

Мембранные механизмы влияния летучих органических соединений на функции обонятельного анализатора *in vitro* и *in vivo*

БЕВЗЮК Д.А.

к.б.н., с.н.с. лаборатории нейрофизиологии и иммунологии Института неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины, Харьков

ПОСОХОВ Е.А.

к.х.н., с.н.с. Института химии Национального университета им. В. Н. Каразина, Харьков

*В эксперименте *in vitro* и *in vivo* с использованием оригинальных флуоресцентных зондов показана специфичность рецепторов мембран как *in vitro*, так и мембран различных эмоциогенных структур мозга при длительном воздействии летучих органических соединений (ЛОС): ацетона (полярного) и уайт-спирита (неполярного). При этом наиболее реактивными оказались периферические обонятельные рецепторы и медиальная обонятельная область, а также миндалевидный комплекс, гиппокамп, структурно-молекулярные компоненты тканей которых (билипидный слой и белки) способны связываться с ЛОС.*

Введение

Известно, что механизм возникновения и развития многих патологических состояний связан с нарушением структуры и свойств биологических мембран [1, 4, 5, 6, 7]. Большинство биологически активных соединений (как эндогенного, так и экзогенного происхождения) или прямо действуют на мембраны клеток, или проникают через мембраны для того, чтобы достичь своих «мишеней» внутри клеток. В обоих случаях стадия взаимодействия такого соединения с мембраной — одна из важнейших звеньев в молекулярном механизме его действия.

Исходя из этого, мы предполагаем, что в основе начального этапа формирования патологического влечения к ЛОС лежат механизмы действия последних как на мембраны рецепторных клеток слизистого эпителия, так и на самые рецепторы этих клеток. Особый интерес представляет метод флуоресцентных зондов, в основе которого лежит способность последних изменять свои флуоресцентные характеристики при переходе с одного микроокружения в другое. Поэтому на основе изменений интенсивности флуоресценции зонда на определенной длине волны можно судить об изменениях, которые происходят в таких характеристиках билипидного слоя мембран, как вязкость и полярность, а также о взаимоотношениях белок — рецептор — липид [1].

Целью исследования стало изучение влияния ЛОС: ацетона полярного и уайт-спирита неполярного на физико-химические свойства биологических мембран *in vitro* и *in vivo* с помощью ряда флуоресцентных зондов: ортогидроксипроизводных 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола.

Материалы и методы

Выбор названных соединений как флуоресцентных зондов был обусловлен тем, что их флуоресцентные характеристики зависят от полярности и вязкости окружающей их среды (микросреды) [2, 3].

В первой серии экспериментов *in vitro* растворы модельных мембран подвергались влиянию насыщенных паров ацетона и уайт-спирита на протяжении одного часа.

Измерение спектров флуоресценции производилось на спектрофлуориметре Hitachi F 4010 через час после прибавления зондов к пробам.

Во второй серии исследований были изучены *in vivo* эффекты влияний ацетона и уайт-спирита на билипид-

ный пласт мембран клеточных элементов периферического рецепторного звена медиальной обонятельной области, миндалевидного комплекса, гипоталамуса, гиппокампа и периформной коры мозга крыс. Изучено влияние ингаляций полярных и неполярных ЛОС на клеточные мембраны разных эмоциогенных структур мозга у нелинейных лабораторных крыс-самцов в остром (8 крыс) и хроническом (12 крыс) экспериментах. Контрольную группу составили 5 интактных крыс.

Предварительно на протяжении одного часа колбы емкостью 0,5 л насыщали парами этих растворителей: ацетоном (1-я колба) и уайт-спиритом (2-я колба), а потом в остром эксперименте крыс помещали на 10 мин в одну из этих колб (1-я группа — ацетон, 2-я группа — уайт-спирит). В хроническом эксперименте животных ингалировали на протяжении 60 дней по 10 мин каждый день.

Флуоресцентные зонды отвечали целиком по своему составу флуоресцентным зондам, использованным нами в исследованиях *in vitro*. Флуоресцентные измерения проводили через один час после введения зондов в мембранные суспензии тканей разных структур мозга.

Результаты и обсуждение

При интерпретации полученных результатов целесообразно привести уже существующую схему предвиденной локализации данных зондов в билипидном слое мембраны, которая разработана рядом авторов [6] (рис. 1).

Предположение о локализации зондов в мембране было сделано на основе результатов флуоресцентных измерений и структурного сходства с зондами, локализация которых уже известна [1, 6, 7]. Положение полос флуоресценции зонда D7 отвечает полярности среды, равной полярности ацетонитрила [6].

Маленькая интенсивность коротковолновой полосы флуоресценции нормальной формы зонда в случае соединений D1, 010, 060, PH7 свидетельствует о локализации этих зондов в апротонной среде. Форма полосы флуоресценции соединения PH1 свидетельствует о маленькой полярности среды в зоне ее локализации [6]. Кроме того, соединение D7 имеет структурное сходство с ДМХ (диметиламинохалкон), а соединения PH1 и PH7 — с фенантроном [1, 6]. С учетом вышесказанного приведена локализация зондов в мембране (вдоль молекул фосфолипидов), представленная на рис. 1. Результаты флуоресцентных измерений представлены в табл. 1.

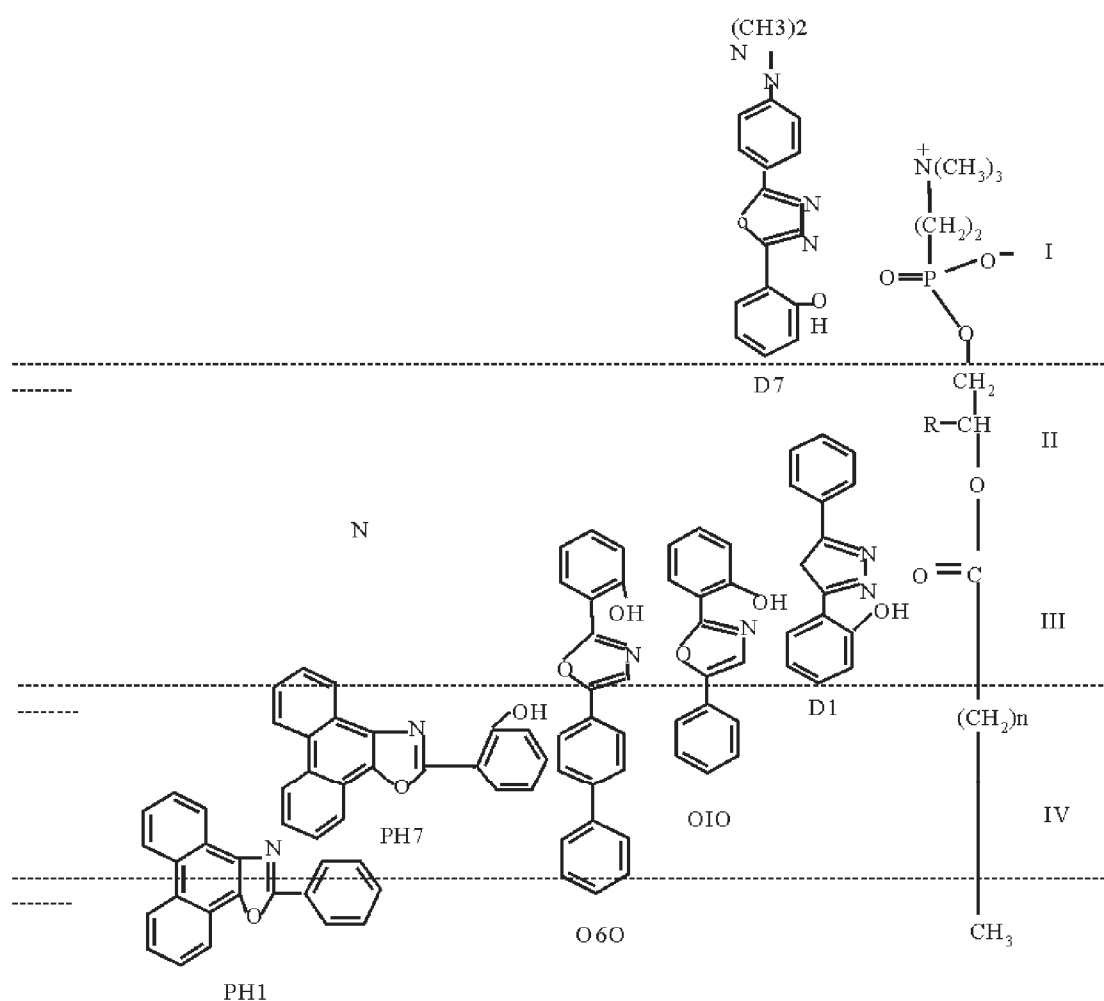


Рис. 1. Схема локализации зондов в билипидном слое модельных мембранных везикул [6]: D7 – 2-фенил-(4'-диметиламин-2' - OH)-1, 3, 4 оксадиазол; D1 – 2 – 2'-OH-5 фенил 1,3,4 оксадиазол; O10 – 2-(2'-OH-фенил)-5-фенил 1,3 оксазол; O60 – 2-(2'-OH-фенил)-5-дифенилокса-зол; PH7 – 2-(2'-OH-фенил)-4,5 (9,10 фенантро) 1,3 оксазол; PH1 – 2-2 фенил-4,5 (9,10- фенантро) оксадиазол. I – зона полярных головок фосфолипидов мембраны; II – зона глицериновых остатков фосфолипидов мембраны; III – зона жирно-кислотных цепочек фосфолипидов мембраны; IV – зона конечных метильных групп фосфолипидов мембраны

Таблица 1

Флуоресцентные характеристики исследованных зондов в суспензии модельных мембран, подверженных влиянию ацетона и уайт-спирита

Зонд	Длина волны, нм	Интенсивность флуоресценции		
		Контроль	Ацетон	Уайт-спирит
D7	435,0	154,4	148,7	154,5
D1	500,0	69,2	67,4	65,5
O10	410,0	44,3	155,2	42,2
	490,0	1890,4	1834,7	1925,1
O60	490,0	879,0	882,5	928,7
PH7	390,0	51,8	52,2	52,7
	500,0	436,4	421,1	421,0
PH1	385,0	2389,7	2366,8	2354,8

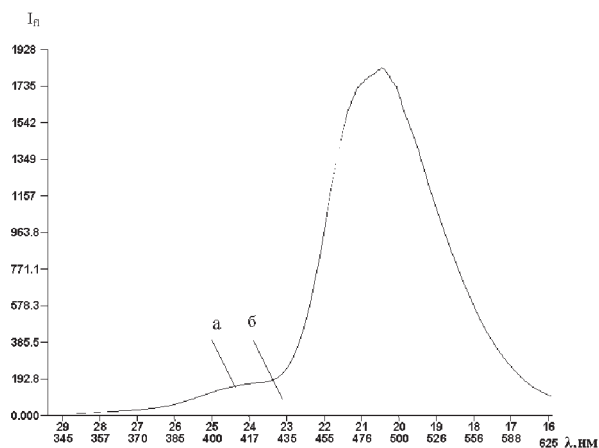


Рис. 2. Спектры флуоресценции зонда 010 в суспензиях-растворах липидных везикул, подвергнутых влиянию паров ацетона: по оси абсцисс: — длина волны; по оси ординат: I_p — интенсивность флуоресценции зонда; а — ацетон; б — контроль.

Соединение D7 локализуется в зоне полярных головок — остатков ортофосфорной кислоты; D1, D7, 010 и 060 — в зоне глицириновых остатков; D1, 010, 060, PH1 и PH7 — в зоне жирнокислотных цепей; PH1 и PH7 — в области конечных метильных групп.

Исходя из этого, было выдвинуто предположение, что некоторые из данных соединений могут быть использованы как зонды при исследовании биологических мембран.

Как видно из табл. 1, в случае влияния уайт-спирита интенсивность флуоресценции всех зондов не изменялась в сравнении с контролем. При влиянии ацетона интенсивность флуоресценции зондов D7, D1, 060, PH1 также не изменялась (в сравнении с контролем). Тем не менее, в случае зонда 010 под влиянием ацетона наблюдалось значительное возрастание интенсивности полосы флуоресценции при длине волны 410 нм (см. табл. 3.1, рис. 3.2), в то время как интенсивность другой полосы флуоресценции зонда 010 при длине волны 490 нм оставалась неизменной в сравнении с контролем. Полоса флуоресценции в области длины волны 410 нм относится к излучению исходной формы, а полоса флуоресценции в области длины волны 490 нм — к излучению фотоаутомера [7] (рис. 2).

Возрастание интенсивности флуоресценции исходной формы свидетельствует об увеличении полярности и способности среды в области локализации зонда 010 в мембране к связыванию водорода.

Такой подъем полярности и способность связывать водород среды в области локализации зонда 010, очевидно, есть следствие накопления ацетона в этой области (зона глицириновых остатков фосфолипида) (рис. 3).

Увеличение интенсивности флуоресценции исходной формы (максимальная длина волны 410 нм) зонда 010 в присутствия ацетона, может быть обусловлено двумя факторами:

а) некоторые молекулы исходной формы в присутствии ацетона становятся неспособными к протеканию реакции ВМФПП вследствие образования межмолекулярных водородных связей с молекулами ацетона:

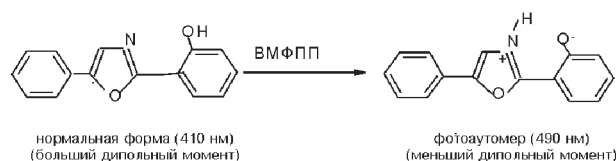
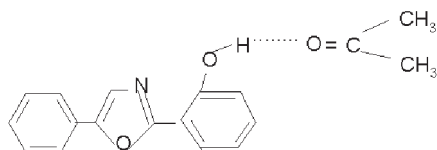


Рис. 3. Реакция внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) в случае зонда 010

б) накопление ацетона приводит к увеличению полярности среды в области локализации зонда 010, которое, в свою очередь, способствует возрастанию стабилизации более полярной, исходной формы в сравнении с фотоаутомерной.

Это становится причиной уменьшения скорости ВМФПП и повышения интенсивности флуоресценции исходной формы зонда — $I_{fln} > I_{flft}$.

Таким образом, зонд 010 является чувствительным к изменениям, которые происходят в модельных мембранах в результате влияния ацетона. Установлено, что при влиянии на модельные мембраны ацетона происходит его накопление в мембране в области глицириновых остатков фосфолипида. При действии уайт-спирита билипидный слой мембраны ареактивен, что свидетельствует о разной чувствительности этих компонентов мембраны к ЛОС.

Как показали результаты исследований острой интоксикации животных ЛОС, интенсивность флуоресценции зонда 010 при 410 и 490 нм возрастает во всех исследуемых тканевых структурах мозга и особенно в обонятельной луковице при ингаляции животных ацетоном и уайт-спиритом в сравнении с контролем. Это значит, что число мест связывания флуоресцентного зонда с мембранами клеток тканей мозга увеличивается (I_{fl} контроль — 12 у.е. при $\lambda = 410$ нм и 120 у.е., при $\lambda = 490$ нм; опыт — 12 у.е. при $\lambda = 410$ нм и 210 у.е. при $\lambda = 490$ нм) и менее — парами уайт-спирита (I_{fl} контроль — 12 у.е. при $\lambda = 410$ нм и 150 у.е., при $\lambda = 490$ нм; опыт — 15 у.е., $\lambda = 410$ и 190 у.е., при $\lambda = 490$ нм).

Интенсивность флуоресценции зонда 060 при длинах волн 410 и 490 нм еще более повышается, т.е. происходит активация связывания флуоресцентного зонда с более глубоким уровнем мембран тканей мозга. При этом она наиболее выражена при ингаляции животных насыщенными парами ацетона. Особенно это выражено в тканях обонятельной луковицы (I_{fl} контроль — 12 у.е. при $\lambda = 410$ нм и 70 у.е., при $\lambda = 490$ нм опыт — 18 у.е., $\lambda = 410$ нм и 110 у.е., при $\lambda = 490$ нм) и менее — парами уайт-спирита (I_{fl} контроль — 12 у.е. при $\lambda = 410$ нм и 70 у.е., при $\lambda = 490$ нм опыт — 13 у.е., $\lambda = 410$ и 65 у.е., при $\lambda = 490$ нм).

При хронической ингаляции насыщенными парами полярного (ацетон) и неполярного (уайт-спирит) ЛОС также повышается интенсивность флуоресценции зонда 010 при длинах волн 410 и 490 нм, но достоверно это повышение выражается при насыщении парами ацетона тканей также обонятельной луковицы и менее — парами уайт-спирита. Интенсивность флуоресценции зонда 060 при длинах волн 410 и 490 нм также выше для тканей обонятельной луковицы, чем для других исследуемых тканей мозга.

Наибольшая интенсивность флуоресценции была отмечена при зонде PH7, что локализуется в области конеч-

ных метильных групп. Этот зонд оказался наиболее чувствительным к изменениям, которые происходили в тканях обонятельной луковицы и особенно миндалевидном комплексе при ацетоновой интоксикации, и менее — парами уайт-спирита. Следует отметить, что связывание флуоресцентного зонда 010 с белками (без липосом) незначительное при влиянии ацетона и уайт-спирита и недостоверно в сравнении с контролем (вода). Остается неясным, почему белок мембраны тканей мозга слабо связывается с этим флуоресцентным зондом как при полярном, так и неполярном ЛОС. Однако в сравнении с зондом 010 и 060, зонд PH7 был наиболее показательным для тканей миндалевидного комплекса.

Заключение

Анализ результатов исследований особенностей связывания флуоресцентных зондов с тканями эмоциональных структур мозга позволяет заключить следующее.

Наиболее реактивными на воздействие насыщенных паров являются периферические обонятельные рецепторы и медиальная обонятельная область, ткани которых (билипидный слой и белки) связываются с ЛОС, о чем свидетельствует повышение флуоресценции при использовании разных флуоресцентных зондов. Затем, как показывает связывание флуоресцентных зондов с липидами и белками мембран, включается миндалевидный комплекс, позднее — гиппокамп; незначительное и менее интенсивное связывание происходит с насыщенными парами ацетона и уайт-спирита тканей гипоталамуса и периформной коры. Таким образом, можно допустить, что нейрогенные механизмы формирования влечения к ЛОС опосредованы

через мембранные рецепторные аппараты обонятельного анализатора различной специфичности: как периферические, так и центральные.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М.: Наука, 1980. — 320 с.
2. Дорошенко А.О., Посохов Е.А., Шершуков В.М., Митина В.Г., Пономарев О.А. Реакция внутримолекулярного переноса протона в возбужденном состоянии в ряду орто-гидроксипроизводных 2,5-диариллоксазола // Химия высоких энергий. — 1997. — Т. 31, № 6. — С. 395–402.
3. Дорошенко А.О., Посохов Е.А. Реакция фотопереноса протона в ряду орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил 1,3,4-оксадиазола в полистерольных пленках // Теоретическая и экспериментальная химия. — 1999. — Т. 35, № 6. — С. 357–361.
4. Люминесцентный анализ в медицине и биологии и его аппаратное обеспечение (часть 1) // Тезисы докладов Всесоюзного совещания. — Рига, 20–23 декабря, 1981.
5. Люминесцентный анализ в медицине и биологии и его аппаратное обеспечение (часть 2) // Тезисы докладов Всесоюзного совещания. — Рига, 20–23 декабря, 1981.
6. Посохов Е.А., Абманова Н.А., Бойко Т.П., Дорошенко А.О. Ортогидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для медико-биологических исследований // Вестник Харьковского университета. — 1999. — Вып. 4 (27), № 454. — С. 188–189.
7. Посохов Е.А., Бойко Т.П., Бевзюк Д.А. Орто-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований модельных биомембран // Вестник Харьковского национального университета. — 2001. — Вып. 7(30), № 532. — С. 192–194.

INFLUENCE OF FLYING ORGANIC COMPOUNDS ON FUNCTIONAL OLFACTORY ANALYSIS IN VITRO AND IN VIVO (MECHANISM OF MEMBRANES)

BEVZIUK D.A. cand.biol.sci., senior research worker of Laboratory of Neurophysiology and Immunology of Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of AMS of Ukraine
 POSOKHOV E.A. cand.chem.sci., senior research worker of Institute of Chemistry, National University named after V. N. Karazin

The possibility to use ortho-hydroxy 2,5-diphenyl-1,3-oxazole and 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole as fluorescent probes for detecting changes of biomembrane physico-chemical properties under the action of volatile organic solvent has been studied. It has been shown, on the basis of spectrophotoluminescent measurements, that changes in membranes of cells (in vitro and in vivo) have been observed. It has been shown, that cells of periphery olfactory tract and central olfactory tract have specific sensibility to acetone and white-spirit.