

Взаимодействие криопротекторов с модельными мембранами в условиях высокого содержания холестерина

UDC 57.043:577.352.335

T.S. DYUBKO

Interaction of Cryoprotectants with Model Membranes with High Cholesterol Content

С помощью флуоресцентного зонда 4-(N-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний-N-толуолсульфоната (ДСМ) исследовано взаимодействие криопротекторов (КП) различных классов (глицерина, этиленгликоля, диметилсульфоксида, N,N-диметилформамида, 1,2-пропандиола) с модельными мембранами, сформированными из яичного фосфатидилхолина (ФХ) и его смеси с холестерином. Установлено, что высокая концентрация холестерина (~45 мол. %) способствует возникновению в бислое участков связывания ДСМ с повышенной гидрофобностью. Выявлено, что эффективность взаимодействия КП с липосомами зависит от химической природы и концентрации КП и наиболее выражена в присутствии холестерина.

Ключевые слова: липосомы, холестерин, криопротекторы, флуоресценция, ДСМ.

За допомогою флуоресцентного зонда 4-(N-диметиламіностирил)-1-метилпіридиній-N-толуолсульфоната (ДСМ) досліджено взаємодію криопротекторів (КП) різних класів (гліцерину, етиленгліколю, диметилсульфоксиду, N,N-диметилформаміду, 1,2-пропандіолу) з модельними мембранами, сформованими з яєчного фосфатидилхоліну і його сумішшю з холестерином. Встановлено, що присутність високої концентрації холестерину (~45,4 мол. %) призводить до появи в бішарі ділянок зв'язування ДСМ з підвищеною гідрофобністю. Виявлено, що ефективність взаємодії КП з ліпосомами залежить від хімічної природи і концентрації КП і найбільш виражена в присутності холестерину.

Ключові слова: ліпосоми, холестерин, криопротектори, флуоресценція, ДСМ.

Using the fluorescent probe 4-(N-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium-N-toluene-sulfonate (DSM) the interaction of cryoprotectants (CPs) of different classes (glycerol, ethylene glycol, dimethylsulfoxide, N, N-dimethyl formamide, 1,2-propane diol) with model membranes formed of egg phosphatidylcholine (FC) and its mixture with cholesterol was studied. High concentration of cholesterol (~45 molar %) was found to promote the appearance of DSM bounding sites with increased hydrophobic properties. It was revealed, that CP influence on synthetic membranes with or without cholesterol was of similar nature, specified only by CP chemical structure and rising with their ability to build into lipid bilayer. It was established that the CP's interaction efficiency with liposomes depended on CP chemical nature and concentration and was more expressed in the cholesterol presence.

Key-words: liposomes, cholesterol, cryoprotectants, fluorescence, DSM.

Липидный состав биомембран влияет на их структурно-функциональные свойства и определяет устойчивость к внешним физико-химическим воздействиям, в том числе к понижению температуры, и сопутствующим факторам [9, 17], действию химических веществ и т. д. При этом важную роль играют не только индивидуальные особенности строения фосфолипидов (заряд, степень ненасыщенности, длина углеводородных цепочек), но и соотношение различных видов липидов в мембранах, а также присутствие холестерина [12], содержание которого в плазматических мембранах может достигать 50 мол. % [5]. В последние годы получены доказательства проявлений цитотоксического эффекта криопротекторов (КП) по отношению к биомембранам на этапе их инкубации с клетками перед замораживанием [14, 15]. Однако роль холестерина в проявлении цитотоксического эффекта КП мало исследована.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: tdyubko@mail.ru

Lipid composition of biological membranes influences their structure and function properties and determines the resistance to outer physical and chemical effects, including temperature increase [9, 17], action of chemical agents etc. Of great importance for this process are the individual peculiarities of phospholipid structure (charge, degree of unsaturation, carbon chain length), as well as the ratio of various membrane lipids, and also presence of cholesterol [12], which content in plasma membranes may reach 50 molar % [5]. Recently the evidence of cryoprotectant (CP) cytotoxic effect on biological membranes during cell exposure before freezing has been shown [14, 15]. However, the role of cholesterol in development of CP cytotoxic effect is virtually not investigated.

Cholesterol in biological membranes can cause the rise in phospholipid segregation [31]; an increase of lipid polar head hydration [19]; a decrease in content of acyl chain gauche conformation [32]; rise of lipid

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: tdyubko@mail.ru

Холестерин в биомембранах может индуцировать увеличение сегрегации фосфолипидов [31]; повышение гидратации полярных головок липидов [19]; снижение содержания гош-конформации ацильных цепей [32]; увеличение амплитуды движений липидов [28]; уплотнение латеральной упаковки углеводородных цепей (конденсирующий эффект) [24]. Однако перечисленные эффекты в значительной степени зависят от фосфолипидного состава мембран и соотношения холестерин/фосфолипиды [21]. Имеются данные, что присутствие в мембранах холестерина в умеренных концентрациях может сглаживать фазовые переходы липидов [11, 12], повышать их устойчивость к действию поверхностно-активных веществ [18], электрического тока [27]. В то же время способность холестерина к взаимодействию с определенными видами липидов [29, 33] индуцирует их латеральное разделение в биомембранах, которое особенно выражено при высоком содержании стероида, близкому к его предельной растворимости [22, 26], часто наблюдаемом в плазматических мембранах [23]. Подобные изменения могут быть причиной снижения устойчивости клеток к действию нефизиологических условий, внешних физико-химических факторов (охлаждения, замораживания, отогрева и др.), а также влиянию экзогенных химических веществ, к которым могут быть отнесены КП. Поэтому актуально выяснение роли гетерогенности липидного бислоя, индуцированной высоким содержанием холестерина, во взаимодействии с ним КП.

Одним из наиболее эффективных методов изучения структурного состояния мембран и оценки их гидрофобности является использование погруженных в бислой флуорофоров [10]. Этот метод позволяет исследовать особенности модификации структуры биологических мембран под влиянием различных физико-химических воздействий, в том числе и органических добавок [1, 6, 25]. В качестве флуоресцентного зонда был выбран ДСМ, который локализуется в полярной и на границе с гидрофобной областью бислоя [10]. Особенности химического строения ДСМ обуславливают его высокую чувствительность к полярности и подвижности микроокружения в мембранах.

Цель работы – исследование методом флуоресцентных зондов влияния представителей различных классов криозащитных веществ: диолов – этиленгликоля (ЭГ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД); амидов – N,N-диметилформамида (ДМФА); триолов – глицерина и сульфоксидов – диметилсульфоксида (ДМСО) на структурное состояние поверхностной области модельных мембран липосом, сформированных из ФХ и его смеси с холестерином.

motion amplitude [28]; condensation effect in lateral packing of carbon chains [24]. Nevertheless the stated effects considerably depend on membrane phospholipid composition and cholesterol/phospholipids ratio [21]. There are some data indicating that presence of moderate cholesterol concentration in membranes may smooth the lipid phase transitions [11, 12], as well as increase their resistance to action of surface-active agents [18] and electric current [27]. At the same time ability of cholesterol to interact with certain lipid types [29, 33] induces their lateral separation in biological membranes, which is particularly expressed at high steroid content, close to its limit dissolubility [22, 26], commonly observed in plasma membranes [23]. Similar changes can cause a decrease of cell resistance to effect of non-physiological conditions, external physical and chemical factors (cooling, freezing, warming etc.), as well as influence of exogenous chemical agents, e. g. CPs. Therefore it is of current concern to elucidate the role of lipid bilayer heterogeneity, induced by a high content of cholesterol and its interaction with CPs.

One of the most effective methods investigating membrane structure state as well as estimating their hydrophobic properties is the use of the fluorophores immersed into bilayer [10]. This method allows studying the features of biological membrane structure modifications under influence of various physical and chemical agents, including organic additives [1, 6, 25]. We have selected DSM as a fluorescent probe, localized in polar area and hydrophobic zone border [10]. Peculiarities of DSM chemical structure specify its high sensitivity to polarity and motion properties of membrane microenvironment.

The work aim was to study using the method of fluorescent probes the influence of CPs of different classes: diols – ethylene glycol (EG), 1,2-propane diol (1,2-PD); amides – N, N- dimethyl formamide (DMF); triols – glycerol and and sulfoxides – dimethyl sulfoxide (DMSO) on surface structure of model membranes of liposomes, formed from phosphatidyl choline (PC) and its mixture with cholesterol.

Materials and methods

We used egg yolk phosphatidyl choline and cholesterol of Sigma production (USA). All CPs used in the work (Reakhim, Russia) were of “chemically pure” and “pure for analysis” grades and additionally purified: glycerol and DMF by double vacuum distillation [4], DMSO, EG and 1,2-PD – by the same way, but with preliminary exposure above aluminium oxide or absorbite of A grade. CP solutions were prepared by weighing and their concentrations were expressed in mass percents (% w/w). Due to high viscosity of pure glycerol, complicating the specimen preparation, we used its 50% solution. DSM probe was synthesized at State Scientific Enterprise “Science and

Материалы и методы

Фосфатидилхолин из яичного желтка и холестерин были предоставлены фирмой “Sigma” (США). Все используемые в работе КП (“Рехим”, Россия) имели марку “хч” или “чда” и перед использованием дополнительно очищались: глицерин и ДМФА – двукратной вакуумной перегонкой [4], ДМСО, ЭГ и 1,2-ПД – тем же способом, но с предварительной выдержкой над окисью алюминия или активированным углем марки “А”. Растворы КП готовили путем взвешивания и выражали в массовых процентах (мас. %). В связи с высокой вязкостью чистого Гл, затрудняющей подготовку образцов, в опытах использовали его 50%-й раствор. Зонд ДСМ был синтезирован в ГНУ “НТК “Институт монокристаллов” НАН Украины” (г. Харьков).

Липосомы получали методом экструзии [30] в 5 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4) из чистого ФХ и его смеси с холестерином (при содержании последнего 30 мас. %, что соответствует 45,4 мол. %). Эксперименты проводили на 9 независимо приготовленных образцах липосом каждого вида. Используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{460} = 44700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, определяли концентрацию ДСМ на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer, США). Зонд готовили в виде спиртового раствора ($1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$), который затем добавляли к суспензии липосом до конечной концентрации $1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Спектры флуоресценции ДСМ регистрировали на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США) с автоматической коррекцией. Ширины входной и выходной щелей монохроматоров составляли 5 нм. Спектры возбуждения ДСМ регистрировали на длине волны 565 нм, а спектры флуоресценции зонда возбуждали светом с длиной волны 460 нм. Все спектральные измерения выполняли при $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ в кварцевых кюветках $1 \times 1 \times 3 \text{ см}$.

Для определения количества спектральных компонент, соответствующих различным формам зонда, локализованного в мембранах и буферном растворе, а также параметров их неоднородного уширения (ПНУ) использовали модель формирования электронно-колебательных спектров многоатомных молекул [2, 3].

Спектры флуоресценции (СФ) ДСМ, связанного с мембранами липосом, описывали уравнением [7, 8]:

$$S(v, \{C, v_i^c, \sigma_i\}_n) = \sum_{i=1}^n \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(v_s)}{\pi(v - v_s)^2 + \Gamma^2(v_s)} \times \\ \times \frac{\mu^2(v_s) k_i C}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left\{ \frac{v_i^c - v_s}{\sigma_i} \right\}^2\right) dv,$$

Technology Corporation “Institute of Single Crystals” of the National Academy of Sciences of Ukraine” (Kharkov, Ukraine).

Liposomes were obtained by extrusion method [30] in 5 mM Na-phosphate buffer (pH 7.4) from pure PC and its mixture with cholesterol (with content of the latter of 30% w/w, that corresponds to 45.4 molar %). The experiments were conducted in 9 separately prepared samples of each liposomes' type. Using coefficient of molar extinction $\epsilon_{460} = 44700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, we have determined the DSM concentration with Lambda 35 spectrophotometer (Perkin Elmer, USA). The probe prepared as alcoholic solution ($1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$) was added to liposome suspension for final concentration of $1 \times 10^{-6} \text{ M}$.

DSM fluorescence spectra were recorded with Varian Cary Eclipse spectrofluorometer (USA) with an automatic correction. Width of monochromator input and output slots was 5 nm. DSM excitation spectra were recorded by 565 nm wave length, and probe fluorescence spectra were excited by a light with 460 nm wavelength. All spectra measurements were performed at $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ in $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}$ quartz cuvettes.

To determine the number of spectrum components corresponding to the different probe forms localized in membranes and buffer solution, as well as their inhomogeneous broadening parameters (IHBP) we used the model of electronic oscillation spectra of polyatom molecules [2, 3].

DSM fluorescence spectra (FS), associated with liposome membranes, are described by the following equation [7, 8]:

$$S(v, \{C, v_i^c, \sigma_i\}_n) = \sum_{i=1}^n \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(v_s)}{\pi(v - v_s)^2 + \Gamma^2(v_s)} \times \\ \times \frac{\mu^2(v_s) k_i C}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left\{ \frac{v_i^c - v_s}{\sigma_i} \right\}^2\right) dv,$$

where n is number of spectra components; k_i is the contribution of probe i -form to total spectrum; v_i^c , σ_i are the center and dispersion of inhomogeneous broadening of i -component, correspondingly.

FS deconvolution for components, and also calculation of IHBP for every component were performed using the specially designed program in Turbo Pascal 7.0. Number of processed points for each experimental spectrum was 220. Results were statistically processed by Student's method [13] using Statgraph software.

Results and discussion

At the first research stage we investigated the cholesterol influence on a structure of bilayer surface.

When transferring the probe from a buffer solution into PC-liposomes its fluorescence intensity in F_M

где n – количество спектральных компонент; k_i – вклад i -й компоненты в суммарный спектр; ν_i^c , σ_i – центр и дисперсия неоднородного уширения i -й компоненты соответственно.

Разложение СФ на составляющие, а также расчет ПНУ для каждой компоненты проводили по специально разработанной программе в среде Turbo Pascal 7.0. Количество обрабатываемых точек для каждого экспериментального спектра составляло 220. Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента [13] с использованием программного пакета “Statgraf”.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы исследовали влияние холестерина на структурное состояние поверхностной области бислоя.

При переходе из буферного раствора в ФХ-липосомы интенсивность флуоресценции зонда в максимуме F_M возрастает более чем в 30 раз, а положение максимума λ_M смещается в коротковолновую область на 43 ± 5 нм (к 565 ± 5 нм). В присутствии холестерина F_M снижается более чем в 3 раза, а λ_M сдвигается в коротковолновую сторону еще на 35 ± 5 нм (к 530 ± 5 нм) по сравнению с ФХ-липосомами. При этом полуширина ($\Delta\lambda_{1/2}$) спектров снижается на 5% (от 111 ± 2 нм в ФХ-липосомах до 107 ± 1 нм в липосомах ФХ/холестерин), что отражает некоторое увеличение однородности микроокружения зонда в липосомах, содержащих холестерин. Спектры возбуждения ДСМ при переходе из буфера в липидное окружение претерпевают коротковолновый сдвиг на 8 и 14 нм в ФХ- и ФХ/холестерин липосомах соответственно.

Таким образом, изменения основных параметров флуоресценции ДСМ (F_M , λ_M , $\Delta\lambda_{1/2}$) свидетельствуют о высокой чувствительности зонда к нарушениям поверхностной области мембран, модифицированной холестерином. Обнаруженные спектральные изменения ДСМ отражают повышение гидрофобности окружения зонда при встраивании в липидный бислой, которая более выражена в липосомах ФХ/холестерин. В то же время меньшая интенсивность флуоресценции ДСМ, наблюдаемая в присутствии холестерина, может быть результатом уменьшения количества молекул зонда, связанного с мембранами. Кроме того, форма СФ зонда в липосомах ФХ/холестерин асимметрична, с хорошо выраженным коротковолновым максимумом и плечом в длинноволновой области (рис. 1). Принимая во внимание полученные экспериментальные доказательства существования в ФХ-мембранах, по крайней мере, двух форм флуоресценции ДСМ (“красной” и “зеленой”) [10], наблюдаемые в присутствии холестерина изме-

maximum increases more than in 30 times, and the position of λ_M maxima shifts towards shortwave interval by 43.5 nm (to 565.5 nm position). At cholesterol presence F_M diminishes more than thrice, and λ_M shifts towards the shortwave interval by 35.5 nm more (to 530.5 nm) comparing to PC-liposomes case. Halfwidth ($\Delta\lambda_{1/2}$) of spectra diminishes by 5% (from 111.2 nm in PC-liposomes down to 107.1 nm in PC/cholesterol liposomes) and that reflects some rise of probe microenvironment homogeneity in cholesterol-containing liposomes. DSM excitation spectra from buffer solution to lipid environment transferring undergone a shortwave shift by 8 and 14 nm in PC and PC/cholesterol liposomes, correspondingly.

Thus, the variations of DSM fluorescence main parameters (F_M , λ_M , $\Delta\lambda_{1/2}$) testify to a high sensitivity of the probe to disturbances of cholesterol modified membrane surface. The detected spectral variations for DSM show a rise of probe microenvironment hydrophobicity when being build into the lipid bilayer, and this is more expressed in case of PC/cholesterol liposomes. At the same time, the lower intensity of DSM fluorescence, observed in the cholesterol presence, can result from reduction of number of membrane bound probe molecules. Moreover the probe's FS shape in PC/cholesterol liposomes is asymmetric, with clearly expressed shortwave maximum and arm in long wavelength interval (Fig. 1). Considering the experimentally shown existence in PC-membranes at least of two forms (“red” and “green”) of DSM fluorescence [10], the observed in cholesterol presence variations of fluorescence parameters can be interpreted as alteration of these components contribution in a probe total spectrum.

To determine the individual components in DSM fluorescence spectra we have used the approach based on separation in spectrum of two parts: homogeneous component, depending on probe intramolecular properties, and distribution of inhomogeneous broadening, which parameters depend on physical and chemical peculiarities of the probe molecule environment [2, 3]. This approach allows to separate from the total spectrum the individual components, corresponding to its membrane localization sites, and to determine IHBP as well as ν^c and σ . Thereat the parameter ν^c reflects the probe microenvironment hydrophobicity more adequately, comparing with traditionally used parameter λ_M , and parameter σ allows to describe the environment dipole motility, directly associated with microviscosity.

Resulting from membrane titrating by the probe we retrieved the DSM saturating concentration (probe/PC molar ratio of 1.4), where we observed the maximal filling of all types of probe sorption centres (SCs) in membrane with both strong and weak affinities to DSM. Such an approach allowed to study the CP influence

нения параметров флуоресценции ДСМ можно интерпретировать с учетом различного вклада этих компонент в суммарный спектр зонда.

Для нахождения отдельных компонент был использован подход, основанный на выделении в спектрах зонда двух частей: однородной составляющей, зависящей от внутримолекулярных свойств зонда, и распределения неоднородного уширения, параметры которого определяются физико-химическими характеристиками окружения молекул зонда [2, 3]. Этот подход позволяет вычлнять из суммарного спектра зонда компоненты, соответствующие разным местам его локализации в мембране, и находить ПНУ ν^c и σ . При этом параметр ν^c отражает гидрофобность микроокружения зонда более адекватно, чем традиционно используемый параметр λ_m , а параметр σ позволяет охарактеризовать подвижность диполей окружения, непосредственно связанную с микровязкостью.

По результатам титрования мембран зондом была найдена насыщающая концентрация ДСМ (молярное отношение зонд/фосфатидилхолин, равное 1,4), для которой отмечалось максимальное заполнение всех типов центров сорбции (ЦС) зонда в мембранах, имеющих как большое, так и слабое сродство к ДСМ. Такой подход позволяет изучать влияние КП на участки мембран, расположенные в различных областях бислоя, не ограничиваясь наиболее специфичными для данного зонда [16].

Вначале находили ПНУ спектров флуоресценции ДСМ в растворителе (5 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, либо в растворах соответствующих КП, приготовленных на этом буфере), после чего найденные параметры ν_0^c и σ_0 использовали для выделения двух составляющих СФ зонда, связанного с мембранами. Аппроксимацию выполняли до совпадения теоретически полученного суммарного спектра с экспериментальным с точностью до 2%. Результаты применения этого подхода к спектрам флуоресценции ДСМ, связанного с ФХ и ФХ/холестерин мембранами, показаны на рис. 1.

Расчетные значения параметров неоднородного уширения для ДСМ, находящегося в суспензиях ФХ и ФХ/холестерин липосом, представлены в табл. 1 и 2 (колонки “контроль”). Как видно из рис. 1 и таблиц, кроме “буферной” составляющей (для которой $\nu_0^c = 16000 \text{ см}^{-1}$ и $\sigma_0 = 850 \text{ см}^{-1}$), для ДСМ, связанного с липосомами, обоих видов, удается выделить две составляющие (типа I и II), отличающиеся по своим спектральным характеристикам и соответствующие различной локализации зонда в мембранах. Поскольку величины ПНУ для центров типа I в ФХ-липосомах ($\nu_1^c = 16850 \text{ см}^{-1}$ и $\sigma_1 = 1100 \text{ см}^{-1}$) близки к найденным для зонда в буферном растворе, очевидно, эти ЦС

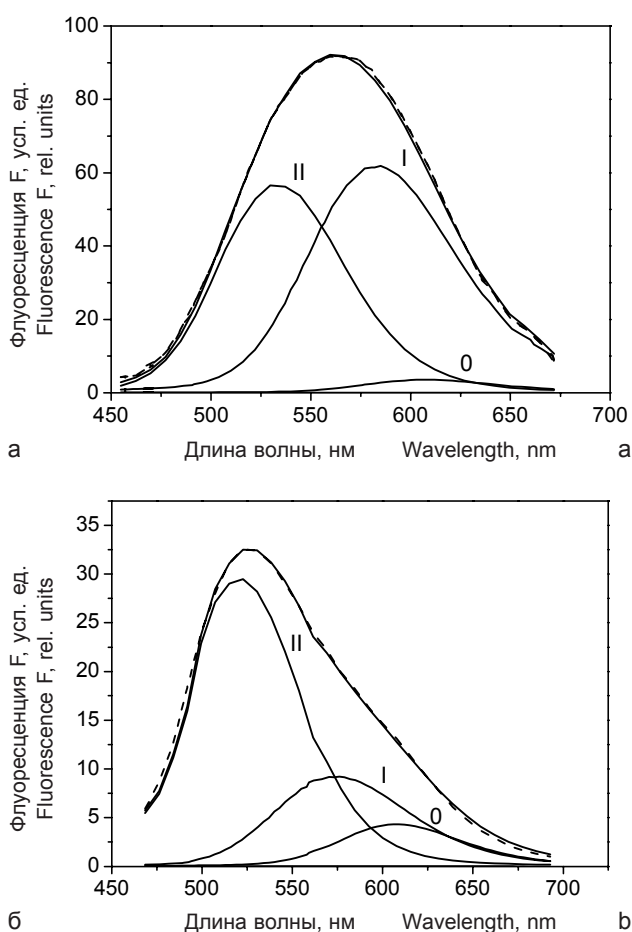


Рис. 1. Экспериментальные спектры флуоресценции ДСМ в ФХ- (а) и ФХ/холестерин (б) липосомах и их теоретически рассчитанные составляющие: 0 – зонд в буфере; I – “красная” компонента; II – “зеленая” компонента.

Fig. 1. Experimental spectra of DSM fluorescence in PC (a) and PC/cholesterol (b) liposomes and their calculated components: 0 – probe in buffer solution; I – “red” component; II – “green” component.

on membrane sites in different bilayer areas with no restriction to the most specific sites for the given probe [16].

Using this approach at first we found the IHBP of DSM fluorescence spectra in solvent (5 mM sodium-phosphate buffer solution, pH 7.4) or in buffered solutions of corresponding CP, then the retrieved parameters ν_0^c and σ_0 were used to separate two components of membrane bound probe fluorescence spectra. Approximation was performed until the theoretically obtained total spectrum fitting the experimental one with the 2% accuracy. Results of application of this approach to spectra of DSM bound with PC and PC/cholesterol membranes are shown in Fig. 1.

The calculated values of inhomogeneous broadening parameters for DSM, located in PC and PC/cholesterol liposome suspensions, are given in Table 1 and 2 (the control column). It can be seen from Fig. 1 and Tables

расположены вблизи поверхности, в полярной области бислоя, и связывание катионного красителя ДСМ с ними носит электростатический характер. Участки связывания типа II имеют меньшую полярность (большие значения параметра ν_2^c) и соответствуют более глубокой локализации зонда – в начале неполярной области бислоя [7, 8]. Для ЦС типа II значения ПНУ составляют: $\nu_2^c=18500 \text{ см}^{-1}$ и $\sigma_2=1150 \text{ см}^{-1}$. Причем, как это и наблюдается экспериментально, наиболее интенсивной флуоресценцией в ФХ-липосомах обладает компонента I, вклад которой в суммарный спектр наибольший ($k_1=0,62$). В присутствии холестерина в спектрах флуоресценции ДСМ, связанного с мембранами, преобладает коротковолновая составляющая ($k_2=0,56$), в то время как вклад составляющей типа I в сравнении с ФХ-липосомами снижается более чем вдвое ($k_1=0,28$). Окружение ЦС типа II в липосомах, содержащих холестерин, становится более гидрофобным ($\nu_2^c=19050 \text{ см}^{-1}$) по сравнению с ФХ-мембранами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что присутствие высокой концентрации холестерина в ФХ-бислое приводит к изменению топографии поверхностной области мембран, выражающемуся в появлении в бислое участков связывания ДСМ с повышенной гидрофобностью. Далее в сравнительном аспекте было изучено влияние КП на ФХ-липосомы и липосомы, модифицированные холестерином.

Как видно из рис. 2 и 3, характер влияния исследованных КП на интенсивность и положение спектров флуоресценции ДСМ, ассоциированного с мембранами ФХ- и ФХ/холестерин липосом, одинаков: по мере увеличения концентрации КП в суспензии интенсивность флуоресценции зонда, связанного с модельными мембранами, снижается, а максимум спектров смещается в длинноволновую сторону. Сравнение влияния КП на спектры ДСМ в суспензии мембран с их влиянием на спектры зонда в буфере показывает, что наблюдаемое после достижения минимума возрастание интенсивности флуоресценции ДСМ обусловлено ростом вклада в суммарный спектр зонда “буферной” составляющей, который сопутствует выходу зонда из мембран в растворитель вследствие конкуренции молекул зонда и КП за участки связывания на бислое. Причем наиболее резко эффект КП выражен в липосомах ФХ/холестерин.

Пример влияния 1,2-ПД на вид спектров флуоресценции ДСМ, связанного с ФХ- и ФХ/холестерин липосомами, приведен на рис. 4.

В целом глицерин, ЭГ и 1,2-ПД оказывают меньшее влияние на интенсивность и положение спектров флуоресценции ДСМ в мембранах в сравнении с ДМСО и ДМФА, однако в липосомах, содержащих холестерин, эти отличия более

1 and 2, that in spectra of DSM bound with both types of liposomes it is possible to separate two components (of types I and II) being different by their spectral characteristics and correspondent to different localization of probe in membrane. The latter does not concern the “buffer” component where $\nu_0^c=16000 \text{ см}^{-1}$ and $\sigma_0=850 \text{ см}^{-1}$. Considering the IHBP values for centers of type I in PC liposomes ($\nu_1^c=16850 \text{ см}^{-1}$ and $\sigma_1=1100 \text{ см}^{-1}$) are close to the ones retrieved for the probe located in buffer solution, it is apparent, that these SCs are situated close to surface, in polar area of bilayer, and the binding of cationic dye DSM with them is of electrostatic nature. The SCs of type II have weaker polarity (bigger values of ν_2^c) and correspond to a “deeper” localization of the probe, in the edge of bilayer non-polar area [7, 8]. For SC of type II IHBP values make $\nu_2^c=18500 \text{ см}^{-1}$ and $\sigma_2=1150 \text{ см}^{-1}$. Moreover, as it has been experimentally shown, the most intensive fluorescence in PC liposomes is experimentally observed to be possessed by component I, which contribution in total spectrum is the greatest ($k_1=0,62$). In cholesterol presence the membrane bound DSM fluorescence spectra show the dominance of shortwave component ($k_2=0,56$), while the contribution of type I component is dropped more than twice ($k_1=0,28$) comparing to the case of PC liposomes. The environment of type II SCs in cholesterol containing liposomes is more hydrophobic ($\nu_2^c=19050 \text{ см}^{-1}$) comparing to PC membranes.

The obtained results testify to the presence of high cholesterol concentration in PC bilayer results in variation of membrane surface topography, manifested in appearance in membrane of DSM binding sites with elevated hydrophobia. Hereafter we studied comparatively the CP effect on PC liposomes and cholesterol modified liposomes.

Fig. 2 and 3 show the nature of studied CP effect on intensity and position of fluorescence spectra of DSM, bound with membranes of PC and PC/cholesterol liposomes is identical: in rising of CP concentration in suspension the fluorescence intensity of the membrane bound probe decreases, and maximum of spectra shifts into long wavelength interval. The comparing of CP effect on DSM spectra in membrane suspension with the effect on spectra of the probe in buffer solution shows, that the rising of DSM fluorescence intensity observed after reaching the minimum is determined by a rise of the “buffer” component contribution in probe total spectrum, that accompanies a release of the probe from membranes into a solvent due to a competition of the probe and CP molecules for binding sites on bilayer. Moreover the most significant effect of CPs is observed in PC/cholesterol liposomes.

The example of 1,2-PD effect on fluorescence spectra pattern of PC and PC/cholesterol liposome bound DSM is shown in Fig. 4.

Таблица 1. Влияние 15 мас. % растворов криопротекторов на параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ в ФХ-липосомах

Table 1. Effect of 15% w/w cryoprotectant solutions on parameters of inhomogeneous broadening of DSM fluorescence spectra in PC-liposomes

Типы центров сорбции зонда Type of probe sorption centre	Параметры неоднородного уширения Parameters of inhomogeneous broadening	Контроль Control	Глицерин Glycerol	ЭГ EG	1,2-ПА 1,2-PD	ΔМСО DMSO	ΔМФА DMFA
0	$\nu_{0'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\nu_{0''}^c, \text{cm}^{-1}$	16000±8	16100±10	16050±12	16100±10	15985±5	15995±5
	$\sigma_{0'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\sigma_{0''}^c, \text{cm}^{-1}$	850±5	850±6	840±4	920±7	840±5	835±3
	k_0	0,04±0,005	0,07±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01	0,15±0,01	0,83±0,02
I	$\nu_{1'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\nu_{1''}^c, \text{cm}^{-1}$	16850±7	16450±12	16450±9	16450±10	16850±10	16350±6
	$\sigma_{1'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\sigma_{1''}^c, \text{cm}^{-1}$	1100±9	950±6	980±19	950±14	1100±10	1000±4
	k_1	0,62±0,02	0,60±0,01	0,61±0,02	0,60±0,01	0,59±0,01	0,63±0,02
II	$\nu_{2'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\nu_{2''}^c, \text{cm}^{-1}$	18500±15	18320±13	18150±11	18150±10	18570±8	18250±8
	$\sigma_{2'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\sigma_{2''}^c, \text{cm}^{-1}$	1150±7	1000±4	1050±5	1000±8	1160±6	1050±7
	k_2	0,34±0,01	0,33±0,01	0,33±0,02	0,35±0,01	0,26±0,01	0,14±0,01

Примечание: Здесь и в табл. 2 ошибка расчета параметров неоднородного уширения для буферной составляющей не превышала 1%, а для компонент зонда, связанного с мембранами, – 2%.

Note: Here and in Table 2 the calculation error for parameters of inhomogeneous broadening for buffer solution component did not exceeded 1%, and for components of membrane bound probe – 2%.

Таблица 2. Влияние 15 мас. % растворов криопротекторов на параметры неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ в ФХ/холестерин-липосомах

Table 2. Effect of 15% w/w cryoprotectant solutions on parameters of inhomogeneous broadening of DSM fluorescence spectra in PC/cholesterol liposomes

Типы центров сорбции зонда Type of probe sorption centre	Параметры неоднородного уширения Parameters of inhomogeneous broadening	Контроль Control	Глицерин Glycerol	ЭГ EG	1,2-ПА 1,2-PD	ΔМСО DMSO	ΔМФА DMFA
0	$\nu_{0'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\nu_{0''}^c, \text{cm}^{-1}$	16000±8	16100±10	16050±12	16100±10	15985±5	15995±5
	$\sigma_{0'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\sigma_{0''}^c, \text{cm}^{-1}$	850±5	850±6	840±4	920±7	840±5	835±3
	k_0	0,16±0,02	0,16±0,01	0,20±0,01	0,15±0,02	0,25±0,04	0,79±0,04
I	$\nu_{1'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\nu_{1''}^c, \text{cm}^{-1}$	16850±14	16300±22	16305±15	16220±10	16264±15	16240±18
	$\sigma_{1'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\sigma_{1''}^c, \text{cm}^{-1}$	1150±5	990±11	990±7	990±10	970±5	975±5
	k_1	0,28±0,01	0,44±0,01	0,38±0,02	0,41±0,03	0,49±0,05	0,060±0,001
II	$\nu_{2'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\nu_{2''}^c, \text{cm}^{-1}$	19050±23	18780±17	18775±19	18750±10	18745±14	18380±21
	$\sigma_{2'}^c, \text{cm}^{-1}$ $\sigma_{2''}^c, \text{cm}^{-1}$	1200±8	1159±15	1150±9	1050±5	1053±7	1070±13
	k_2	0,56±0,02	0,40±0,01	0,42±0,02	0,38±0,01	0,26±0,01	0,15±0,01

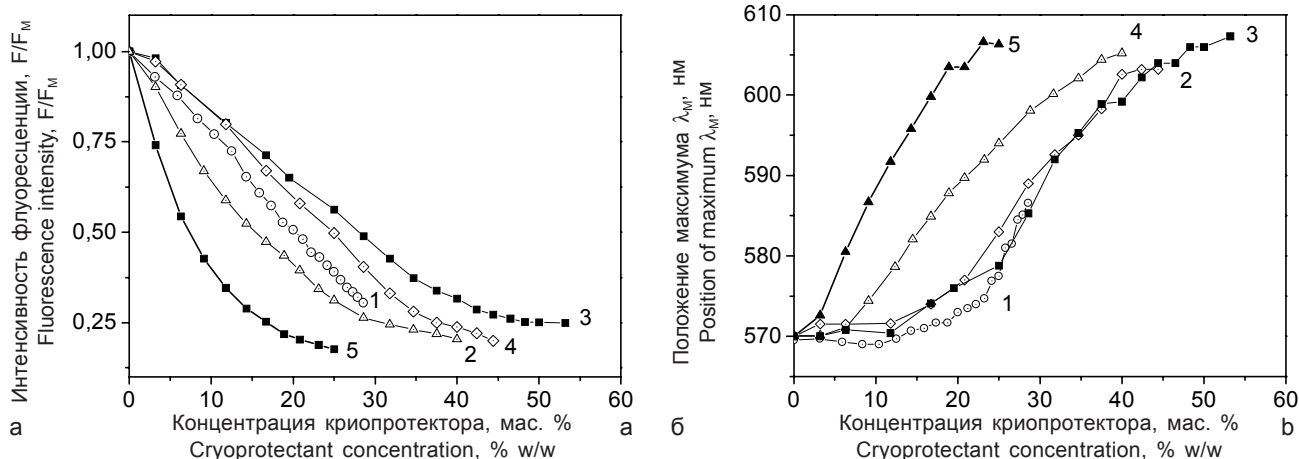


Рис. 2. Влияние криопротекторов на нормированную интенсивность (а) и положение максимума (б) спектров флуоресценции ДСМ в суспензии ФХ-липосом: 1 – Гл; 2 – ЭГ; 3 – 1,2-ПД; 4 – ДМСО; 5 – ДМФА.

Fig. 2. Cryoprotectant effect on normalized intensity (a) and position of maximum (b) for DSM fluorescence spectra in PC-liposome suspension: 1 – glycerol; 2 – EG; 3 – 1,2-PD; 4 – DMSO; 5 – DMFA.

заметны: перераспределение зонда в растворитель наблюдается при концентрациях КП, существенно меньших, чем в ФХ-липосомах (табл. 2). Так, в липосомах ФХ/холестерин рост зависимости нормированной интенсивности флуоресценции F/F_M от концентрации КП, соответствующий переходу зонда из мембран в растворитель, наблюдался в областях концентраций: ЭГ – 25, 1,2-ПД – 22, ДМСО – 14, ДМФА – 7 мас. %. В то время как в ФХ-липосомах изменения зависимости F/F_M от концентрации КП имеют более плавный ход и её рост начинается при концентрациях: 1,2-ПД – 42, ЭГ – 34, ДМСО – 32, ДМФА – 20 мас. %. Для исследованных концентраций глицерина в обоих случаях излом кривых не наблюдался. Сходный характер имеют и зависимости параметра λ_M от концентрации КП в липосомах различного состава (см. рис. 2, б и 3, б). Величина сдвига λ_M в длинноволновую сторону отражает эффективность

Generally, glycerol, EG and 1,2-PD cause lower effect on intensity and position of fluorescence spectra of DSM in membranes comparing with DMSO and DMFA, however in cholesterol-containing liposomes these differences are more visible: the re-distribution of probe into solvent is observed at lower CP concentrations comparing to PC liposomes (Table 2). For example, in PC/cholesterol liposomes the rise in dependence of normalised fluorescence intensity F/F_M from CP concentration, corresponding to probe transition from membranes into solvent, was observed at the following concentrations: EG – 25, 1,2-PD – 2, DMSO – 14, DMFA – 7% w/w. While in PC liposomes the variation of F/F_M dependence from CP concentration have smoother change and its rise was observed at following concentrations: 1,2-PD – 42, EG – 34, DMSO – 32, DMFA – 20% w/w. For the studied glycerol concentrations there was no curve kink in both cases. The similar pattern is also observed in

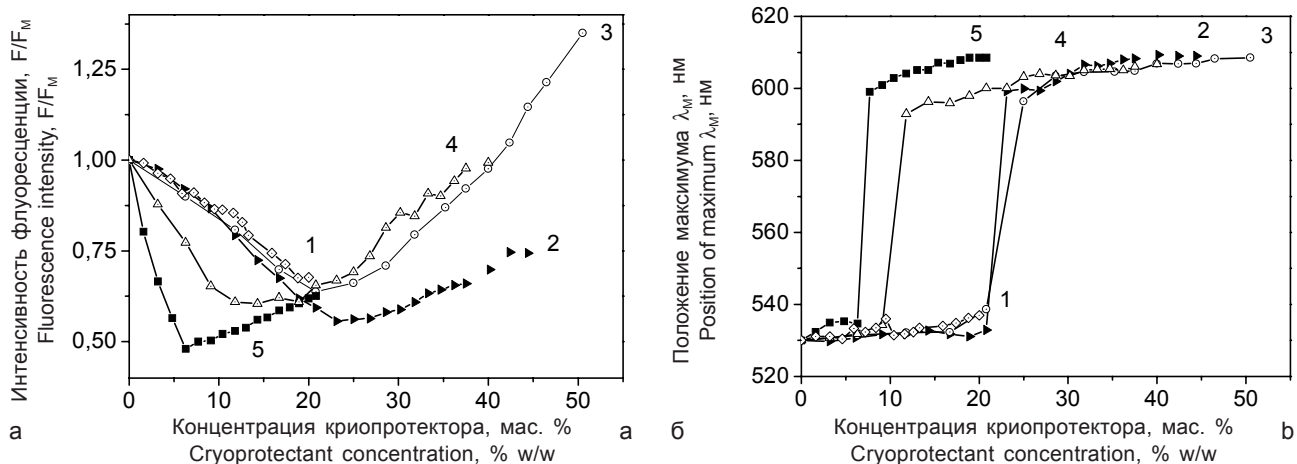


Рис. 3. Влияние криопротекторов на нормированную интенсивность (а) и положение максимума (б) спектров флуоресценции ДСМ в суспензии ФХ/холестерин-липосом: 1 – глицерин; 2 – ЭГ; 3 – 1,2-ПД; 4 – ДМСО; 5 – ДМФА.

Fig. 3. Cryoprotectant effect on normalized intensity (a) and position of maximum (b) for DSM fluorescence spectra in PC/cholesterol-liposome suspension: 1 – glycerol; 2 – EG; 3 – 1,2-PD; 4 – DMSO; 5 – DMFA.

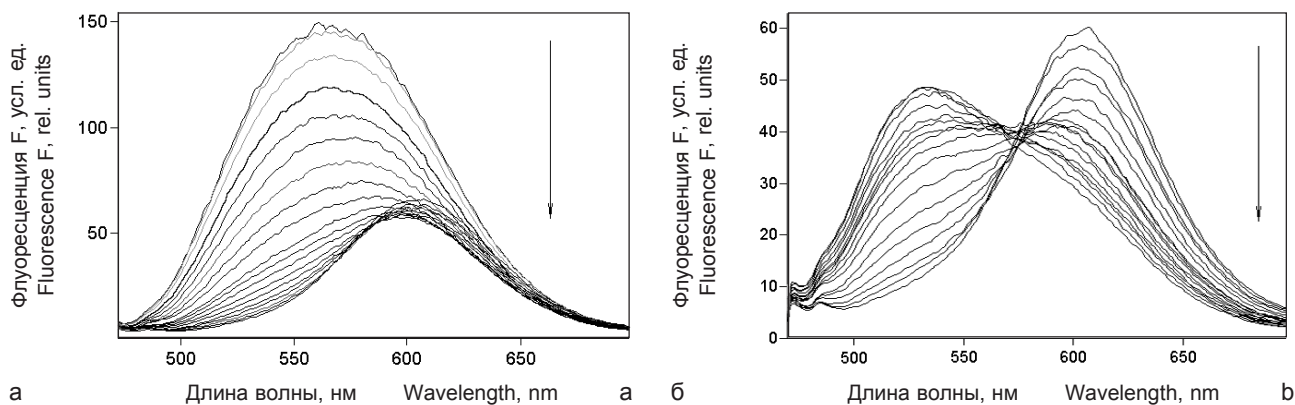


Рис. 4. Влияние возрастающих концентраций 1,2-ПД (указано стрелками) на вид спектров флуоресценции ДСМ, связанного с ФХ- (а) и ФХ/холестерин (б) липосомами.

Fig. 4. Effect of rising concentrations of 1,2-PD (shown with arrows) on fluorescence spectra of DSM, bound with PC (a) and PC/cholesterol (b) liposomes.

вытеснения зонда из мембран в растворитель под влиянием КП. Однако необходимо учитывать, что оценки, включающие только анализ параметров F_M и λ_M , не соответствуют в точности началу перехода КП в растворитель и позволяют на качественном уровне сравнивать эффективность влияния КП на мембраны, содержащие и не содержащие холестерин.

Поскольку информация, получаемая из основных параметров спектров флуоресценции ДСМ F_M и λ_M , ограничена, дополнительно привлекали анализ ПНУ спектров флуоресценции зонда. В табл. 1 и 2 представлены результаты расчетов ПНУ спектров флуоресценции ДСМ в ФХ- и ФХ/холестерин липосомах, выполненные для 15 мас. % КП. При этой концентрации заметно проявляются различия в действии КП на липосомы и в то же время достаточное количество зонда еще остается в бислое. На рис. 5 и 6 показан общий вид спектров флуоресценции ДСМ в ФХ- и ФХ/холестерин липосомах и их теоретически рассчитанные составляющие в присутствии 15 мас. % ДМСО и ДМФА.

Как видно из табл. 1, в ФХ-липосомах при содержании 15 мас. % глицерина, ЭГ и 1,2-ПД наблюдается незначительное (на 2–3%) перераспределение ДСМ из мембран в растворитель без достоверного изменения распределения зонда между типами ЦС ($p > 0,05$). То есть данные КП в концентрации 15 мас. %, связываясь с ФХ-мембранами, не оказывают существенного влияния на структуру бислоя. Из исследованных КП только ДМСО и ДМФА снижают относительное содержание зонда во II типе ЦС (ДМСО на 9 и ДМФА на 11%) и увеличивают его содержание в растворителе на 11 и 19 % соответственно ($p < 0,05$). Аналогично влияют эти КП и на мембраны ФХ/холестерин (табл. 2). В последнем случае эффект ДМФА оказывается наибольшим: в раствор переходит 79% зонда, а количество ДСМ,

λ_M dependences on CP concentration in liposomes with a different composition (see Fig. 2 b, and Fig. 3 b). The value of λ_M shift into the long wavelength interval reflects the efficiency of the probe chasing from membranes into the solvent under CP effect. However it is necessary to take into account that estimation, based only on analysis of F_M and λ_M parameters, does not reveal precisely the initial moment of CP transition into solvent and allows to compare qualitatively the effect of different CP on membranes with or without cholesterol presence.

As the information retrieved from the main parameters of DSM fluorescence F_M and λ_M is incomplete, we used additionally the analysis of IHP of probe fluorescence spectra. Tables 1 and 2 show the results of IHP calculations for DSM fluorescence spectra in PC and PC/cholesterol liposomes performed for 15% mass of CP. At this concentration the differences in CP action on bilayer are clearly exhibited and at the same time the sufficient amount of probe molecules has still remained in bilayer. Effect of 15% mass of DMSO and DMFA on general pattern of DSM fluorescence spectra in liposomes and their theoretically calculated components is presented in Fig. 5 and 6.

Table 1 shown that in PC liposomes in presence of 15% w/w glycerol, EG and DMSO there is an insignificant (for 2–3%) re-distribution of DSM out of membranes to solvent without a significant changes in probe distribution among SC types ($p > 0.05$). These CP under 15% w/w concentration did not affect significantly the bilayer structure when binding with PC-membranes. Among the studied CPs only DMSO and DMFA diminish a relative content of the probe in type II SC (DMSO by 9 and DMFA by 11%) and increase its content in solvent by 11 and 19%, correspondingly ($p < 0.05$). The similar effect of this CPs is observed in PC/cholesterol membranes (Table 2). In the latter case DMFA effect appears to be the

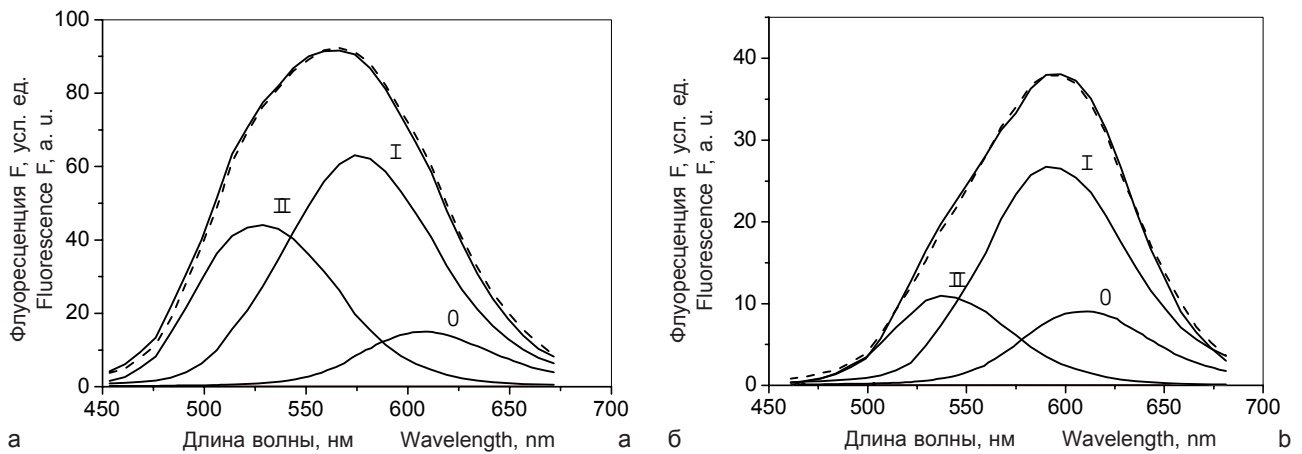


Рис. 5. Влияние 15 мас. % ДМСО (а) и ДМФА (б) на экспериментальные спектры флуоресценции ДСМ в ФХ-липосомах и их теоретически рассчитанные составляющие: 0 – зонд в буфере; I – “красная” компонента; II – “зеленая” компонента.

Fig. 5. Effect of 15% mass of DMSO (a) and DMFA (b) on experimental spectra of DSM fluorescence in PC liposomes and their calculated components: 0 – probe in buffer solution; I – “red” component; II – “green” component.

связанного с ЦС I и II типов, уменьшается на 22 и 41% соответственно в сравнении с контролем. В липосомах, содержащих холестерин, глицерин, ЭГ, 1,2-ПД и ДМСО, вызывают почти двукратное возрастание относительного количества ДСМ, связанного с ЦС типа I, и снижение количества ДСМ, связанного с ЦС типа II. Причем, в вытеснении зонда из ЦС типа II Гл, ЭГ и 1,2-ПД почти одинаково эффективны (k_2 снижается на 13–15% в сравнении с контролем, $p < 0,05$), в то время как в присутствии ДМСО ($k_2 = 0,26$) и ДМФА ($k_2 = 0,15$) вытеснение флуоресцентного зонда из “гидрофобных” ЦС происходит более интенсивно ($p < 0,05$). Наряду с вытеснением ДСМ из мембран, КП увеличивают также полярность микроокружения зонда, находящегося в липосомах обоих типов (снижение параметра v°).

highest: 79% of the probe transits into the solution, and the amount of DSM, bound with SCs of types I and II decreases by 22 and 41%, correspondingly, comparing to control values. In cholesterol-containing liposomes glycerol, 1,2-PD and DMSO cause almost a twofold rise of relative amount of DSM, bound with SC of type I, and decrease of the amount of DSM, bound with SC of type II. Moreover, glycerol, EG and 1,2-PD efficiencies are quite the same in chasing of the probe from SC of type II (k_2 decreases for 13–15% comparing to the control values, $p < 0.05$), while in presence of DMSO ($k_2 = 0.26$) and DMFA ($k_2 = 0.15$) the chasing of the fluorescent probe from hydrophobic SCs is more intensive ($p < 0.05$). Alongside with DSM chasing from membranes, CPs also increase the polarity of probe microenvironment, located in liposomes of both types (decrease of parameter v°).

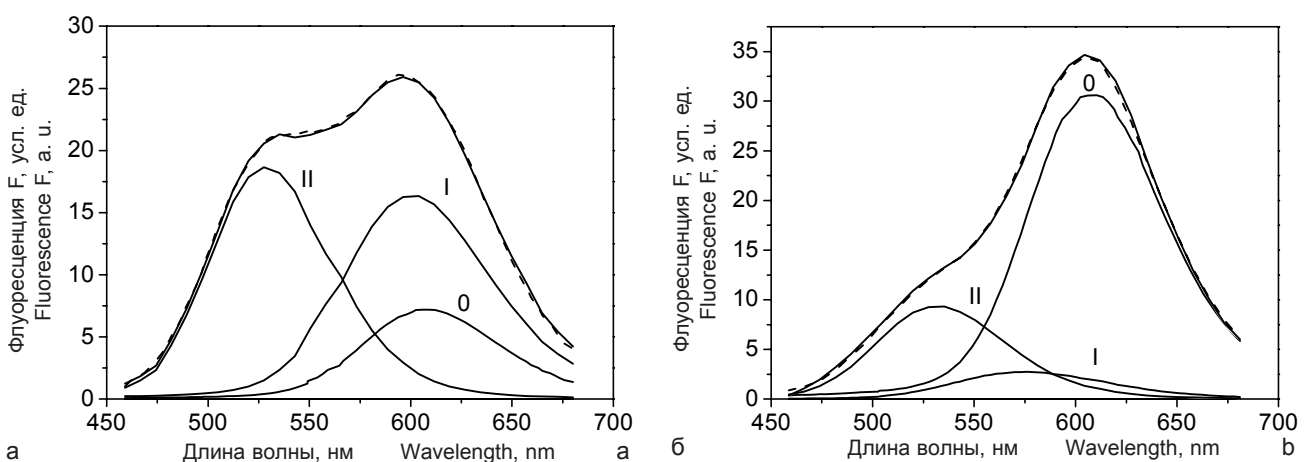


Рис. 6. Влияние 15 мас. % ДМСО (а) и ДМФА (б) на экспериментальные спектры флуоресценции ДСМ в ФХ/холестерин-липосомах и их теоретически рассчитанные составляющие: 0 – зонд в буфере; I – “красная” компонента; II – “зеленая” компонента.

Fig. 6. Effect of 15% w/w of DMSO (a) and DMFA (b) on experimental spectra of DSM fluorescence in PC/cholesterol liposomes and their calculated components: 0 – probe in buffer solution; I – “red” component; II – “green” component.

Таким образом, характер влияния исследованных КП на ФХ– и ФХ/холестерин липосомы одинаков и проявляется в конкурентном взаимодействии с флуоресцентным зондом за центры связывания на мембране. Однако это влияние зависит от химической природы и концентрации КП и наиболее выражено в липосомах, модифицированных 45,4 мол. % холестерина.

Интерпретировать полученные результаты можно с учетом современных представлений об организации холестерина в бислое, которые в настоящее время дискутируются в литературе. При содержании холестерина в мембранах около 0,40 и 0,50 мольных долей [22] экспериментально обнаружены резкие изменения структурного состояния бислоя, сопровождающиеся увеличением упорядоченности ацильных цепей липидов и снижением упорядоченности упаковки (или увеличения гидратации) в области полярных головок липидов. Данный диапазон концентраций близок к “критическому” диапазону, теоретически предсказанному в рамках так называемой гипотезы суперрешетки, согласно которой холестерин способен к избирательному образованию комплексов с определенными видами фосфолипидов с формированием доменов, равномерно распределённых в бислое. Предполагается также возможность образования дефектных зон в бислое и их сосуществования с упорядоченными доменами.

В работе использован липид одного вида – яичный ФХ. Однако при выбранном в экспериментах молярном соотношении липид/холестерин, равном 1,2:1, очевидно, что холестерин не распределен в бислое равномерно и может не только находиться в виде комплексов с ФХ, но также и образовывать самостоятельные кластеры, увеличивая тем самым гетерогенность бислоя. Кроме того, поскольку природный ФХ является гетерогенным по жирнокислотному составу [12], в бислое может иметь место избирательное взаимодействие холестерина с определенными молекулами ФХ, к жирнокислотным остаткам которых он имеет большее сродство. Отличия в сродстве холестерина к липидам, содержащим полиненасыщенные и насыщенные жирнокислотные остатки, а также имеющим различную длину углеводородной цепи, описаны в [21]. Можно предположить, что холестерин в высокой концентрации образует в бислое различные стехиометрические комплексы типа ФХ/холестерин и холестерин/холестерин, формирование которых приводит к латеральному разделению липидов в плоскости бислоя и возникновению “дефектных зон” на границах упорядоченных доменов. Наблюдаемое увеличение содержания неполярной компо-

Thus, the nature of investigated CP effect on PC and PC/cholesterol liposomes is identical and is exhibited in competitive interaction with the fluorescent probe for binding sites on membrane. However this effect depends on CP chemical nature and concentration and is the most expressed in liposomes, modified with 45.4 molar % cholesterol.

It is possible to explain the obtained results when considering the literature data on cholesterol arrangement in membrane being recently discussed. There are experimental observations of sharp changes of bilayer structural state at cholesterol content of 0.40 and 0.50 molar fractions, and these are accompanied with a rise in lipid acyl chain ordering and decrease in packing order (or increase of hydration) in lipid polar head area. The given range of concentrations is close to “critical” range, theoretically predicted by so-called hypothesis of superlattice, postulating cholesterol ability to form selectively the complexes with certain phospholipid types. The formed domains are thought to be uniformly distributed in bilayer. The hypothesis considers also the possibility of defect zones formation in bilayer and their co-existing with the ordered domains.

In this work the lipid of one type, egg PC, was used. However at the lipid/cholesterol molar ratio of 1.2:1, selected in the experiments, it is obvious, that cholesterol is not uniformly distributed in bilayer, as well as it can be not only being as the complexes with PC, but also form the independent clusters, increasing in such a way the bilayer heterogeneity. Furthermore, as natural PC is heterogeneous by fatty acid composition [12], it is possible to have in bilayer the selective interaction of cholesterol with certain PC molecules, which fatty acid residues have higher affinity to cholesterol. The differences in cholesterol affinity to lipids containing poly-unsaturated and saturated fatty acid residues, as well as having different length of carbon chain, are shown [21]. It is possible to suppose, that high concentrated cholesterol forms in bilayer various stoichiometric complexes such as PC/cholesterol and cholesterol/cholesterol with subsequent lateral separation of lipids in a bilayer plane and appearing of “defect zones” on the edge of the of ordered domains. The observed increase in non-polar content in fluorescence spectra of DSM, bound with PC/cholesterol liposomes, is apparently a result of probe infiltration into such “defect zones” with the maximal hydrophobia. This fact is testified particularly by the greater relative contribution of the “hydrophobic” component in DSM fluorescence spectra in PC/cholesterol membranes ($k_2=0.56$) comparing with PC membranes ($k_2=0.34$). The bulk of DSM sorption surface centers in PC/cholesterol membranes is occupied by either cholesterol or its complexes with PC. This reflects almost two time smaller contribution

ненты в спектрах флуоресценции ДСМ, связанного с липосомами ФХ/холестерин, по-видимому, является следствием проникновения зонда в такие “дефектные зоны”, характеризующиеся наибольшей гидрофобностью. Об этом свидетельствует, в частности, большой относительный вклад “гидрофобной” составляющей в спектры флуоресценции ДСМ в мембранах ФХ/холестерин ($k_2=0,56$) в сравнении с ФХ-мембранами ($k_2=0,34$). Основная же масса поверхностных центров сорбции ДСМ в мембранах ФХ/холестерин занята холестерином либо его комплексами с ФХ. Это отражает почти в 2 раза меньший вклад “полярной” составляющей в спектры флуоресценции ДСМ ($k_1=0,28$) в сравнении с ФХ-мембранами ($k_1=0,62$). В то же время повышение гидратации полярной области бислоя в присутствии холестерина [19], происходящее в результате увеличения расстояния между головками соседних молекул ФХ при внедрении гидроксильной группы холестерина [12], может увеличить доступность поверхности бислоя также для молекул ДСМ, флуоресценция которых будет в значительной степени потушена водой.

Учитывая рассмотренные выше механизмы влияния холестерина на липидный бислой, можно ожидать, что эффективность взаимодействия КП с бислоем, модифицированным высокой концентрацией холестерина, будет зависеть от гидрофильно-гидрофобных свойств молекул криозащитных веществ, которые могут быть охарактеризованы с помощью коэффициента их распределения (K_p) в системе вода/октанол (табл. 3) [15]. В соответствии с этим критерием исследуемые КП можно расположить в порядке возрастания гидрофобности: глицерин < ЭГ < 1,2-ПД < ДМФА < ДМСО. Как видно из табл. 3, для обоих типов липосом наблюдается высокий отрицательный коэффициент корреляции параметра k_2 , отражающего относительное количество зонда, связанного с ЦС типа II, с коэффициентом распределения K_p в системе вода/октанол и не отмечается корреляции между параметрами k_1 и K_p . Это свидетельствует о том, что в связывании КП с ЦС типа II ведущую роль играет их способность к гидрофобным взаимодействиям, в то время как в связывании КП с ЦС типа I преобладают иные механизмы, среди которых может быть выделена водородная связь (табл. 3).

Из полученных результатов следует, что взаимодействие исследованных КП с искусственными ФХ-мембранами происходит в широком концентрационном интервале, достигающем 40 мас. %, в то время как в липосомах ФХ/холестерин уже при концентрации КП 25 мас. % начинается резкий выход флуоресцентного зонда из мембран в растворитель. Это свидетельствует в целом об уменьшении встраивания КП в липидный бислой в

of “polar” component in DSM fluorescence spectra ($k_1=0.28$) comparing to PC membranes ($k_1=0.62$). On another hand the increase in hydration of bilayer polar area [19] under cholesterol presence occurring as a result of enlargement of space between heads of neighbouring PC molecules after cholesterol hydroxyl group incorporation [12], can augment the accessibility of bilayer surface for DSM molecules as well, and their fluorescence will be considerably quenched by water.

With provision to the above discussed mechanisms of cholesterol effect on lipid bilayer, it is possible to expect, that the efficiency of CP interaction with bilayer, modified with a high concentration of cholesterol, will depend on hydrophilic-hydrophobic properties of CP molecules. These properties can be characterised by the partition coefficient (K_p) in water-octanol system (Table 3) [15]. According to this criterion the studied CPs are arranged in the following row by reduction of hydrophobic properties: glycerol < EG < 1,2-PD < DMFA < DMSO. Table 3 shows high negative correlation coefficient between k_2 parameter, reflecting relative content of the probe bound with type II SCs, and partition coefficient K_p system in both types of liposomes, and no correlation between k_1 and K_p . This testifies to the leading role of hydrophobic interactions in binding of CPs and type II SCs, whereas in binding of CPs with type I SCs the other mechanism dominates, particularly the hydrogen bonds.

Obtained results appear to show, that the interaction of studied CPs with artificial PC membranes occurs within a wide concentration interval, reaching 40% w/w, while in PC/cholesterol liposomes the sharp rise of fluorescent probe withdrawal from membranes into solvent starts even at CP concentration of 25% w/w. This testifies, in general, to a reduction of CP building in lipid bilayer in the cholesterol presence. Furthermore, in liposomes of both types DSM is the most actively chased from non-polar sorption centres by DMSO and DMFA, though their action is more expressed in PC/cholesterol liposomes, i.e. DMSO and DMFA interact with lipid bilayer most effectively by hydrophobic mechanism and this interaction is strengthened at high cholesterol concentration. At the same time, as the lipid packing defects are most likely formed on the edge of ordered domains built by cholesterol and/or by its complexes with PC [11], the CP interaction with remaining part of bilayer, immobilized by cholesterol molecules, can diminish. From this point of view, the stabilizing of lipid bulk by cholesterol can be esteemed as a positive factor diminishing the disturbing effect of membrane-tropic CPs on the bilayer. However a high content of cholesterol results in a drop of membrane elasticity, and following reduction of cell tolerance to osmotic stress and other physical and chemical factors attending the process of cryopreservation [9].

присутствии холестерина. Кроме того, в обоих типах липосом ДМСО и ДМФА наиболее активно вытесняют ДСМ из неполярных центров сорбции, хотя их влияние более выражено в липосомах ФХ/холестерин, то есть ДМСО и ДМФА наиболее эффективно взаимодействуют с липидным бислоем по гидрофобному механизму и это взаимодействие усиливается при высокой концентрации холестерина. В то же время, поскольку дефекты упаковки липидов вероятнее всего образуются на границах упорядоченных доменов, образованных холестерином и/или его комплексами с ФХ [11], взаимодействие КП с остальной частью бислоя, иммобилизованной молекулами холестерина, может быть меньшим. С этой точки зрения стабилизация основной массы липидов холестерином может рассматриваться как положительный фактор, уменьшающий возмущающее влияние на бислой мембранотропных КП. Однако высокое содержание холестерина уменьшает эластичность мембран, снижая тем самым устойчивость клеток к действию осмотического стресса и других физико-химических факторов, сопутствующих процессу криоконсервирования [9].

Важную роль во взаимодействии КП с ФХ/холестерин мембранами, наряду с их липофильными свойствами, играет также концентрация. Очевидно, в высоких концентрациях КП, особенно "гидрофобные", легко встраиваясь в дефектные области, будут нарушать гидрофобные взаимодействия липид-холестерин, что может приводить к локальной дестабилизации мембран и увеличению их проницаемости. В клетках подобный эффект может усиливать цитотоксическое действие КП не только на уровне биомембран, но и по отношению к внутриклеточным структурам.

Выводы

Полученные результаты показывают, что характер влияния КП на ФХ- и ФХ/холестерин мембраны сходен и определяется химической структурой и концентрацией криозащитных веществ. Взаимодействие КП с модельными мембранами увеличивается с ростом их способности встраиваться в липидный бислой. Модифи-

Таблица 3. Коэффициенты распределения изучаемых КП в системе вода-октанол [15] и влияние 15 мас. % КП на относительное содержание ДСМ в различных центрах сорбции на искусственных мембранах

Table 3. Partition coefficients of the studied CPs in water-octanol system [15] and effect of 15% mass CP on DSM relative content in artificial membranes

Криопротектор Cryoprotectant	Коэффициент распределения Partition coefficient	ФХ-липосомы PC-liposomes		ФХ/холестерин-липосомы PC/cholesterol liposomes	
		k_1	k_2	k_1	k_2
Глицерин Glycerol	0,005	0,60	0,33	0,44	0,40
ЭГ EG	0,040	0,61	0,33	0,38	0,42
1,2-ПА 1,2-PD	0,076	0,60	0,35	0,41	0,38
ДМСО DMSO	0,247	0,59	0,26	0,49	0,26
ДМФА DMFA	0,233	0,59	0,14	0,06	0,15
r	—	0,08	-0,803	-0,303	-0,909

Примечание: r – коэффициент корреляции между величинами K_p и k_i .

Note: r is the correlation coefficient between K_p and k_i .

Apart from the lipophilic properties of CPs, their concentration are of great concern in interaction with cholesterol-containing membranes. Highly concentrated CPs, especially "hydrophobic" ones, easily build into "defect" areas and disrupt the lipid and cholesterol hydrophobic interaction, that can result in membrane local destabilisation and increasing its permeability. In cells the similar effect can aggravate the CP cytotoxic action both at a level of biological membranes and endo-cellular structures.

Conclusions

The results obtained demonstrate that the nature of CP effects on PC and PC/cholesterol membranes is similar and determined by cryoprotectant chemical structure and concentration. The interaction of CPs with model membranes is augmented with rise of their ability to build into lipid bilayer. The modification of membranes by presence of high concentration of cholesterol results in appearance of bilayer packing failures, facilitating the infiltration of the most 'lipophilic' CPs into bilayer non-polar area.

References

1. Babijchuk L.A., Zemlyanskikh N.G., Dyubko T.S. Perspectives of usage of erythrocyte cryopreservation method without washing step for transfusiology // Actual problems of hematology and blood transfusion: Proceedings of 5th meeting of hematologists and transfusiologists of Republic Belarus. Vol. 2.– Minsk, 2003.– P. 292-294.
2. Boytsov V.M. Fluorescent probes: spectra analysis for studying of heterogeneous centers of sorption // Biol. Membrany.– 1982.– Vol. 4, N7.– P. 677-695.

кация мембран присутствием высокой концентрации холестерина приводит к появлению дефектов упаковки бислоя, которые облегчают проникновение КП, особенно, наиболее “липофильных”, в его неполярную область.

Литература

1. *Бабийчук Л.А., Землянских Н.Г., Дюбко Т.С.* Перспективы использования безотмывочного метода криоконсервирования эритроцитов для трансфузиологии // Сб. трудов 5-го съезда гематол. и трансфузиологов Республики Беларусь “Активные проблемы гематологии и переливания крови”. Т. 2.– Минск, 2003.– С. 292-294.
2. *Бойцов В.М.* Флуоресцентные зонды: анализ спектров для изучения гетерогенных центров сорбции // Биол. мембраны.– 1982.– Т. 4, №7.– С. 677-695.
3. *Бойцов В.М., Южаков В.И.* Определение ширины однородной релаксационной составляющей спектров люминесценции сложных молекул в растворах // Докл. АН СССР.– 1985.– Т. 281, №2.– С. 358-363.
4. *Вайсбергер А., Проскауэр Э., Роддик Д., Тупс Э.* Органические растворители.– М.: Химия, 1968.– 1450 с.
5. *Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.– М.: Наука, 1980.– 320 с.
6. *Горбенко Г.П., Дюбко Т.С.* Изучение индуцированного радиацией изменения структуры мембран с помощью флуоресцентного зонда // Укр. біохім. журн.– 1995.– Т. 67, №1.– С. 100-105.
7. *Горбенко Г.П., Дюбко Т.С.* Взаимодействие 4-(N-диметил-аминостирил)-1-метилпиридиний-N-толуолсульфоната с липосомами: анализ спектров флуоресценции // Биофизика.– 1996.– Т. 41, №2.– С. 348-354.
8. *Горбенко Г.П., Нардид О.А., Дюбко Т.С.* Применение анализа неоднородного уширения спектров флуоресценции ДСМ для исследования структурных изменений модельных и природных мембран // Біофіз. вісник.– 1998.– Вип. 1.– С. 86-95.
9. *Гулевский А.К., Бондаренко В.А., Белоус А.М.* Барьерные свойства биомембран при низких температурах.– Киев: Наук. думка, 1988.– 208 с.
10. *Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 277 с.
11. *Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Динамическая структура липидного бислоя.– М.: Наука, 1981.– 293 с.
12. *Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Липидный бислой биологических мембран.– М.: Наука, 1982.– 224 с.
13. *Лакін Г.Ф.* Биометрия.– М.: Высш. шк., 1990.– 352 с.
14. *Линник Т.П., Бизикина О.В.* Криоконсервирование спермы петухов. I. Цитотоксичность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №2.– С. 72-79.
15. *Ліннік Т.П.* Фізико-хімічні фактори кріопшкодження і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис. ... докт. біол. наук.– Харків, 2003.– 36 с.
16. *Окладной Ю.Г., Дюбко Т.С.* Унификация подхода к оценке чувствительности и специфичности новых красителей потенциальных флуоресцентных зондов для белков // Функциональные материалы.– 2005.– Т. 12, №3.– С. 583-586.
17. *Хочачка П., Сомеро Дж.* Биохимическая адаптация: Пер. с англ.– М.: Мир, 1988.– 568 с.
18. *Apel-Paz M., Doncel G.F., Vanderlick T.K.* Impact of membrane cholesterol content on the resistance of vesicles to surfactant attack // Langmuir.– 2005.– Vol. 21, N22.– P. 9843-9849.
19. *Boytsov V.M., Yuzhakov V.I.* Determination of width of homogeneous relaxation component of luminescence spectra for complex molecules in solutions // Doklady AN SSSR.– 1985.– Vol. 281, N2.– P. 358-363.
20. *Weissberger A., Proskauer E., Roddick D., Tups E.* Organic solvents.– Moscow: Khimiya, 1968.– 1450 p.
21. *Vladimirov Yu.A., Dobretsov G.Ye.* Fluorescent probes in investigation of biological membranes.– Moscow: Nauka, 1980.– 320 p.
22. *Gorbenko G. P., Dyubko T. S.* Study of radiation induced modification of membrane structure using fluorescent probe // Ukr. Biokhim. Zhurn.– 1995.– Vol. 67, N1.– P. 100-105.
23. *Gorbenko G.P., Dyubko T.S.* Interaction of 4-(N-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium N-toluene-sulfonate with liposomes: analysis of fluorescence spectra // Biofizika.– 1996.– Vol. 41, N2.– P. 348-354.
24. *Gorbenko G. P., Nardid O. A., Dyubko T. S.* Application of analysis of inhomogeneous broadening of DSM fluorescence spectra to study the structure variations of model and natural membranes // Biophysical Bulletin.– 1998.– Issue 1.– P. 86-95.
25. *Gulevskiy A. K., Bondarenko V. A., Belous A. M.* Barrier properties of biological membranes at low temperatures.– Kiev: Naukova Dumka, 1988.– 208 p.
26. *Dobretsov G. Ye.* Fluorescent probes in investigation of cells, membranes and lipoproteines.– Moscow: Nauka, 1989.– 277 p.
27. *Ivkov V. G., Berestovskiy G. N.* Dynamic structure of lipid bilayer.– Moscow: Nauka, 1981.– 293 p.
28. *Ivkov V.G., Berestovskiy G.N.* Lipid bilayer of biological membranes.– Moscow: Nauka, 1982.– 224 p.
29. *Lakin G.F.* Biometry.– Moscow: Vysshaya Shkola, 1990.– 352 p.
30. *Linnik T.P., Bizikina O.V.* Cryopreservation of fowl sperm. I. Cytotoxicity of diols and amides // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2.– P. 72-79.
31. *Linnik T.P.* Physical and chemical factors of cryodamage and cryoprotection of fowl spermatozoa in a process of low temperature preservation: Author's abstract for obtaining the degree of doctor of sciences.– Kharkov, 2003.– 36 p.
32. *Okladnoy Yu. G., Dyubko T.S.* Unification of an approach for estimation of sensitivity and specificity of new dyes – the potential fluorescent probes for proteins // Funktsionalnye materialy.–2005.–Vol. 12, N3.– P. 583-586.
33. *Hochachka P., Somero J.* Biochemical adaptation.– Moscow: Mir, 1988.– 568 p.
34. *Apel-Paz M., Doncel G.F., Vanderlick T.K.* Impact of membrane cholesterol content on the resistance of vesicles to surfactant attack // Langmuir.– 2005.– Vol. 21, N22.– P. 9843-9849.
35. *Bach D., Miller I.R.* Hydration of phospholipid bilayers in the presence and absence of cholesterol // Biochim. Biophys. Acta.– 1998.– Vol. 1368, N2.– P. 216-224.
36. *Bittman R., Blau L.* The phospholipid-cholesterol interactions/ Kinetics of water permeability in liposomes // Biochemistry.– 1972.– Vol. 11, N25.– P. 4831-4839.
37. *Brzustowicz M.R., Cherezov V., Caffrey M. et al.* Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation // Biophys. J.– 2002.– Vol. 82, N1.– P. 285-298.
38. *Cannon B., Heath G., Huang J. et al.* Time-resolved fluorescence and fourier transform infrared spectroscopic investigations of lateral packing defects and superlattice domains in compositionally uniform cholesterol/phosphatidylcholine bilayers // Biophys. J.– 2003.– Vol. 84, N6.– P. 3777-3791.
39. *Cooper R.A.* Influence of increased membrane cholesterol on membrane function in human red blood cells // J. Supramol. Struct.– 1978.– Vol. 8, N4.– P. 413-430.
40. *Demel R.A., De Kruijff B.* The function of sterols in membranes // Biochim. Biophys. Acta.– 1976.– Vol. 457, N2.– P. 109-132.

19. *Bach D., Miller I.R.* Hydration of phospholipid bilayers in the presence and absence of cholesterol // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1998.– Vol. 1368, N2. – P. 216-224.
20. *Bittman R., Blau L.* The phospholipid-cholesterol interactions/ Kinetics of water permeability in liposomes // *Biochemistry.*– 1972.– Vol. 11, N25.– P. 4831-4839.
21. *Brzustowicz M.R., Cherezov V., Caffrey M. et al.* Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation // *Biophys. J.*– 2002.– Vol. 82, N1.– P. 285-298.
22. *Cannon B., Heath G., Huang J. et al.* Time-resolved fluorescence and fourier transform infrared spectroscopic investigations of lateral packing defects and superlattice domains in compositionally uniform cholesterol/phosphatidylcholine bilayers // *Biophys. J.*– 2003.– Vol. 84, N6.– P. 3777-3791.
23. *Cooper R.A.* Influence of increased membrane cholesterol on membrane function in human red blood cells // *J. Supramol. Struct.*– 1978.– Vol. 8, N4.– P. 413-430.
24. *Demel R.A., De Kruijff B.* The function of sterols in membranes // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1976.– Vol. 457, N2.– P. 109-132.
25. *Dyubko T.S., Nardid O.A., Gorbenko G.P.* Study of structural changes in hepatocyte membranes using inhomogeneous broadening analysis of DSM fluorescence spectra // *Functional Materials.*– 1996.– Vol. 3, N4.– P. 492-495.
26. *Huang J., Feigenson G.W.* A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers // *Biophys. J.*– 1999.– Vol. 76, N4.– P. 2142-2157.
27. *Kakorin S., Brinkmann U., Neumann E.* Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles // *Biophys. Chem.*– 2005.– Vol. 117, N2.– P. 155-157.
28. *Lui J., Yang L.* Effect of cholesterol on DMPC phospholipid membranes and QSAR model construction in membrane-interaction QSAR study through molecular dynamics simulation // *Bioorg. Med. Chem.*– 2006.– Vol. 14, N7.– P. 2225-2234.
29. *McConnell H.* Complexes in ternary cholesterol-phospholipid mixtures // *Biophys. J.*– 2005.– Vol. 88, N4.– P. 23-25.
30. *Mui B., Chow M.J., Hope M.J.* Extrusion technique to generate liposomes of defined size // *Meth. Enzymol.*– 2003.– Vol. 367.– P. 3-14.
31. *Pasenkiewicz-Gierula M., Rog T., Kitamura K., Kusumi A.* Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: a molecular simulation study // *Biophys. J.*– 2000.– Vol. 78, N3.– P. 1376-1389.
32. *Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M.* Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer nonpolar region: a molecular simulation study // *Biophys. J.*– 2001.– Vol. 81, N4.– P. 2190-2202.
33. *Veatch S.L., Keller S.L.* Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol // *Biophys. J.*– 2003.– Vol. 85, N5.– P. 3074-3083.
25. *Dyubko T.S., Nardid O.A., Gorbenko G.P.* Study of structural changes in hepatocyte membranes using inhomogeneous broadening analysis of DSM fluorescence spectra // *Functional Materials.*– 1996.– Vol. 3, N4.– P. 492-495.
26. *Huang J., Feigenson G.W.* A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers // *Biophys. J.*– 1999.– Vol. 76, N4.– P. 2142-2157.
27. *Kakorin S., Brinkmann U., Neumann E.* Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles // *Biophys. Chem.*– 2005.– Vol. 117, N2.– P. 155-157.
28. *Lui J., Yang L.* Effect of cholesterol on DMPC phospholipid membranes and QSAR model construction in membrane-interaction QSAR study through molecular dynamics simulation // *Bioorg. Med. Chem.*– 2006.– Vol. 14, N7.– P. 2225-2234.
29. *McConnell H.* Complexes in ternary cholesterol-phospholipid mixtures // *Biophys. J.*– 2005.– Vol. 88, N4.– P. 23-25.
30. *Mui B., Chow M.J., Hope M.J.* Extrusion technique to generate liposomes of defined size // *Meth. Enzymol.*– 2003.– Vol. 367.– P. 3-14.
31. *Pasenkiewicz-Gierula M., Rog T., Kitamura K., Kusumi A.* Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer polar region: a molecular simulation study // *Biophys. J.*– 2000.– Vol. 78, N3.– P. 1376-1389.
32. *Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M.* Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer nonpolar region: a molecular simulation study // *Biophys. J.*– 2001.– Vol. 81, N4.– P. 2190-2202.
33. *Veatch S.L., Keller S.L.* Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol // *Biophys. J.*– 2003.– Vol. 85, N5.– P. 3074-3083.

Accepted in 12.04.2006

Поступила 12.04.2006