ трис-буфере, pH 7,4. Выделенные микросомы затем размораживали до начала экспериментов при -196 °C. Эксперименты проводили на 5 независимо полученных препаратах микросом. Содержание белка в суспензии микросом определяли по методу Лоури [3].

В суспензию микросом вводили различные дозы физиологического раствора с растворенным в нем озоном в концентрации 4 мг/л, получая, таким образом, конечную концентрацию озона в суспензии 0,08; 0,16; 0,32; 0,63; 1,3; 2,5; 3,2; 3,8 мг/л (или, соответственно, от 0,02 до 0,79 мкМ O_3 /мг белка). За 15 мин до начала измерений к 3 мл суспензии микросом добавляли 10 мкл спиртового раствора флуоресцентного зонда пирена ("Sigma", США) с концентрацией пирена 1 мкМ. Флуоресценцию пирена возбуждали светом с длиной волны 340 нм.

Анализировали спектры флуоресценции белков микросомальных мембран, а также вторые производные спектров флуоресценции (2ПСФ), которые позволяют выявлять весьма небольшие изменения в спектрах флуоресценции [4]. При анализе 2ПСФ использовали программу Microcal Origin 6.0.

В исследованиях применяли стандартные коммерческие препараты: 1. САБ фирмы "SERVA", Fraction V, мм 700; 2. лошадиную ХЭ, VI класса чистоты, стандартной активностью 25 АЕ/мг. В опытах концентрация белка и фермента составляла 0,2 – 2 мг/мл.

При исследовании действия озона на макромолекулу бычьего сывороточного альбумина САБ, растворенный в физиологическом растворе без буфера, подвергали обработке озоном путем барботирования озono-кислородной

смесью с концентрацией озона 7,0 мг/л в течение различного времени и регистрировали спектры поглощения и флуоресценции. Как меру количества введенного в раствор озона в данном исследовании использовали время барботирования раствора озono-кислородной смесью. Обработку ХЭ озоном проводили аналогичным образом.

Спектры собственной флуоресценции растворов САБ и ХЭ исследовали на спектрофлуориметре модели F-40 фирмы "Hitachi" (Япония) при длинах волн возбуждения 280 и 296 нм. Наряду со спектрами флуоресценции анализировали 2ПСФ. Для обработки спектров использовали программу Microcal Origin [4].

Спектральные исследования проводили в термостатированных кюветках при комнатной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$). Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Pye Unicam SP-8000 в диапазоне 260-300 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ спектров флуоресценции клеток дрожжей *S. cerevisiae* показал, что под действием озона наблюдаются изменения спектров собственной флуоресценции, спектров возбуждения и синхронных спектров флуоресценции клеток. На рис. 1 показаны спектры собственной флуоресценции дрожжевых клеток в суспензиях с концентрациями $1,18 \times 10^7$ кл/мл (рис. 1 а) и $1,18 \times 10^6$ кл/мл (рис. 1 б) без обработки и после обработки озоном.

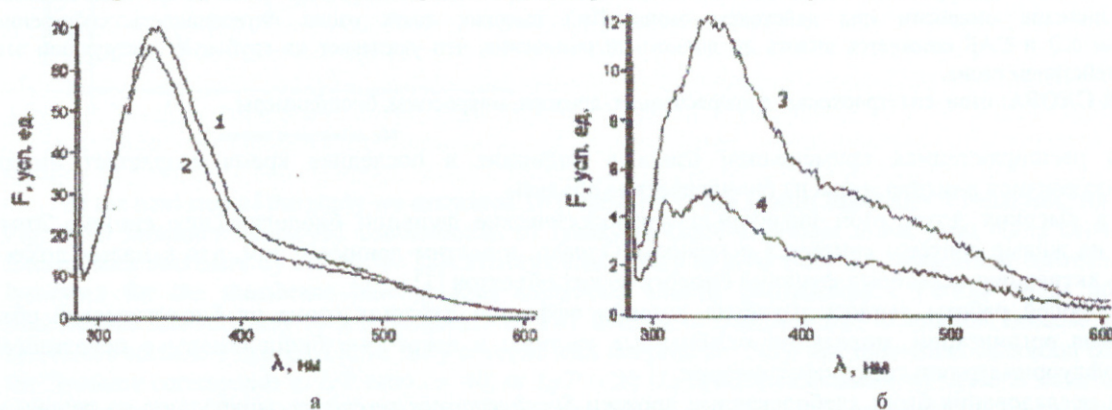


Рис. 1. Спектры собственной флуоресценции клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* без обработки озоном (контроль) и после введения в суспензию озонированного физиологического раствора в соотношении 1:1 (концентрация озона – 4 мг/л) при разных концентрациях клеток в суспензии: а) $1,18 \times 10^7$ кл/мл, б) $1,18 \times 10^6$ кл/мл. 1, 3 – контроль; 2, 4 – после действия озона.

Длина волны возбуждения – 280 нм

Из рисунка видно, что интенсивность флуоресценции клеток под действием озона снижается, причем степень снижения тем больше, чем ниже концентрация клеток в суспензии при одинаковой концентрации озона и более выражена в УФ – области спектров. Изменения спектральных параметров собственной флуоресценции усиливаются при разведении суспензии клеток, начиная с пороговой концентрации $2,95 \times 10^6$ кл/мл, что соответствует дозе $7,36 \times 10^{-10}$ мгО₃/кл. При концентрациях клеток выше $2,95 \times 10^6$ кл/мл они оказываются менее чувствительными к действию озона. Таким образом, проведенные исследования показывают, что действие озона на клетки *S. cerevisiae* имеет пороговый характер, который определяется дозой озона, приходящейся на клетку. Предполагается, что пороговое проявление действия озона можно рассматривать как общую закономерность для разных видов клеток.

Для оценки влияния озона на состояние липидного бислоя микросомальных мембран нами был использован липофильный флуоресцентный зонд пирен. Особенностью этого зонда является то, что в возбужденном состоянии он образует комплексы (эксимеры или возбужденные димеры) в липидных бислоях и не образует таких комплексов с белками. Спектры испускания эксимеров смещены в длинноволновую сторону относительно спектров испускания мономеров пирена и имеют максимум в области 470 нм [5].

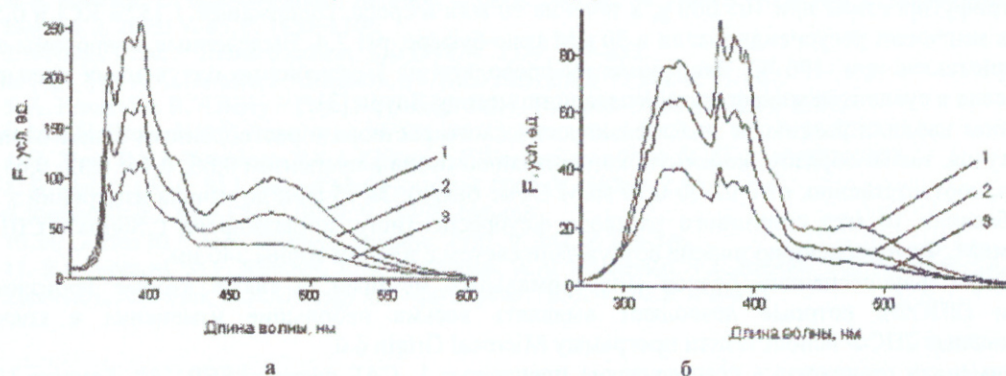


Рис. 2. Спектры флуоресценции пирена в микросомах при возбуждении на длинах волн 340 нм (а) и 296 нм (б). Концентрация озона, мг/л: 1 – 0 (контроль), 2 – 1,3; 3 – 3,8

На рис. 2 представлены спектры флуоресценции пирена в микросомальной мембране. Как видно из рис. 2 эмитсия мономеров и эксимеров пирена в мембранах микросом в значительной степени тушится озоном.

Используя более коротковолновое возбуждение (280 или 296 нм), можно, по переносу энергии с белковых комплексов на пирен судить о состоянии аннулярных липидов, непосредственно контактирующих с интегральными белками мембран. Спектры флуоресценции пирена в микросомальных мембранах, полученные при возбуждении на длине волны 296 нм, представлены на рис. 2 б. Сравнивая эти спектры со спектрами, полученными при возбуждении на длине волны 340 нм (рис. 2 а), можно видеть, что при возбуждении триптофановой флуоресценции белка, возбуждаются также молекулы пирена, находящиеся вблизи липидов, окружающих белки. Это происходит за счет эффекта индуктивно-резонансного переноса энергии.

На основании анализа соотношения интенсивностей F флуоресценции пирена в микросомальных мембранах на длинах волн 373, 393 и 476 нм можно судить об изменении микровязкости в полярной и неполярной областях основного пула липидов мембран [6]. Как видно из рис. 3 (а и б), для флуоресценции пирена, возбуждаемой длине волны 340 нм отношение F_{476}/F_{393} снижается линейно с ростом концентрации озона, а отношение F_{393}/F_{373} в пределах точности эксперимента не изменяется. Это означает, что под влиянием малых доз озона состояние полярной области бислоя не изменяется в пределах погрешности эксперимента. В то же время, микровязкость неполярной области бислоя растет.

На рис. 3 в представлена зависимость отношения интенсивностей эксимерной и мономерной форм F_{476}/F_{393} от концентрации озона при возбуждении на длине волны 296 нм. Это соотношение, согласно существующим представлениям [9], обратно пропорционально микровязкости той среды, в которой распределен зонд. Как видно из рис. 3 в, это отношение для аннулярных липидов почти в 1,5 раза выше, чем для основного пула микросомальных липидов даже в отсутствие действия озона. Отсюда следует, что состояние бислоя в области аннулярных липидов отличается от состояния основного пула. Возможно, в этих местах проницаемость бислоя исходно повышена из-за эффектов упаковки бислоя, вызванных контактом с интегральными белками [7].

Учитывая зависимость направленности биологического действия озона от состояния поверхностных структур вторичных мембран можно предположить, что проникновение высокореактивных молекул озона в бислой происходит, в первую очередь, в местах белок-липидных контактов. В результате нарушается упаковка интегральных белков микросомальных мембран и повышается доступность ароматических остатков для тушения окислителем (водой). В то же время проникновение озона (или вторичных продуктов окисления – гидрофильных продуктов озонлиза мембранных компонентов [8]) в основной пул липидов, вероятно, в большей степени происходит по диффузионному механизму.

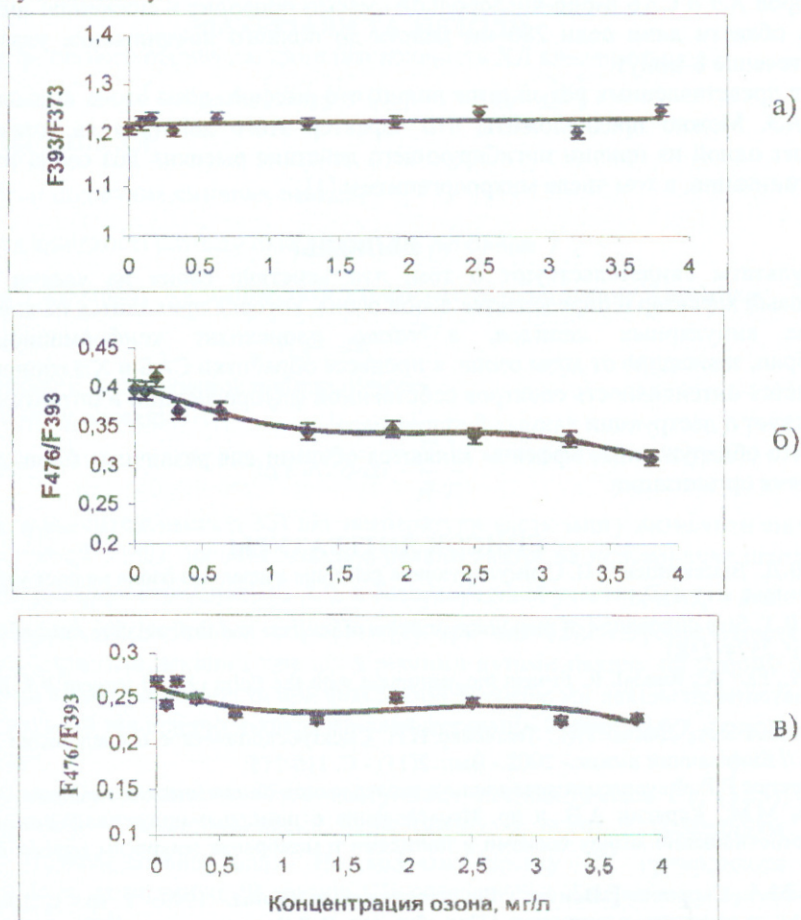


Рис. 3 Влияние озона на соотношение интенсивностей флуоресценции пирена F_{393}/F_{373} (а) и F_{476}/F_{393} (б) в микросомальных мембранах при возбуждении на длине волны 340 нм, а также F_{476}/F_{393} при возбуждении на длине волны 296 нм (в)

На рис. 4 показаны спектры собственной флуоресценции САБ в водном растворе при возбуждении на длине волны 280 нм при барботировании водного раствора САБ озono-кислородной смесью в течение различного времени.

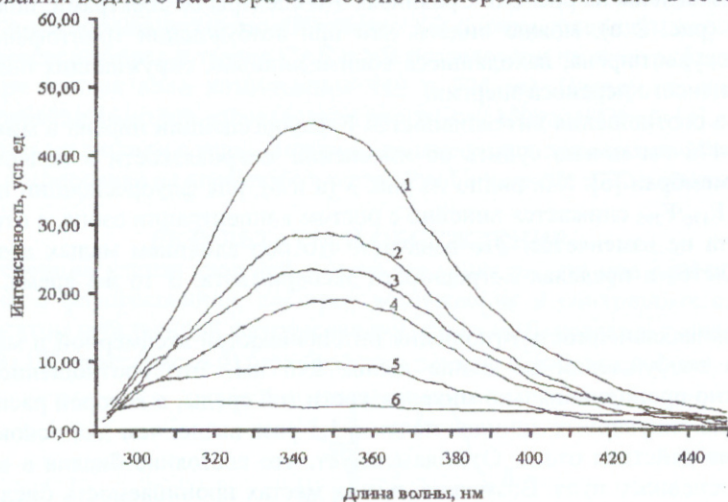


Рис. 4. Спектры собственной флуоресценции САБ при барботировании раствора САБ озono-кислородной смесью с концентрацией озона 7,0 мг/л в течение различного времени. Время барботирования в минутах: 1- контроль (без обработки озонem); 2 - 0,5; 3 - 1; 4 - 2; 5 - 4 и 6 - 6 минут. Длина волны возбуждения - 280 нм

Максимум флуоресценции регистрируется на длине волны 338 нм. В процессе обработки озонem интенсивность флуоресценции уменьшается, и после 6 мин барботирования флуоресценция САБ не регистрируется. Тушевание флуоресценции сопровождается сдвигом спектров флуоресценции в длинноволновую сторону.

Подобный характер имеют также спектры собственной флуоресценции ХЭ.

Обработка растворов ХЭ и САБ озono-кислородной смесью приводит к снижению интенсивности в максимум поглощения белков в области длин волн 280 нм вплоть до полного исчезновения указанного максимума после обработки раствора в течение 8 минут.

Таким образом, из представленных результатов видно, что высокие дозы озона вызывают достаточно глубокую деструкцию САБ и ХЭ. Можно предположить, что характер этого действия является достаточно общим для биополимеров и служит одной из причин ингибирующего действия высоких доз озона на биологические объекты клеточного уровня организации, в том числе микроорганизмы [1].

ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что действие озона на клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеет пороговый характер и определяется дозой озона, которая приходится на клетку; под действием озона изменяется состояние аннулярных липидов, а также происходят конформационные изменения белков микросомальных мембран, зависящие от дозы озона; в процессе обработки САБ и ХЭ озонem с увеличением времени барботирования снижается интенсивность спектров собственной флуоресценции и оптического поглощения, что, в видимом, свидетельствует о деструкции данных биополимеров.

Предполагается, что обнаруженные эффекты являются общими для различных биополимеров и биологических систем клеточного уровня организации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белых И.А., Зинченко В.Д., Высеканцев И.П. Стимулирующее действие малых доз озона на рост микроорганизмов // Проблемы криобиологии. - 2004. - № 4. - С. 41-45.
2. Dehlinger P.J., Schimke R.T. Size distribution of membrane proteins of rat liver and their relative rates of degradation // J. Biol. Chem. 1971. - Vol. 246, N 8. - P. 2574-2583.
3. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. - N 1. - 265-275.
4. Морозова Т.Ф., Ромоданова Э.А., Дюбко Т.С., Тимченко Н.Н. Спектроскопическое исследование влияния замораживания плазмы кордовой крови // Біофізичний вісник. - 2002. - Вып. 2(11). - С. 110-115.
5. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука, 1980. - 320 с.
6. Добрецов Г.Е., Спиринов М.М., Карякин А.В. и др. Исследование с помощью индуктивно-резонансного переноса энергии пространственных взаимоотношений между белками и липидами в мембранах микросом печени // Биохимия. - 1981. - Т. 4. - вып. 3. - С. 504-511.
7. Матус В.К., Мартынова М.А., Скоринко Е.В. и др. // Биологические мембраны. - 1999. - Т. 16. - С. 50-56.
8. Биофизика живых систем: от молекулы к организму / Под общ. ред. И.Д.Волотовского. - Минск: БЕЛСЭНС, 2002. - С. 63-72.
9. Калер Г.В., Мельникова А.М., Матус В.К., Конев С.В. Взаимодействие озона с мембранами эритроцитов // Биологические мембраны. - 1989. - Т. 6. - №11 - С. 1164-1169.