

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 573.356:612.111

ВЛИЯНИЕ АНТИГЕМОЛИТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА СТРУКТУРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ

Н.В.Орлова, Л.В.Цымбал, Н.М.Шпакова*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
69015, Харьков, ул. Переяславская, 23; факс: (0572)72-00-84*

Поступила в редакцию 4 апреля 2002 г.

Методом ЭПР с использованием спиновых зондов с различной трансмембранной локализацией исследована динамическая структура мембраны эритроцитов при действии амфифильных соединений, обладающих антигемолитической активностью. Показана неспецифическая модификация структурно-динамического состояния поверхности и гидрофобной зоны эритроцитарной мембраны в присутствии амфифильных соединений. Степень изменения трансмембранной микровязкости и структурно-функциональное состояние мембраны обусловлены строением полярных участков молекул амфифилов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мембрана эритроцитов, ЭПР, спиновые зонды, динамическая структура, барьерная функция, амфифилы.

При исследовании гипотонического гемолиза эритроцитов Hagerstrand с соавт. показали, что различные по химической структуре амфифильные вещества способны проявлять антигемолитическую активность [1]. Показано также снижение чувствительности эритроцитов человека к гипертоническим средам в присутствии различных амфифильных соединений [2]. Полагают [1], что антигемолитическое действие хлорпромазина обусловлено его разупорядочивающим влиянием на липиды биологических мембран. Авторы работы [1] высказали предположение об возможном участии небислойных фаз в реализации защитного эффекта амфифилов. Однако, механизмы защитного действия амфифильных соединений остаются во многом не изученными.

Настоящая работа посвящена выяснению особенностей структурно-динамического состояния мембран эритроцитов при действии на них амфифильных соединений, обладающих антигемолитической активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы хлорпромазин (ХП), 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат натрия (Z16), додецил- β ,D-мальтозид (ДМ) фирмы Calbiochem, децил- и додецилсульфат натрия (C10 и C12, соответственно) производства фирмы СинтезПАВ.

Эритроциты получали из донорской крови II-ой группы. После удаления плазмы эритроциты дважды отмывали физиологическим раствором (0,15 М NaCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4.) и хранили в виде плотного осадка не более 2 часов при 0 °С. Все использованные в работе среды готовили на 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов (МЭ) исследовали методом ЭПР спиновых зондов [3] с помощью спин-меченых жирных кислот, имеющих нитроксильные фрагменты в различных положениях вдоль гидрофобной цепи: амида пальмитиновой кислоты (АПК), 5-доксилстеариновой кислоты (5-ДС) и 16-доксилстеариновой кислоты (16-ДС) (Sigma). Зонд АПК, меченный в первом положении вдоль углеродной цепи, является удобным инструментом для изучения состояния полярной поверхности мембраны. Зонды 5-ДС и 16-ДС дают информацию о структуре гидратированной анизотропной зоны мембраны (на расстоянии около 10 ангстрем от поверхности) и более гидрофобной области (удаленной от поверхности мембраны на расстояние около 20 ангстрем), соответственно.

Барьерные функции мембраны оценивали по методу добавочного уширения [3] с использованием водорастворимого зонда ТЕМПОН и ионов феррицианида в концентрациях 1 и 100 мМ., соответственно.

Обработку клеток амфифильными соединениями осуществляли инкубированием клеток в физиологическом растворе, содержащем амфифил, при температуре 37 °С. Концентрации веществ соответствовали их оптимальным антигемолитическим концентрациям при гипертоническом гемолизе эритроцитов с учетом гематокрита [2]. Затем эритроциты инкубировали со спиртовыми растворами зонда в течение 20 минут при комнатной температуре. Спин-меченая суспензия эритроцитов во всех экспериментах содержала 100 мкМ зонда и не более 1 % спирта.

Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре ER-100D "Bruker" при комнатной температуре (18-20 °С). В качестве параметра микровязкости МЭ использовали частоту (ν_{-}) вращательной

подвижности зондов АПК и 16-ДС, а также параметр ширины центральной компоненты (ΔH_0) спектра ЭПР зонда 5-ДС. Частоту вращательной подвижности зондов рассчитывали по формуле [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Типичные спектры ЭПР зондов АПК, 5-ДС и 16-ДС в мембране эритроцитов (МЭ) при 20 °С представлены на рис.1. Спектры ЭПР зондов АПК и 16-ДС свидетельствуют о сравнительно быстром вращении нитроксидов на поверхности и в гидрофобной зоне бислоя, в то время как спектр ЭПР зонда 5-ДС отражает существенно анизотропное вращение радикала (рис.1). Кроме того, спектр ЭПР зонда 16-ДС демонстрирует суперпозицию сигналов в высоком поле, что свидетельствует о локализации нитроксидов в микроокружениях с различной полярностью. Параметр перераспределения зонда в этих микрообластях, вычисляемый по отношению интенсивностей «гидрофобного» и «полярного» сигналов (I_H/I_P рис.1) может служить дополнительной характеристикой динамической структуры мембраны. В работе использовали мицеллообразующие амфифильные вещества, являющиеся представителями различных классов: катионный хлорпромазин (ХП), неионный додецил- β ,D-мальтозид (ДМ), анионные децил- и додецилсульфат натрия (С10 и С12, соответственно), цвиттерионный 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат натрия (Z16). Структурные формулы веществ представлены на рис.2. Указанные соединения способны проявлять антигемолитическую активность в условиях гипертонического стресса эритроцитов. Значения эффективных антигемолитических концентраций и величины антигемолитических активностей амфифильных соединений при перенесении эритроцитов в среду, содержащую 4,0 М NaCl, приведены в табл.1 [2].

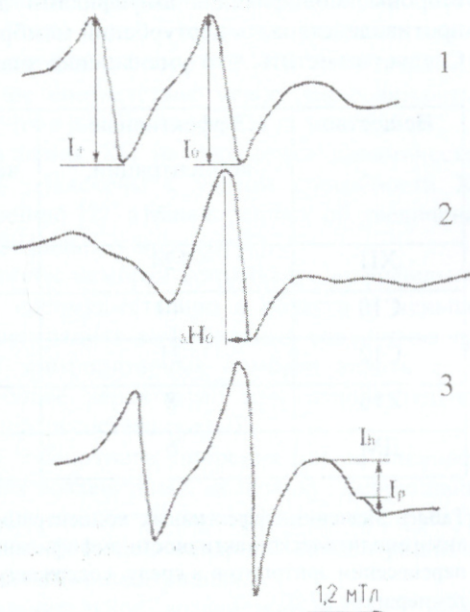


Рис.1 Спектры ЭПР спин-меченых жирных кислот в мембране эритроцитов: 1 - амид пальмитиновой кислоты, 2 - 5-доксилстеариновая кислота, 3 - 16-доксилстеариновая кислота

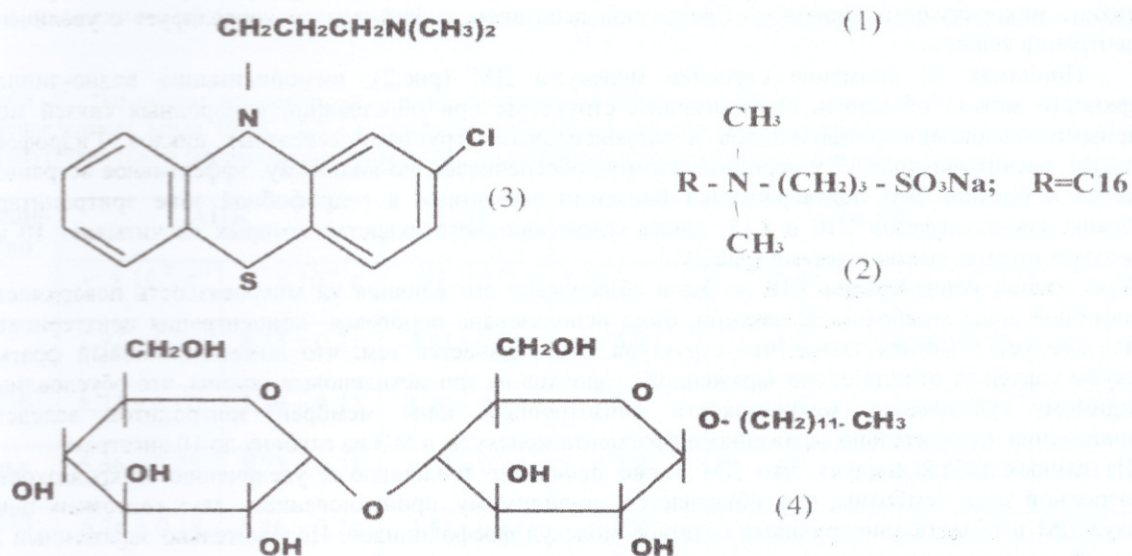


Рис.2 Структурные формулы амфифильных соединений: 1 - децил- и додецилсульфат натрия (С10 и С12, соответственно); 2 - 3-цетилдиметиламмоний-1-пропансульфонат натрия (Z16); 3 - хлорпромазин (ХП); 4 - додецил- β -D-мальтозид (ДМ)

Из представленных данных (табл.1) видно, что значения эффективных защитных концентраций как для катионного ХП, так и для анионных С10 и С12 выше, чем для неионного ДМ и цвиттерионного Z16. Эти результаты позволяют выделить два основных момента в реализации амфифилами антигемолитического действия. С одной стороны, можно предположить важную роль в этом процессе встраивания амфифильных молекул в мембрану без необратимого возмущения ее структуры. С другой стороны, модификация амфифилами динамической структуры МЭ должна быть достаточной, чтобы противодействовать пертурбации мембраны, обусловленной действием гипертонических растворов солей. Следует отметить, что уменьшение значений эффективных защитных концентраций амфифилов может

Вещество	Эффективные концентрации, мкМ	Антигемолитическая активность, %
ХП	124	94 ± 2
С10	40	84 ± 7
С12	21	73 ± 7
Z16	8	65 ± 4
ДМ	6	68 ± 6

Табл.1 Значения эффективных концентраций и максимальной антигемолитической активности амфифильных соединений при перенесении эритроцитов в среду, содержащую 4.0 М NaCl, при температуре 37 °С

мембраной зависит от наличия заряда и длины алкильных «хвостов» молекул. Пертурбирующая активность веществ определяется влиянием их на гидрофобные и электростатические взаимодействия в бислое [5].

Нами было исследовано влияние амфифилов на параметры микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов в трансмембранном направлении. Установлено, что все вещества, за исключением Z16, увеличивают микровязкость водно-липидной поверхности мембраны, причем максимальное действие оказывает ДМ (табл.2). По данным, полученным с использованием зонда 5-ДС, в анизотропной зоне достоверный эффект был обнаружен лишь в случае Z16. В гидрофобной зоне мембраны увеличение микровязкости отмечено под действием ДМ и алкилсульфатов натрия; ХП, напротив, приводит к слабому разрыхлению структуры микроокружения зонда (табл.2). Следовательно, в трансмембранном направлении изменение микровязкости липидного бислоя под действием амфифилов не коррелирует с увеличением концентрации веществ.

Принимая во внимание строение молекулы ДМ (рис.2), иммобилизацию водно-липидной поверхности можно объяснить стабилизацией структуры при образовании водородных связей между полярными «головами» фосфолипидов и гидроксильными группами гексозных циклов. Гидрофобная часть ДМ, насчитывающая 12 углеродных атомов, обеспечивает, по-видимому, эффективное встраивание вещества в бислой. Это подтверждается близкими эффектами в гидрофобной зоне эритроцитарной мембраны алкилсульфатов С10 и С12, длина углеводородного «хвоста» которых насчитывает 10 и 12 углеродных атомов, соответственно (рис.2).

При данной концентрации Z16 не было обнаружено его влияния на микровязкость поверхности и гидрофобной зоны мембраны. Возможно, была использована пороговая концентрация цвиттерионного агента. Следует отметить также, что структура Z16 отличается тем, что диметиламинный фрагмент молекулы удален от отрицательно заряженной «головки» на три метиленовые группы, что обуславливает, по-видимому, увеличение микровязкости анизотропной зоны мембран эритроцитов вследствие проникновения положительно заряженного фрагмента молекулы в МЭ на глубину до 10 ангстрем.

Из данных табл.2 следует, что ДМ также проявляет тенденцию к увеличению микровязкости в анизотропной зоне мембраны, что, объясняется, по-видимому, проникновением двух гексозных циклов молекул ДМ в область глицериновых остатков молекул фосфолипидов. Положительно заряженный ХП, имеющий диметиламинный фрагмент в С-1 положении (рис.2), не приводит к увеличению микровязкости анизотропной зоны мембран эритроцитов (табл.2), что, по-видимому, отвечает локализации заряженной группы не глубже полярных «голов» фосфолипидов. Таким образом, влияние амфифилов на микровязкость липидного бислоя во многом зависит от структуры полярных фрагментов

быть связано со снижением пороговых концентраций, превышение которых будет приводить к повреждению МЭ.

Известно, что в присутствии амфифильных соединений происходит изменение формы эритроцитов [2,4]. Например, ХП вызывает стоматоцитоз, в то время как остальные из исследуемых нами веществ приводят к эхиноцитозу эритроцитов. Таким образом, можно говорить о предпочтительной локализации молекул катионного амфифила во внутреннем монослое и встраивании остальных амфифилов преимущественно во внешний монослой.

Существует сложная взаимосвязь между структурой амфифильных молекул и их способностью встраиваться в мембрану. Распределение амфифилов между водой и

молекул. Антигемолитическая эффективность относительно низких концентраций Z16 и ДМ может быть обусловлена их выраженным действием на структуру гидратированной области МЭ.

При исследовании влияния амфифилов на перераспределение молекул зонда 16-ДС в бислое МЭ (табл.2) было обнаружено, что наиболее заметное действие оказывают молекулы ХП, что проявляется в практически полном исчезновении сигнала от зонда в полярном микроокружении. Исследованные вещества можно расположить в ряду по степени убывания эффекта (уменьшению доли «гидрофобного» сигнала): ХП >> контроль, Z16 ≥ ДМ, С10 > С12. Из данных таблицы 2 видно также, что вещества можно расположить в ряду по степени уменьшения микровязкости в гидрофобной зоне МЭ: ХП > контроль, Z16 > С12 ≥ С10, ДМ. Таким образом, наблюдается определенное соответствие между микровязкостью гидрофобных микрообластей МЭ и сорбирующей способностью их в отношении молекул зонда 16-ДС (за исключением алкилсульфатов). Обнаруженные особенности влияния ХП на параметры динамической структуры и физико-химическое состояние МЭ могут быть объяснены с учетом способности ХП распределяться во внутренней монослой, приводя к его расширению [2], а также данных об увеличении скорости процесса флип-флоп фосфолипидов под действием амфифильных молекул [6].

В силу гетерогенности динамической структуры биологических мембран встраивание амфифильных молекул так же гетерогенно, т.е. распределение происходит преимущественно в области с меньшей микровязкостью. Известно также, что при определенных концентрациях амфифильные соединения при встраивании вызывают возмущение динамической структуры эритроцитарных мембран вплоть до ее везикуляции и разрушения [4]. Эти процессы становятся более вероятными при дополнительном изменении физико-химических условий (температуры, ионной силы и состава среды).

С помощью парамагнитных ионов феррицианида методом добавочного уширения можно оценивать степень нарушения барьерных свойств мембраны при различных воздействиях, поскольку феррицианид не проникает через нативные МЭ и, как показано [7], в небольших концентрациях не влияет на структуру поверхности мембраны. Было исследовано влияние феррицианида в децимолярной концентрации на состояние мембран, модифицированных амфифилами в эффективных концентрациях.

Из данных, представленных в табл.2, видно, что дополнительное воздействие на МЭ ионов феррицианида вызывает изменение микровязкости водно-липидной поверхности. В присутствии феррицианида увеличивается параметр перераспределения зонда 16-ДС, причем происходит «выравнивание» значений этого параметра для различных веществ, за исключением ХП. Увеличение доли «гидрофобного» сигнала свидетельствует о доступности феррицианиду молекул зонда 16-ДС, локализованных в полярной зоне. Очевидно, «полярный» сигнал ЭПР зонда 16-ДС обусловлен частичной растворимостью его молекул в примембранной фазе. Отсутствие резких изменений вида спектров ЭПР гидрофобного зонда (существенного уширения и уменьшения интенсивности компонент) в присутствии амфифилов свидетельствует о его недоступности ионам феррицианида, т.е. о сохранении барьерных свойств мембраны в этих условиях.

Вместе с тем ХП, вероятно, оказывает более сложное воздействие на динамическую структуру МЭ. Если разрушение полярной зоны мембраны при добавлении феррицианида отмечено для ХП и ДМ, то при сравнении эффектов ионов феррицианида на поверхности и в гидрофобной зоне установлено, что

Табл. 2 Параметры вращательной подвижности зондов АПК и 16-ДС (v_+), зонда 5-ДС (ΔH_o) и параметр распределения зонда 16-ДС (I_h/I_p) в мембране эритроцитов, обработанных амфифильными веществами (* - в присутствии ионов феррицианида, амфибиллы расположены в порядке возрастания концентрации). $n = 6$

Вещество	АПК		5-ДС	16-ДС			
	$v_- \times 10^{-8}, c^{-1}$	$v_+^* \times 10^{-8}, c^{-1}$	$\Delta H_o, 10^{-4}Tл$	I_h/I_p	I_h^*/I_p^*	$v_- \times 10^{-8}, c^{-1}$	$v_+^* \times 10^{-8}, c^{-1}$
-	7,92 ± 0,24	8,23 ± 0,21	3,51 ± 0,15	3,0	4,0	4,98 ± 0,22	4,6 ± 0,17
Z16	8,23 ± 0,20	5,39 ± 0,22	3,90 ± 0,19	3,1	3,5	5,08 ± 0,24	4,37 ± 0,25
ДМ	5,66 ± 0,25	8,73 ± 0,27	3,77 ± 0,17	2,8	3,7	4,18 ± 0,25	4,20 ± 0,27
С10	6,76 ± 0,18	5,26 ± 0,24	3,51 ± 0,14	2,8	3,6	4,27 ± 0,26	4,84 ± 0,28
С12	6,76 ± 0,21	5,68 ± 0,28	3,38 ± 0,20	2,2	3,5	4,52 ± 0,23	4,16 ± 0,28
ХП	6,02 ± 0,26	7,69 ± 0,29	3,64 ± 0,22	4,6	8,0	5,38 ± 0,20	6,54 ± 0,25

лишь в случае ХП разрыхление полярной зоны сопровождается уменьшением микровязкости вблизи концевых групп «хвостов» фосфолипидов (табл.2). Наблюдаемое под действием ХП и феррицианида снижение микровязкости липидов может свидетельствовать о появлении внутримембранных мицелл или эндогенных везикул, содержащих молекулы зонда. Последнее предположение согласуется с результатами работы [1], в которой методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии показали наличие эндогенных везикул в эритроцитах в присутствии ХП.

Таким образом, нами установлено, что при значительных изменениях микровязкости мембран эритроцитов под действием амфифилов сохраняются барьерные свойства бислоя в отношении парамагнитных ионов. Однако при определенных концентрациях веществ, что обусловлено строением амфифильных молекул, отмечена тенденция к реорганизации динамической структуры мембраны. Эта модификация состояния мембраны отражает неспецифическое нарушение баланса гидрофильно-гидрофобных взаимодействий и, как результат, изменение упаковки липидов в латеральном и трансмембранном направлениях. Возможность образования небислойных структур в природных мембранах, а также их роль в устойчивости клеток при резком изменении условий внешней среды требует дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

Исследовано влияние амфифильных агентов на параметры динамической структуры мембран эритроцитов в трансмембранном направлении. Показана неспецифическая модификация состояния мембраны эритроцитов в присутствии амфифильных соединений. Трансмембранная локализация эффекта определяется строением молекул исследуемых амфифильных веществ. Возмущение динамической структуры эритроцитарной мембраны не сопровождается нарушением ее барьерных свойств в отношении парамагнитных ионов. Полученные данные позволяют предположить существование небислойных фаз в мембране эритроцитов в присутствии амфифилов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hagerstrand H, Izooma B. // Chem.-Biol. Interactions 1991. 79. P.335-347.
2. Кулешова Л.Г., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. // Пробл. криобиологии.-2001 № 1. С.9-15.
3. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии.-М.: Наука, 1974.- 256 с.
4. Schrier S., Malheiros S.V.P., Paula E. // Biochim. Biophys. Acta -2000 -1508, N 1-2. P.210-234.
5. Kursch B., Lulimann H., Mohr K. // Biochem Pharmacol. 1983. 32, N 17. P.2589-2594.
6. Pantaler E., Kamp D., Haest C.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. 1509, N 1-2. P.397-408.
7. Гребенщиков Ю.Б., Тимофеев О.Н., Лихтенштейн Г.И., Мошковский Ю.Ш. // Биофизика. 1983. 28. № 4. С.637-643.