

## ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ НАДОСАДОЧНОЙ ЖИДКОСТИ ОТМЫТЫХ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ВОЗБУЖДЕНИИ

Ю. П. Войнов, В. С. Горелик, А. Р. Зарицкий,  
М. Н. Маслова, Л. Л. Чайков

*В данной работе представлены результаты исследования надосадовой жидкости отмытых эритроцитов методом фотолюминесценции при ультрафиолетовом возбуждении. Сравнивались спектры собственной фотолюминесценции водного раствора аденозинтрифосфата натрия – Виал ( $Na_2ATP$ ) со спектрами надосадовой жидкости эритроцитов, полученной с добавлением  $Na_2ATP$ , глюкозы и без добавления дополнительных веществ. Результаты сравнения свидетельствуют о том, что в надосадовой жидкости возможна регистрация АТФ, который выходит из отмытых эритроцитов в окружающую среду.*

**Ключевые слова:** аденозинтрифосфат (АТФ), аденозинтрифосфат натрия ( $Na_2ATP$ ), ультрафиолетовое возбуждение, надосадовая жидкость, отмытые эритроциты.

Аденозинтрифосфат (АТФ) представляет собой сложное молекулярное соединение, участвующее во всех энергозависимых процессах метаболизма. Как известно, в эритроцитах АТФ образуется в результате бескислородного окисления глюкозы в реакциях гликолиза. Концентрация этого макроэрга в них поддерживается на уровне 1.5 ммоль/л [1, 2]. В то же время в плазме крови измеряемая концентрация АТФ колеблется в пределах от 28 нмоль/л до 11 мкмоль/л [3–9]. Авторы работы [10] такие отличия объясняют различиями в способах подготовки образцов крови к измерениям, что влияет в конечном итоге на выход АТФ из эритроцитов.

Для определения концентраций АТФ во всех известных случаях использовался метод, основанный на биолюминесценции люциферин-люциферазной системы светляка

---

ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский проспект, 53; e-mail: maslova\_marina87@mail.ru, gorelik@sci.lebedev.ru.

[11–13]. Хотя этот метод достаточно прост и удобен, он не является прямым, то есть люминесцирует не сама молекула АТФ, а люминофор, который добавляется к исследуемому раствору, интенсивность свечения которого зависит от концентрации этого макроэрга.

В данной работе для регистрации выхода АТФ из эритроцитов использовалось исследование спектров фотолюминесценции надосадочной жидкости эритроцитов и реперной жидкости, возбуждаемой монохроматическим ультрафиолетовым (266 нм) лазерным источником света. Молекулы АТФ, если они присутствуют в растворе, способны к фотолюминесценции при облучении раствора на длине волны 266 нм при комнатной температуре. Однако спектры фотолюминесценции АТФ и аденина при ультрафиолетовом возбуждении получали прежде лишь при 77 К [14, 15].

Цель данного исследования – методами фотолюминесценции при 298 К получить спектральные характеристики соединений, присутствующих в надосадочной жидкости отмытых эритроцитов в разных условиях, и проверить возможность выхода АТФ из отмытых эритроцитов в надосадочную жидкость.

Для достижения поставленной цели получали и сравнивали спектры образцов надосадочной жидкости с добавлением  $\text{Na}_2\text{АТФ}$ , глюкозы и без добавления дополнительных веществ, а также образцов фармацевтического препарата  $\text{Na}_2\text{АТФ}$  в водном растворе Рингера, который в данной работе был принят за реперный.

### Методика эксперимента

*Подготовка образцов для измерений.* Приготовление исследуемых образцов для исследований было следующим. Взятие донорской крови производилось из локтевой вены здорового донора (25 лет) в три пробирки по 10 мл каждая, в которые для предотвращения свертывания крови предварительно было добавлено по 1 мл гепарина. Для удаления плазмы крови все пробирки центрифугировались в течение 15 минут при 1500 об/мин. После этого эритроциты отмывались три раза – клеточный осадок разбавлялся в 2–3 раза раствором Рингера с последующим центрифугированием и удалением надосадочной жидкости.

Для получения исследуемых образцов надосадочной жидкости в пробирки с отмытыми эритроцитами добавляли по 3 мл: раствора Рингера (пробирка 1); раствора Рингера с добавлением аденозинтрифосфата натрия –  $\text{Na}_2\text{АТФ}$  (пробирка 2); раствора Рингера с добавлением раствора глюкозы (пробирка 3). После чего все пробы выдерживались при температуре  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 5 суток. Для измерения использовалась часть

приготовленной надосадочной жидкости из каждой пробирки, поскольку для одного измерения достаточно нескольких микролитров. Стоит отметить, что ни в одной из проб не наблюдалось видимых признаков гемолиза, то есть разрушения эритроцитов.

Помимо образцов надосадочной жидкости, был приготовлен раствор фармацевтического препарата “Аденозинтрифосфата натрия – Виал”, разбавленный стандартным раствором Рингера до концентрации 1 г/л. В состав препарата “Аденозинтрифосфата натрия – Виал”, кроме АТФ, входят натрия карбонат безводный, натрия гидрокарбонат (натрия бикарбонат), динатрия эдетат (ЭДТА), пропиленгликоль, вода для инъекций.

Состав стандартного раствора Рингера, используемого для приготовления образцов аденозинтрифосфата натрия и надосадочной жидкости, был следующим: натрия хлорид – 8.6 г/л, калия хлорид – 0.3 г/л, кальция хлорид – 0.25 г/л.

*Используемая установка и ее возможности.* Принципиальная схема установки для регистрации спектров фотолюминесценции в исследуемых веществах представлена на рис. 1.

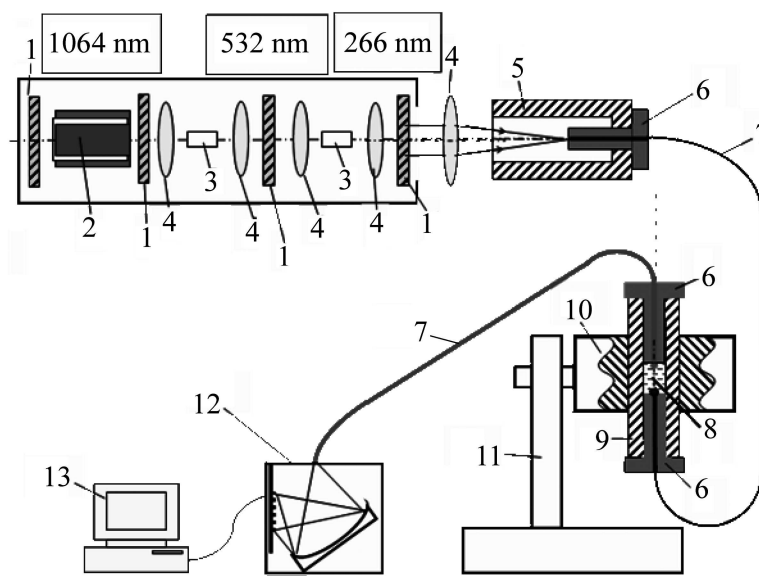


Рис. 1: Схема волоконно-оптической установки для регистрации спектров фотолюминесценции при ультрафиолетовом лазерном возбуждении. 1 – зеркала, 2 – активный элемент лазера, 3 – нелинейно-оптические кристаллы, 4 – линзы, 5 – юстируемый цилиндр, 6 – держатели световодов, 7 – световоды, 8 – исследуемая жидкость, 9 – цилиндрическая кювета, 10 – держатель кюветы, 11 – стойка, 12 – миниспектрометр, 13 – компьютер.

Для возбуждения спектров фотолюминесценции в биологических объектах использовался импульсно-периодический лазер (см. рис. 1) на алюмоиттриевом гранате  $\text{YAG:Nd}^{3+}$ , исходное излучение которого соответствовало длине волны 1064 нм. В резонаторе лазера присутствовали два нелинейно-оптических кристалла, обеспечивающих генерацию второй (532 нм) и четвёртой (266 нм) оптических гармоник. Излучение с длиной волны 532 нм отражалось назад с помощью выходного бихроматического зеркала, пропускающего ультрафиолетовое излучение с длиной волны 266 нм. Импульсы ультрафиолетового излучения длительностью 10 нс генерировались с частотой следования 3000 Гц при средней мощности лазерного излучения, равной 5 мВт. Ультрафиолетовое излучение с помощью кварцевой линзы (4) фокусировалось в торец световода (7), закреплённого в юстируемом цилиндре (5) с помощью держателя (6). Возбуждающее излучение подводилось к цилиндрической кювете (9) из дюралюминия с внутренним диаметром 3 мм. Толщина слоя исследуемой жидкости (8) в кювете варьировалась в диапазоне 1–3 мм. Вторичное излучение от люминесцирующего раствора с помощью световода направлялось на входную щель волоконно-оптического миниспектрометра типа FSD-8 (12). Миниспектрометр позволял регистрировать спектры вторичного излучения в диапазоне 200–800 нм со спектральным разрешением 2 нм. Спектры регистрировались многоэлементным приёмником излучения и обрабатывались в цифровом виде с использованием компьютера (13). Экспозиции при записи спектров фотолюминесценции составляли 0.1–10 с.

*Экспериментальная часть.* В первую очередь в качестве реперных были получены спектральные характеристики препарата “Натрия аденозинтрифосфат – Виал”, состав и методика приготовления которого описана выше. На рис. 2 представлен спектр его фотолюминесценции в водном растворе Рингера в концентрации 1 г/л. В этом спектре, помимо возбуждающей линии 266 нм, присутствуют линии 297, 473, 588, 646 нм. При этом на левом склоне линии 473 нм заметны следы более слабой линии  $\sim 449$  нм, а на правом склоне  $\sim 500$  нм. С этим спектром производилось сравнение всех спектров фотолюминесценции, полученных в различных образцах надсадочной жидкости.

На рис. 3 представлен спектр фотолюминесценции надсадочной жидкости, полученной при выдержке отмытых эритроцитов в растворе Рингера с добавлением раствора  $\text{Na}_2\text{ATФ}$ . В этом спектре наблюдаются такие же линии, что и в реперном спектре фотолюминесценции раствора чистого  $\text{Na}_2\text{ATФ}$  – 298, 449, 473, 502, 588 и 646 нм. Однако в относительных интенсивностях наблюдаются существенные отличия – интенсивность линий 298, 588, 646 нм стала меньше по сравнению с основной линией 473 нм. Или, воз-

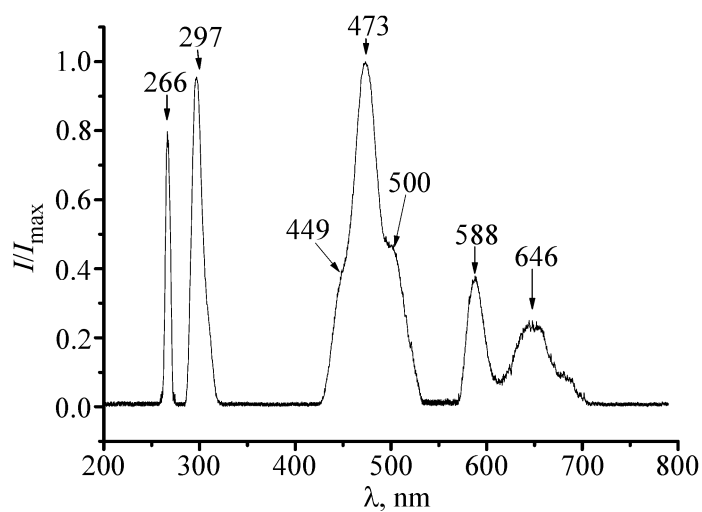


Рис. 2: Спектр фотолюминесценции аденозинтрифосфата натрия в водном растворе Рингера.

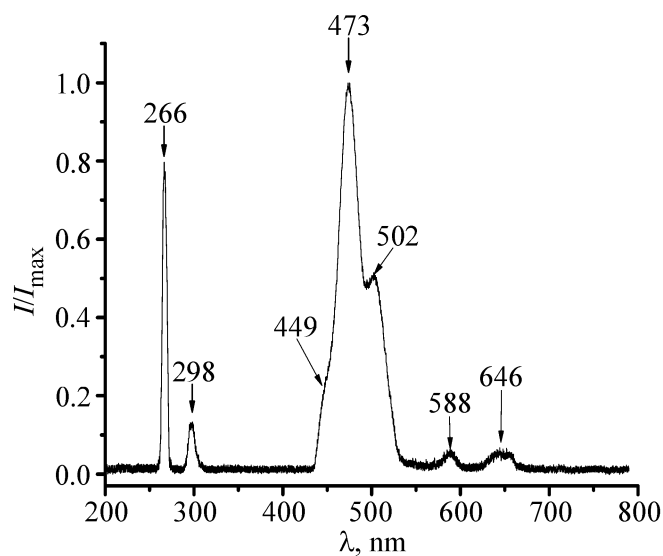


Рис. 3: Спектр фотолюминесценции надосадочной жидкости эритроцитов, полученной с добавлением натрия аденозинтрифосфата ( $\text{Na}_2\text{АТФ}$ ).

можно, интенсивность основной линии увеличилась, и при нормировке относительная интенсивность других линий уменьшилась. Так как в этом спектре присутствуют все линии, которые характерны для реперного спектра чистого раствора аденозинтрифосфата натрия, то это открывает возможность для идентификации АТФ, который может выходить из эритроцитов.

Далее проводилось исследование образцов надосадочной жидкости, полученной в результате выдержки отмытых эритроцитов в растворе Рингера с добавлением глюкозы и без нее в течение 5 суток. Напомним, что после последнего отмывания эритроцитов в одну из проб было добавлено 3 мл раствора Рингера с концентрацией глюкозы 5 ммоль/л для нормального протекания метаболических процессов в них.

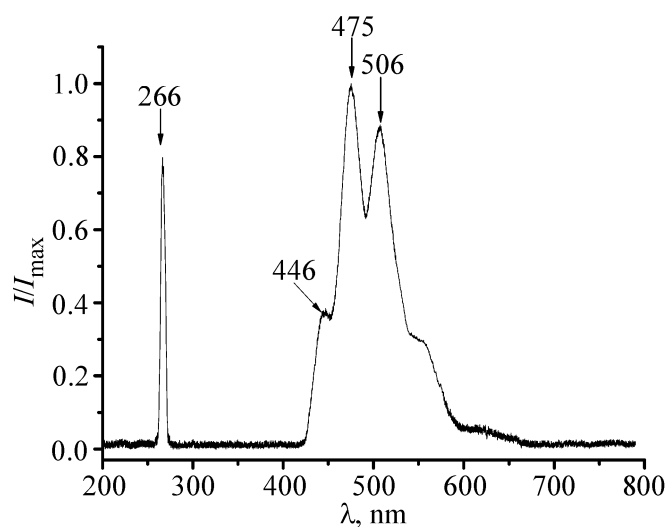


Рис. 4: Спектр фотолюминесценции надосадочной жидкости эритроцитов с добавлением глюкозы.

На рис. 4 представлен спектр фотолюминесценции надосадочной жидкости, полученной с добавлением глюкозы. В нем, помимо линии ультрафиолетового возбуждения (266 нм), имеются достаточно интенсивные линии 475 нм и 506 нм, а также менее интенсивная линия 446 нм, которые характерны для спектра реперного раствора. Однако в данном спектре отсутствует линия 298 нм, и наблюдается уширение полосы, состоящей из наиболее интенсивных линий – 446, 475 и 506 нм. Кроме того, в данном спектре не имеется ярко выраженных линий 588 нм и 646 нм.

Исследование образца надосадочной жидкости, полученной без добавления глюкозы, проводилось для выяснения возможности выхода АТФ из эритроцитов с метаболизмом, угнетенным за счет отсутствия внешнего источника глюкозы.

В спектре фотолюминесценции надосадочной жидкости эритроцитов, полученной без добавления глюкозы, представленном на рис. 5, наблюдаются интенсивные линии 475 и 502 нм. Линии 473 нм и 500 нм (см. рис. 2) имеются в спектре фотолюминесценции реперного раствора  $\text{Na}_2\text{АТФ}$ , однако в данном спектре отсутствует линия 449 нм на левом крыле линии 475 нм, а также линии 298, 588 и 646 нм.

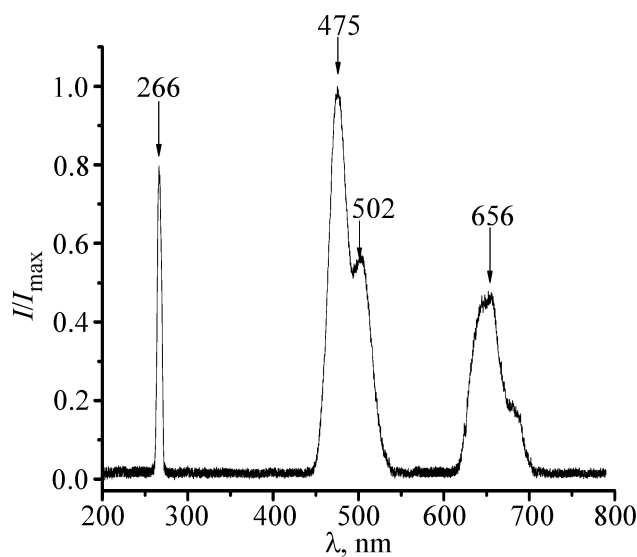


Рис. 5: Спектр фотолюминесценции надосадочной жидкости эритроцитов без добавления дополнительных веществ.

Помимо этого, в спектре на рис. 5 имеется линия 656 нм (возможно, со слабым сателлитом на 680–690 нм), которая характерна для спектра фотолюминесценции гемоглобина. Для иллюстрации этого последнего утверждения на рис. 6 представлен спектр фотолюминесценции эритроцитов, взятых из пробы без добавления глюкозы. При этом из-за сильного поглощения возбуждающего света пришлось разбавлять эритроциты раствором Рингера до тех пор, пока не стал виден сигнал люминесценции.

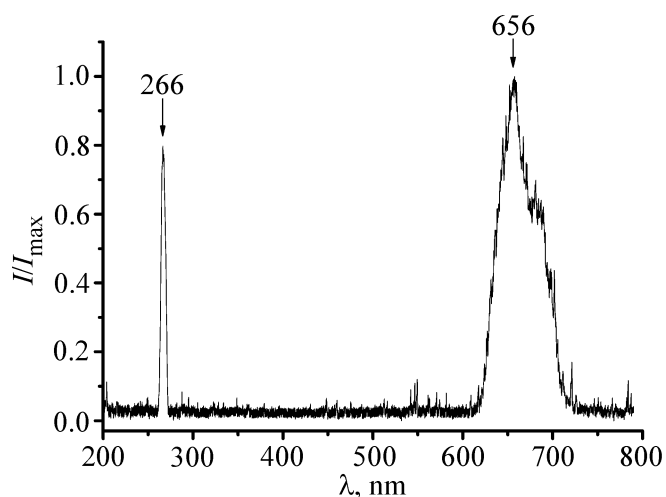


Рис. 6: Спектр фотолюминесценции эритроцитов, разбавленных раствором Рингера.

В полученном спектре, помимо возбуждающей линии (266 нм), имеется линия 656 нм (с сателлитом на правом крыле 680 нм), которая также наблюдалась в спектре люминесценции надосадочной жидкости, полученной без добавления глюкозы (рис. 5).

*Обсуждение результатов.* Проведенные измерения и сравнение спектров фотолюминесценции надосадочной жидкости отмытых эритроцитов в разных условиях позволили заключить, что в надосадочной жидкости появляется вещество, спектральные особенности люминесценции которого характерны для  $\text{Na}_2\text{АТФ}$ . Это позволяет утверждать, что в тех условиях, в которых проведены опыты, АТФ выходит из эритроцитов и образует соединение с натрием, имеющимся в растворе Рингера.

Все полученные спектры, представленные на рис. 2–5, имеют схожие конфигурации в области длин волн от 400 до 600 нм и включают в себя наиболее интенсивные линии 473–475 нм и 500–506 нм. По указанному участку спектра с такими характерными линиями представляется возможным идентифицировать  $\text{Na}_2\text{АТФ}$ . При выходе АТФ из эритроцитов в надосадочную жидкость, где концентрация ионов  $\text{Na}^+$  существенно больше, чем в самих эритроцитах, он может с ним взаимодействовать с образованием натриевой соли. Поэтому спектры фотолюминесценции образцов надосадочной жидкости, полученных с добавлением и без добавления глюкозы, близки к реперному спектру фармацевтического аденозинтрифосфата натрия (который также является натриевой солью АТФ).

Особенностью спектров фотолюминесценции образцов надосадочной жидкости, полученных с добавлением (рис. 4) и без добавления глюкозы (рис. 5), является отсутствие по сравнению с реперным спектром линий 298, 588, 646 нм. Отсутствие линии 298 нм можно объяснить ее попаданием на край поглощения аденина [15] и безызлучательным переходом энергии на другой энергетический уровень (например, на верхний уровень перехода 475 нм). Тем же эффектом может быть объяснено возрастание интенсивности основной линии 473 нм по сравнению с линией 298 нм в спектре, представленном на рис. 3. Присутствие линий 588 нм и 646 нм в спектре реперного образца  $\text{Na}_2\text{АТФ}$  и в образце надосадочной жидкости, полученной с его добавлением (рис. 2, 3), и отсутствие их в спектрах на рис. 4, 5 может быть обусловлено влиянием примесей других соединений в фармацевтическом препарате, спектры люминесценции которых отдельно не получали. Отсутствие линии 446 нм в надосадочной жидкости эритроцитов с угнетенным метаболизмом требует отдельного анализа.



Сравнение спектров люминесценции эритроцитов и образцов надосадочной жидкости (рис. 6 и 5), полученных без добавления глюкозы, показало, что отдельные молекулы гемоглобина могут выходить из эритроцитов с угнетенным метаболизмом.

*Заключение.* В работе приведены результаты сравнения спектров фотолюминесценции образцов надосадочной жидкости отмытых эритроцитов, приготовленных по различным методикам, с реперным спектром водного раствора препарата “Аденозинтрифосфата натрия – Виал”. Спектры фотолюминесценции получали, используя волоконно-оптическую методику с применением ультрафиолетового лазера с длиной волны 266 нм.

Установлено, что в образцах надосадочной жидкости, полученных с добавлением и без добавления в нее глюкозы, наблюдались некоторые линии, характерные для спектра реперного раствора. Это свидетельствует в пользу выхода АТФ из отмытых эритроцитов в надосадочную жидкость и образования его соединения с натрием. Отметим, что примененный в настоящей работе метод позволил получить описанные результаты без добавления в кровь каких-либо веществ, которых нет в плазме крови *in vivo*.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] Е. А. Черницкий, А. В. Воробей, *Структура и функции эритроцитарных мембран* (Минск, Наука и техника, 1981).
- [2] А. И. Атауллаханов, Ф. И. Атауллаханов, В. М. Витвицкий и др., *Биохимия* **50**(6), 1005 (1985).
- [3] T. Forrester, A. R. Lind, *J Physiol.* **204**, 347 (1969).
- [4] P. I. Parkinson, *J Physiol.* **234**, 72 (1973).
- [5] M. W. Gorman, D. R. Marble, K. Ogimoto, E. O. Feigl, *Luminescence* **18**, 173 (2003).
- [6] G. R. Bergfeld, T. Forrester, *Cardiovasc Res.* **26**, 40 (1992).
- [7] R. A. Harkness, S. B. Coade, A. D. Webster, *Clin. Chim. Acta* **143**, 91 (1984).
- [8] G. V. Born, M. A. Kratzer, *J Physiol.* **354**, 419 (1984).
- [9] B. B. Fredholm, P. Hedqvist, K. Lindstrom, M. Wennmalm, *Acta Physiol Scand.* **116**, 285 (1982).
- [10] M. W. Gorman, E. O. Feigl, C. W. Buffington, *Clinical Chemistry* **53**(2), 318 (2007).
- [11] Н. Ю. Филлипова, Н. Н. Угарова, *Биохимия* **44**(10), 1899 (1979).
- [12] Н. Н. Угарова, Л. Ю. Бровко, Г. Д. Кутузова, *Биохимия* **53**(9), 1351 (1993).

- [13] Ф. И. Атауллаханов, В. М. Витвицкий, А. М. Жаботинский и др., Известия Академии наук СССР, сер. Биологическая **6**, 813 (1989).
- [14] J. W. Longworth, R. O. Rahn, R. G. Shulman, Journal of Chemical Physics **45**(5), 2930 (1966).
- [15] E. P. Gibson, J. H. Turnbull, Journal of Photochemistry **11**, 313 (1979).

Поступила в редакцию 10 июля 2013 г.