

ПОЯВЛЕНИЕ ПОЛОСЫ 633 НМ В СПЕКТРЕ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛОПНУВШИХ ЭРИТРОЦИТОВ

С.Д. Захаров, Ю.В. Звиневич, В.М. Чудновский

В спектре люминесценции суспензии эритроцитов при клеточных повреждениях возникает свечение в полосе 633 нм, отождествленное с переходом протопорфирина-IX с первого синглетного уровня в основное состояние. Поглощение фотонов в этой полосе, а также в полосе Core может рассматриваться в качестве возможных первичных актов биологического действия He-Ne и He-Cd лазеров.

Эксперименты с живыми клетками стремятся обычно выполнять в условиях, максимально приближенных к стационарным. Однако в многоклеточном организме происходят не только плавные, но и резкие, катастрофического характера изменения (клеточное деление, формообразование, разрушение старых эритроцитов и т.д.), и они необходимы для поддержания нормального состояния живой системы. Скачкообразные изменения характерны и для многих физических процессов /1/. В переходных режимах функционирования клеток может сильно отличаться от стационарного: реакции могут протекать по путям, не реализующимся в фазе покоя, могут образовываться необычные продукты, в том числе неустойчивые, и т.д. Следует ожидать, что если в этих условиях на клетки начнет воздействовать внешняя сила, их реакция будет иной, нежели обычно — и по степени чувствительности к воздействию, и по характеру ответа. Причиной возникновения внешней силы в ряде случаев может быть световое воздействие. При этом изменения в фотобиохимических процессах будут тем более существенными, чем более многочисленными и активными в фотодинамическом отношении окажутся молекулы-хромофоры, продуцируемые клетками в неустойчивых или переходных состояниях.

Учет этого обстоятельства позволяет по-новому подойти к проблеме выяснения механизмов действия на живые системы низкоинтенсивного лазерного излучения. Хотя к настоящему времени биологическая активность излучения чаще всего используемых He-Ne (633 нм) и He-Cd (417 нм) лазеров установлена, молекулярные мишени для соответствующих фотонов не найдены /2/. Возможно, причина затруднений частично связана с недостаточным учетом при постановке опытов принципиальной роли нестационарных клеточных процессов.

Удобным и часто используемым объектом для изучения лазерных биоэффектов являются эритроциты /3/. В данной работе сообщается о поиске с помощью люминесцентных методов естественных хромофоров, которые могли бы генерироваться эритроцитами при действии на эти клетки резких осмотических нагрузок, приводящих к их набуханию и разрыву (гемолизу) /4/. Некоторое указание на вероятную наработку в эритроцитах хромофоров порфиринового ряда при сильных внешних возмущениях можно получить из анализа спектрофотометрических изменений, происходящих в суспензии эритроцитов после ее облучения УФ светом (появление полосы поглощения 630 нм) /5/.

Эксперименты выполнялись на свежеприготовленной суспензии эритроцитов человека, помещенной в стандартную кварцевую кювету $1 \times 1 \times 3$ см. Возбуждение люминесценции осуществлялось с помощью азотного лазера ЛГИ-21 ($\lambda = 337$ нм), работающего в импульсно-периодическом режиме ($\tau_p = 10$ нс). Луч лазера заводился в кювету сверху через открытую ее часть, чтобы избежать фоновой засветки. Люминесценция регистрировалась сбоку, под углом 90° к возбуждающему пучку через монохроматор УМ-2 с помощью ФЭУ-69 и спектроанализатора NT-1024. На рис. 1 приведены спектры люминесценции эритроцитов в обычной среде их обитания (плазме крови), при значениях объемной доли клеток ρ , различающихся вдвое. Спектр представляет собой широкую и малоинтенсивную "голубую" полосу, за которую отвечает, вероятно, люминесценция белковых макромолекул, прежде всего их триптофановых и тирозиновых остатков и NAD · H. Люминесценция в области 630 нм отсутствует. Причиной наблюдаемых на рис. 1 дополнительных пиков вблизи $\lambda = 562$ и 597 нм, по-видимому, является избирательная реабсорбция излучения пигментом эритроцитов — гемоглобином (Hb). Об этом свидетельствует совпадение соседних с этими пика-

ми "провалов" при 545 и 579 нм с положением относительных максимумов в спектре поглощения Hb /6/. Этот вывод подтверждается также тем, что при росте ρ интенсивность свечения внутри "провалов" падает (рис. 1). Видно также, что синяя часть спектра, где Hb поглощает сильнее /6/, ослабляется существенней.

На рис. 2 показаны типичные спектры люминесценции, наблюдаемой после осмотического разрушения клеток, вызванного добавлением к клеточной суспензии дистиллированной воды. Характерной особенностью этих спектров является сильное свечение в "красной" полосе с максимумом при 633 нм. При разрыве набухших эритроцитов их содержимое, в том числе и основная часть Hb, выходит в раствор /4/. В случае, если затем из раствора не удаляются остатки клеточных мембран (так называемых теней), в спектре присутствует прежняя "голубая" полоса (рис. 2, кривая 1). В очищенном от "теней" гемолизате остается лишь красное свечение (рис. 2, кривая 2). Поскольку в кювете присутствует Hb, сохраняется влияние реабсорбции излучения с тем же положением пиков 562 и 597 нм, что и на рис. 1. Дополнительное свидетельство в пользу реабсорбционного механизма возникновения пиков можно получить, продемонстрировав их одинаковое происхождение, например, сравнив соответствующие времена люминесценции τ . В случае единого происхождения значения τ должны быть близкими.

Проведены измерения τ в районе указанных пиков с помощью лазерного спектрофлуориметра с субнаносекундным временным разрешением. Измеренные для одного образца крови значения $\tau = 12,4$ нс на $\lambda = 562$ нм и $\tau = 18,5$ нс на $\lambda = 597$ нм действительно отличаются незначительно, что подтверждает гипотезу о реабсорбции излучения.

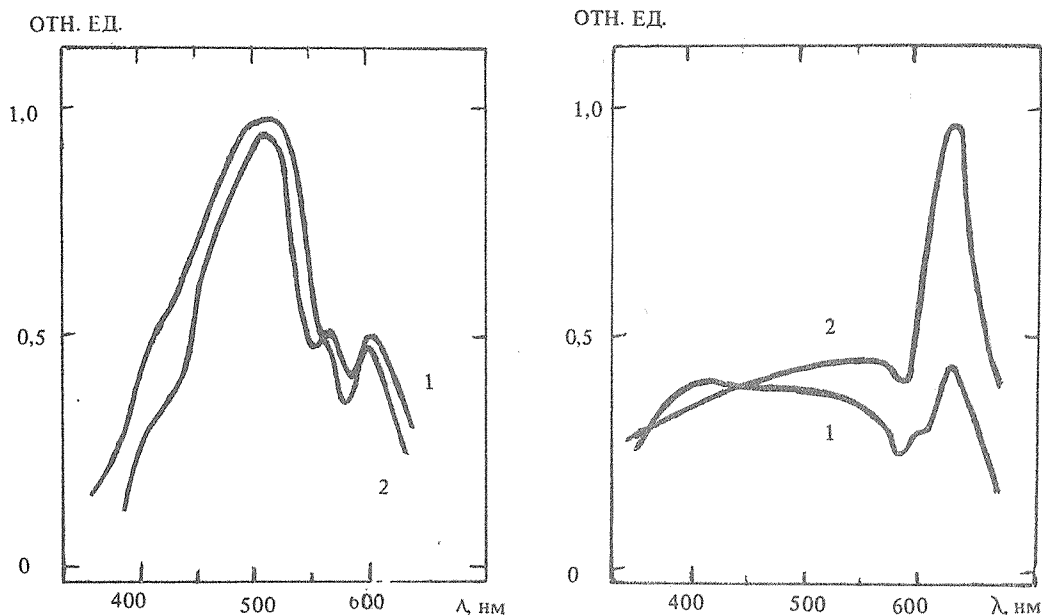


Рис. 1. Спектр люминесценции неразрушенных эритроцитов при возбуждении излучением $\lambda = 337$ нм. Объемная доля клеток в суспензии $\rho = 2\%$ (1); 4% (2).

Рис. 2. Спектр люминесценции, наблюдаемый после разрушения клеток. Исходное значение $\rho = 2\%$; 1 – при наличии в растворе остатков мембран; 2 – мембраны удалены центрифугированием.

После сравнения полученного спектра (рис. 2) с люминесцентными спектрами порфиринов /6/ наблюдаемая полоса 633 нм отождествлена с 0-0 переходом протопорфирина - IX (PP-LX) с первого возбужденного синглетного уровня в основное состояние. Появление такой люминесценции в суспензиях эритроцитов ранее в литературе, по-видимому, не отмечалось. Однако при одном из редких генетических дефектов отмечено значительное накопление PP-IX в эритроцитах соответствующих индивидуумов /8/.

Заметим также, что полоса Сорэ для РР-IX имеет максимум вблизи 404 нм [7]. Положения этой полосы, а также перехода $S_0, v'_0 \rightarrow S_1, v''_0$, легко возбуждаемого при поглощении, хорошо совпадают с длинами волн соответственно He-Cd и He-Ne лазеров, что приводит к необходимости включить РР-IX в круг потенциальных первичных мишеней для фотонов в наблюдавшихся ранее лазерных биоэффектах [2].

Концентрацию N молекул РР-IX оценим из соотношения $\delta\tau = \lambda^2/8\pi n^2 \Delta\nu$. Здесь $\delta = \Delta k/N$ — сечение поглощения в максимуме полосы, Δk — изменение коэффициента поглощения на той же частоте, $\Delta\nu$ — ширина полосы поглощения, n — показатель преломления. Предполагается, что время жизни возбужденного уровня обусловлено только изучательным переходом. Оценивая $\Delta k = 0,1 \text{ см}^{-1}$ из [5] и взяв экспериментальные значения $\lambda = 633 \text{ нм}$, $\tau = 1,5 \cdot 10^{-8} \text{ с}$, $\Delta\nu = 3 \cdot 10^{13} \text{ с}^{-1}$, $n = 1,4$ получим $N = 6 \cdot 10^{14} \text{ см}^{-3}$ клеток, то есть $6 \cdot 10^4$ молекул на клетку или $1,5 \cdot 10^4$ от внутриклеточной концентрации Hb. Тогда при плотности потока 10^2 Вт/см^2 и времени облучения $T = 5 \text{ мин}$ в клетке произойдет $\delta N \Phi VT = 10^7$ актов возбуждения (V — объем клетки, Φ — плотность потока фотонов). Принимая вероятность безызлучательного перехода 10^{-2} и квантовый выход "биоповреждений" 10^{-2} , получим 10^4 актов молекулярного воздействия на клетку, что достаточно для проявления клеточной реакции, если события происходят на мембране.

Эффект РР-IX на клетку может иметь как прямой, так и сенсibilизированный характер. Пока не ясно каким путем и в каком количестве этот порфирин может запасаться или продуцироваться в зрелом эритроците в естественных условиях. Механизм возникновения РР-IX при осмотическом гемолизе также не исследовался. Тем не менее, можно высказать некоторые предположения.

1. Источником РР-IX является Hb. Возможно, в трансформации к РР-IX участвуют преимущественно те молекулы Hb, которые адсорбированы на внутренней стороне мембраны. В момент осмотического разрыва внутриклеточные структуры испытывают своеобразный гидрохимический удар, инициирующий многоступенчатый процесс, в результате которого: а) в макромолекуле Hb глобин отрывается от гема, б) из гема выходит ион железа и адсорбируется на мембране, в) тетрапиррольное кольцо (РР-IX) выделяется в раствор.

2. РР-IX в исходном состоянии адсорбирован на мембране в комплексе с тушителем люминесценции; при гемолизе этот комплекс разваливается.

3. РР-IX — часть эритроцитарного цитохрома b_5 , разрушенного в результате гемолиза.

Дальнейшие подробности и биологические аспекты работы предполагается опубликовать в специализированных изданиях.

Авторы благодарны Р.В. Амбарцумяну, А.В. Воробью, Б.М. Джагарову, Ю.П. Тимофееву, Е.А. Черницкому за обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г и л м о р Р. Прикладная теория катастроф. М., Мир, 1984.
2. К р ю к А.С. и др. Терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения. Минск, Наука и техника, 1986.
3. А м б а р ц у м я н Р.В. и др. Краткие сообщения по физике ФИАН, № 10, 35 (1987).
4. R o n d e r E. Hemolysis and related phenomena. New York, Grune and Stratton, 1946.
5. Т и м о ф е е в К.В. и др. ДАН СССР, 255, 751 (1980).
6. B a r e r R. Science, 121, 709 (1955).
7. The Porphyrins. v. III (ed. Dolphin D.). New York, Academic Press, 1978.
8. L a m o l a A., Y a m a n e T., T r o z z o l o A. Science, 179, 1131 (1973).

Поступила в редакцию 20 апреля 1988 г.