

Роль гетерогенности состава липидного бислоя во взаимодействии с ним криопротекторов

Т.С. Дюбко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Сохранение структурной и функциональной полноценности клеточных мембран в процессе криоконсервирования обеспечивают с помощью введения в консервирующую среду криопротекторов (КП), удачный выбор которых во многом определяет исход криоконсервирования. Ряд экспериментальных исследований показывает, что КП, адсорбируясь на мембранах, могут взаимодействовать с их заряженными группами, изменяя поверхностный потенциал [9], модифицировать липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, понижая, сглаживая либо устраняя фазовые переходы в бислое [6]. Существенное влияние на взаимодействие КП с липидным бислоем оказывают физико-химические свойства липидной фазы и присутствие в бислое холестерина [8]. В то же время влияние гетерогенности состава липидного бислоя мембран на эффективность взаимодействия с ними КП в настоящее время исследовано недостаточно.

Высокую чувствительность к параметрам окружения показал синтезированный недавно флуоресцентный зонд ФМЕ (рис. 1), относящийся к классу 3-гидроксифлавонов и локализующийся в области фосфатных и начале глицерольных остатков липидов. Это обеспечивает его высокую чувствительность к начальным изменениям структуры неполярной зоны бислоя. При электронном возбуждении в определенных условиях 3-гидроксифлавонолы изомеризуются, образуя нормальную (N^*) и таутомерную (T^*) формы, положение и интенсивность эмиссии которых зависят от полярности и вязкости окружения, а также от способности зонда образовывать межмолекулярные водородные связи [12].

Целью работы явилось исследование влияния низкомолекулярных криопротекторов глицерина (ГЛ) и диметилформамида (ДМФ) на искусственные и природные мембраны, отличающиеся по составу, с помощью флуоресцентного зонда ФМЕ.

Материалы и методы

Суммарные липиды экстрагировали по модифицированной методике Блайя и Дайэра [4] из сперматозоидов, полученных из 5-ти объединенных эякулятов собаки (СЛСС) и 15-ти объединен-

ных эякулятов петуха (СЛСП). Однослойные липосомы готовили из предварительно растворенных в спирте 10 %-ных растворов яичного фосфатидилхолина (ФХ-липосомы), а также СЛСС и СЛСП инъекционным методом с последующим диализом против физиологического раствора с 5 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7,4 [3]. Концентрация липидов в опытах составляла 4,7-5 мг/мл. Микросомы с содержанием белка 0,75 мг/мл получали из печени 3-х крыс методом дифференциального центрифугирования [1] и ресуспендировали в 50 мМ трис-буфере, рН 7,4. Эксперименты проведены в соответствии с "Общими принципами экспериментов на животных", одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

ФМЕ (3-гидрокси-4'- $(N,N$ -диметиламино) флаво) был любезно предоставлен В.Г. Пивоваренко (КНУ им. Т.Г.Шевченко). Зонд добавляли в суспензии мембран в виде спиртового раствора до конечной концентрации 5×10^{-6} М. ГЛ и ДМФ ("Sigma", США) перед использованием дополнительно очищали [2]. Спектры флуоресценции (СФ) ФМЕ возбуждали при 405 нм и регистрировали в области 425-700 нм на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США). Все измерения выполняли при 20°C. Положение максимумов N^* -полос флуоресценции ФМЕ уточняли из вторых производных спектров флуоресценции (2ПСФ).

Результаты и обсуждение

Сравнение СФ ФМЕ в водных растворах КП и в мембранах показало, что многополосная флуоресценция наблюдается только для молекул зонда, связанного с мембранами (рис. 2), то есть этот зонд может быть использован для изучения влияния КП на структурное состояние искусственных и природных мембран. При связывании мембранами, наряду с многократным возрастанием интенсивности флуоресценции, наблюдается также изменение формы спектра ФМЕ, в которой в зависимости от состава бислоя проявляются либо две полосы (N^* и T^*), либо основная T^* -полоса и менее интенсивная N^* -полоса, часто присутствующая в спектрах в виде коротковолнового плеча (табл. 1), низкая величина эмиссии которой может быть обусловлена наличием в бислое интегральных белков либо холестерина [13].

Адрес для корреспонденции: Дюбко Т.С., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

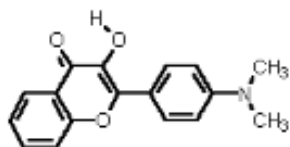


Рис. 1. Структурная формула ФМЕ.

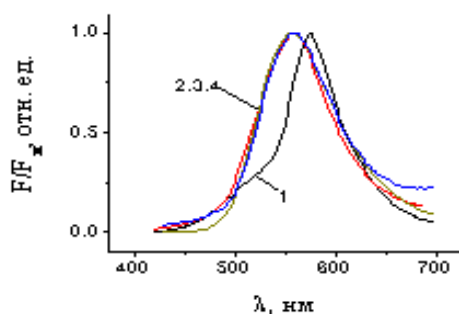


Рис. 2. Нормированные спектры флуоресценции зонда ФМЕ в микросомах (1) и 20%-ных водных растворах КП (2, 3, 4)

Влияние ГЛ и ДМФ на СФ ФМЕ в липидных и белок-липидных мембранах имеет одинаковую направленность и выражается в снижении интенсивности флуоресценции связанного с мембранами зонда. При этом ГЛ почти не оказывает влияния на форму спектров во всех исследованных типах мембран, тогда как ДМФ влияет на форму спектров ФМЕ, в различной степени изменяя интенсивность и положение N*– и T*–полос флуоресценции (рис. 3).

Наиболее удобным параметром, характеризующим изменения в состоянии липидного бислоя мембран, является отношение интенсивностей F_{N^*}/F_{T^*} , отражающее изменение вклада N*– и T*–полос флуоресценции зонда в его спектр эмиссии. Для каждого вида везикул это соотношение выбиралось в максимумах флуоресценции N*– и T*–полос (таблица). Рост отношения F_{N^*}/F_{T^*} свидетельствует об увеличении концентрации донора водородной связи (в данном случае молекул воды) в ближайшем окружении зонда [12].

С увеличением концентрации КП в среде инкубации везикул наблюдаются нелинейные изменения отношения интенсивностей полос F_{N^*}/F_{T^*} , направленность которых зависит от химической структуры используемых криозащитных веществ, их концентрации и состава мембран (рис. 4). Как видно из рис. 4, а, ГЛ оказывает слабо-выраженное влияние на отношение F_{N^*}/F_{T^*} во всех исследуемых типах мембран. Для ФХ-липосом, а также липосом из СЛСП и микросом до концентрации 12–13 % наблюдается даже тенденция к

Параметры спектров флуоресценции ФМЕ в липосомах с различным фосфолипидным составом и в микросомах из печени крыс

Объект	F_{N^*} , у.е.	F_{T^*} , у.е.	λ_{N^*} , нм	λ_{T^*} , нм	F_{N^*}/F_{T^*}
ФХ – липосомы	250±3	475±5	519±4	570±2	0,50±0,10
Липосомы из СЛСП	75±2	183±5	515±2	570±2	0,41±0,03
Липосомы из СЛСС	115±1	486±7	490±3	567±1	0,24±0,01
Микросомы	145±2	540±12	515±2	575±1	0,27±0,04

Примечание: отношение F_{N^*}/F_{T^*} определяли: для ФХ-липосом как F_{519}/F_{570} ; для липосом из СЛСП как F_{515}/F_{570} ; для липосом из СЛСС как F_{490}/F_{567} ; для микросом как F_{515}/F_{575} .

уменьшению отношения F_{N^*}/F_{T^*} , которое может быть интерпретировано как снижение полярности окружения зонда в результате сорбции ГЛ на поверхности мембран и частичного замещения молекулами КП слабосвязанной гидратной воды [7]. В то же время возрастание отношения F_{N^*}/F_{T^*} связано скорее не с нарушением поверхностной упаковки бислоя молекулами ГЛ, а с частичным перераспределением ФМЕ в растворитель в результате замещения молекулами ГЛ тех молекул зонда, которые расположены в области полярных головок фосфолипидов.

Об увеличении концентрации донора водородной связи свидетельствует также сближение положения N*– и T*–полос флуоресценции ФМЕ с ростом концентрации КП, слабо выраженное в присутствии ГЛ и хорошо заметное в спектрах в присутствии ДМФ. Спектры флуоресценции ФМЕ при этом теряют свою многополосную структуру и приближаются по виду к спектрам флуоресценции зонда в водных растворах КП. Учитывая сравнительно высокую гидрофобность молекулы ДМФ (коэффициент его распределения в системе вода/октанол равен 0,233, в сравнении с ГЛ, для которого эта величина равна 0,005 [5]), можно ожидать, что гидрофобный зонд ФМЕ будет проявлять высокую чувствительность в первую очередь к мембранотропному действию КП, влияющих на упаковку липидов в начале неполярной области бислоя. Поскольку ДМФ оказывает наибольшее влияние на снижение квантового выхода флуоресценции ФМЕ, можно предположить, что имеет место конкуренция между молекулами ДМФ и ФМЕ за места связывания на липидном бислое.

Как видно из рис. 4, б, ДМФ наиболее эффективно влияет на параметр F_{N^*}/F_{T^*} ФМЕ, находящегося в мембранах липосом, сформированных из СЛСП, в которых общее содержание “нейтральных” и “кислых” фосфолипидов составляет 52,7 и

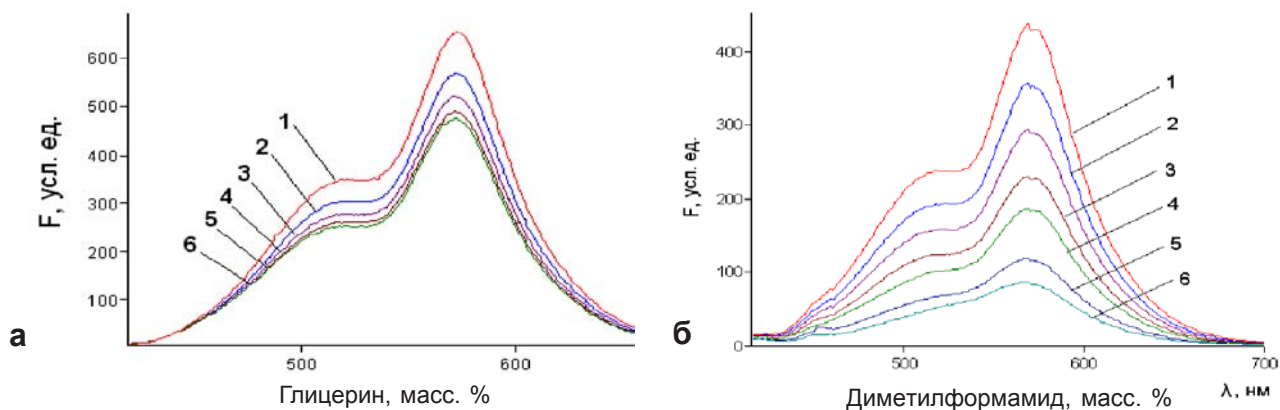


Рис. 3. Титрование ФМЕ, находящегося в ФХ-липосомах, возрастающими концентрациями ГЛ (а) и ДМФ (б): 1 – 0 масс. %, 2 – 5 масс. %; 3 – 7,5 масс. %; 4 – 10 масс. %; 5 – 15 масс. %, 6 – 17,5 масс. %.

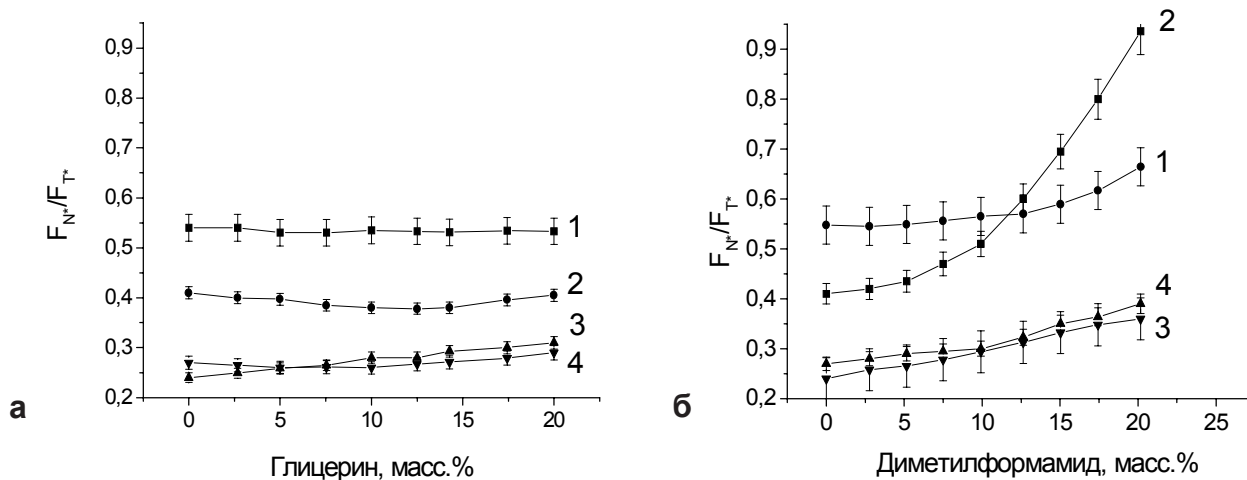


Рис. 4. Влияние ГЛ (а) и ДМФ (б) на соотношение интенсивностей N^* - и T^* -полос СФ ФМЕ в мембранах: 1 – ФХ-липосомы; 2 – липосомы из СЛСП; 3 – липосомы из СЛСС; 4 – микросомы

25,9 % соответственно [11]. При этом, резкие изменения параметра F_{N^*}/F_{T^*} наблюдаются в области концентраций ДМФ около 8 %. Мембраны ФХ-липосом, образованные из липида одного вида, проявляют большую устойчивость к действию ДМФ. В них отношение интенсивностей F_{N^*}/F_{T^*} флуоресценции ФМЕ изменяется при концентрациях ДМФ около 12–13 %. В то же время в липосомах сформированных из СЛСС, содержащих наряду с “нейтральными” (49,4 %) и “кислыми” (35,4 %) [11] липидами также значительную часть холестерина [10], в области исследованных концентраций ДМФ не обнаруживает сильного влияния на параметр F_{N^*}/F_{T^*} . В этом диапазоне концентраций ДМФ также не наблюдается резких изменений упаковки бислоя микросомальных мембран, основные фосфолипиды которых представлены нейтральными фосфолипидами, а суммарное содержание отрицательно заряженных липидов не превышает 20 % [1]. Хотя микросомальные мембраны являются гетерогенными по

липидному и белковому составу [1], можно предположить, что мембранные белки, располагающиеся на границе полярной и гидрофобной областей бислоя, могут препятствовать проникновению в бислой “гидрофобного” КП. Подобный эффект оказывает, по-видимому, и присутствие в липосомах из СЛСС холестерина, который может образовывать устойчивые комплексы с некоторыми видами фосфолипидов [13].

В целом полученные данные показывают, что среди факторов, оказывающих влияние на взаимодействие “гидрофобного” КП с биомембранами, важное значение имеют гетерогенность липидного состава бислоя, а также наличие в последнем холестерина и белков. Причем, если гетерогенность фосфолипидного состава может способствовать снижению устойчивости бислоя по отношению к действию КП, то присутствие холестерина и некоторых белков в мембранах может оказывать стабилизирующее влияние на бислой и смягчать мембранотропное действие КП.

Литература

1. *Арчаков А.И.* Микросомальное окисление.– М.: Наука, 1975.– С. 32.
2. *Вайсбергер А., Проскауэр Э., Роддик Д., Тупс Э.* Органические растворители. М.: Химия, 1968.– 1450 с.
3. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 277 с.
4. *Крепс Е.М.* Липиды клеточных мембран.– Л.: Наука, 1981.– С. 195-201.
5. *Линник Т.П.* Физико-химические факторы криповреждения и криозащиты сперматозоидов петухов в цикле низкотемпературного консервирования: Автореф. дис. ... докт. биол. наук.– Харьков, 2003.– 36 с.
6. *Моисеев В.А.* Молекулярные механизмы криповреждения и криозащиты белков и биологических мембран: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.– Харьков, 1984.– 48 с.
7. *Моисеев В.А., Зинченко В.Д., Нардид О.А.* О некоторых молекулярных механизмах криозащиты биологических объектов // Физико-химические процессы в криобиологических системах.– Харьков, 1991.– С. 78-92.