

тативной репарации, а спирты — на уровне первичных физико-химических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амиртаев К. Г., Красавин Е. А., Козубек С., Нямсамбуу А. *Studia Biophysica*, 106, 131, 1985.
2. Калинин В. Л. и др. *Радиобиология*, 19, 548, 1979.
3. Калинин В. Л., Вербенко В. И. В кн.: Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. 95. М., 1983.
4. Козубек С., Красавин Е. А. *ОИЯИ*, 19—83—744, Дубна, 1983.
5. Козубек С., Красавин Е. А. *ОИЯИ*, 19—83—743, Дубна, 1983.
6. Кузнецова Е. А. и др. *Радиобиология*, 23, 730, 1983.
7. Bresler S. E. et al. *Molec. Gen. Genet.*, 163, 75, 1978.
8. Kozubek S., Krasavin E. A. *Neoplasma*, 31, 685, 1984.

Поступило 10.11 1987 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 4, 1988

УДК 577.352.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАНЫ ЛЕЦИТИНОВЫХ ЛИПОСОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ДЕЗОКСИХОЛАТА НАТРИЯ

Т. Г. АМБАРЦУМЯН, С. Я. АДАМЯН, Г. Г. МАРИКЯН, Л. С. ПЕТРОСЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

Показано, что падение микровязкости мембраны лецитиновых липосом при действии детергента связано с формированием смешанных мицелл после достижения детергентом критической концентрации мицеллообразования. В этих условиях различная степень омовивания не меняет «индекса окисления» липосомальной мембраны.

Ցույց է տրված, որ միցիլիզացիայի ժամանակ միջամասնագործության ընկեր կապված է խառը միցելների ձևավորման հետ զետերգենտի միցելո-մասնավորման կրիտիկական կոնցենտրացիային հասնելուց հետո: Ինքնամասնավորման ճանաչարման աստիճանը տվյալ պայմաններում չի փոխում ինչդի «օքսիդացման ինդեքսը»:

Microviscosity of lecithin liposome membrane modified by sodium deoxycholate has been studied. It has been shown that the decrease of microviscosity is due to the forming of mixed micelles when the detergent of critical micellization concentration is achieved. Also it has been demonstrated that various degrees of liposome sonication do not change the lipid "oxidation index" under these conditions.

Липосомальная мембрана — микровязкость — детергент — «индекс окисления».

Известно, что проницаемость липидной мембраны может существенно меняться в зависимости от жидкостности мембраны [1, 4] и степени

Сокращения: ДХН — дезоксихолат натрия; ДФГТ — 1,6-дифенил-1,3,5-трисубстит. ККМ — критическая концентрация мицеллообразования; ЯМР — ядерный магнитный резонанс

окисления липидов [9]. Ранее нами было показано, что проникаемость лецитиновых липосом повышается с увеличением концентрации ДХНа [1]. В связи с этим естественно было проперить, обусловлено ли это увеличение только изменением вязкостных свойств мембраны или и перекисным окислением липидов, связанным с длительностью озвучивания суспензии липосом на воздухе.

Материал и методика. В опытах использовали озвученные ушлямеллярные липосомы из яичного лецитина (концентрация 10, 25 и 50 мМ) и ДХНа при различных соотношениях детергента: липид (R). При низких значениях R в отсутствие детергента озвучивание проводили в течение 10 мин. Подробно метод получения липосом и их характеристика приводится в предыдущих работах [1, 2]. Размер липосом и оптическую плотность суспензии определяли методом светорассеяния на «Spreco» M40, (ГДР) [2, 3]. Для определения «индекса окисления» липосомальной мембраны измеряли оптическую плотность суспензии в диапазоне длин волн $\lambda = 215-233$ нм [9].

В качестве флуоресцентной метки использовали ДФГТ, известный как метка для углеводородной области мембраны [11]. ДФГТ предварительно растворяли в тетрагидрофуране, а затем разбавляли в 150 раз используемом буферном растворе. Раствор ДФГТ вводили в суспензию так, чтобы соотношение липид:ДФГТ равнялось 1000:1. Обычно концентрация липидов в клетке составляла 10^{-4} М, а концентрация флуоресцентной метки 10^{-7} М. Низкая концентрация метки исключает возможность переноса энергии между молекулами ДФГТ, а низкая концентрация липидов уменьшает вклад рассеяния и регистрируемую интенсивность флуоресценции. Введение метки в липосомальную суспензию проводили двумя способами либо вместе с буфером при смывании сухой липидной пленки, и тогда суспензию озвучивали уже с введенной в раствор меткой; либо вводили ее в уже сфигурингованную суспензию ушлямеллярных липосом за 1,5–2,0 ч до проведения измерений. Интенсивность спектров флуоресценции не зависела от способа введения зонда.

Измерение флуоресценции проводили на флуориметре Perkin—Elmer MPF-43A (ГДР). Образец возбуждали вертикально поляризованным светом. При ориентации регистрирующего поляризатора параллельно направлению поляризованного возбуждения регистрировалась $J_{\parallel}$, при перпендикулярном положении регистрировалась интенсивность $J_{\perp}$. Для учета вклада рассеяния в флуоресценцию параллельно проводили «холостой опыт», в котором контрольный образец отличался от исследуемого лишь отсутствием в нем метки.

Анизотропию (r) вычисляли по формуле:

$$r = \frac{(J_{\parallel} - GJ_{\perp}) - (J'_{\parallel} - GJ'_{\perp})}{(J_{\parallel} + 2GJ_{\perp}) - (J'_{\parallel} + 2GJ'_{\perp})}$$

где $J'_{\parallel}$ и $J'_{\perp}$ — параллельная и перпендикулярная составляющие флуоресценции в условиях «холостого опыта», G — так называемый G -фактор, представляющий собой отношение чувствительностей детектирующей системы для вертикально и горизонтально поляризованного света.

Возбуждение флуоресценции ДФГТ проводили на длине волны 360 нм, ширина щели 6 мм.

Для определения микровязкости мембраны в качестве калибровочного раствора использовали различные концентрации вязелинового масла и гентана (0, 10, 25, 40, 50, 60, 75, 90 и 100%).

Каждая серия содержала от 3 до 6 опытов. Все опыты проводили при 23°.

Результаты и обсуждение. Для определения микровязкости липосомальной мембраны (η) определяли анизотропию r системы методом флуоресцентной поляризации с помощью гидрофобного зонда ДФГТ. Говоря о вязкости, обычно подразумевают подвижность флуоресцентного зонда в асимметричной системе, скорость движения которого опре-

деляется микроструктурой его непосредственного окружения в мембране. Практически здесь имеется в виду некий эквивалент, соответствующий вязкости однородной среды, в которой зонд двигался бы с той же скоростью, что и в мембране.

В качестве такой однородной среды был взят раствор вазелинового масла в гептане в разных концентрациях. Вязкость этого контрольного раствора для каждой концентрации масла определяли с помощью вискозиметра Освальда, а анизотропию соответствующего раствора — на флуориметре. Затем строили калибровочную кривую зависимости анизотропии от вязкости, с помощью которой определяли вязкость образца. Однако этот метод пригоден, когда время вращательной релаксации зонда τ не зависит от вязкости. Предположив, что это именно так, мы провели измерения анизотропии и соответственно нашли значения вязкости. Калибровочная кривая зависимости τ от η приведена на рис. 1. На нее нанесены точки, соответствующие значениям анизотропии при различных величинах η .

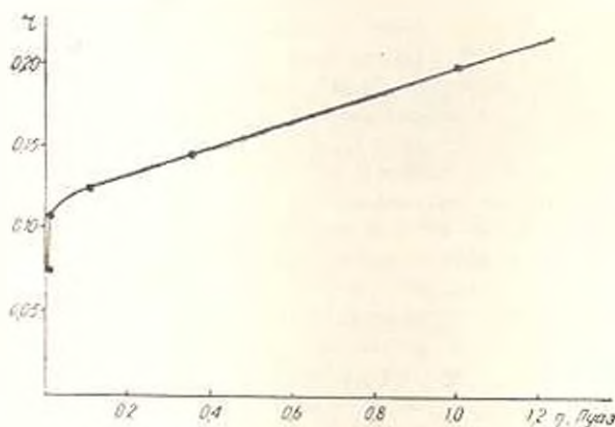


Рис. 1. Калибровочная кривая для оценки микровязкости мембран. Приведены данные по анизотропии (τ) ДФГТ как функции вязкости (η) различных концентраций вазелинового масла в гептане.

Найденные значения η как функция R приведены на рис. 2. Видно, что падение микровязкости мембраны с ростом отношения детергент-липид, вероятно, отражает картину встраивания детергента, вызывающего разжижение мембраны. Видно также, что падение η начинается при $R=0,2$. Это значение R соответствует концентрации ДХNa 1 мМ, являющейся ККМ ДХNa.

Таким образом, только после достижения своей ККМ ДХNa начинает встраиваться в мембрану, что отличает его от Triton-X 100, который встраивается в мембрану при концентрации ниже своей ККМ [7]. Небольшое падение η с ростом концентрации ДХNa связано с постепенным насыщением мембраны детергентом. Дальнейшее увеличение концентрации детергента приводит к образованию смешанных мицелл, обладающих более жидкой структурой, чем бислой ($\eta=0,1$ пуаз) (см. рис. 2). Изучение спектров ЯМР смешанных липосом, полученных из фосфати-

дифхоллина, солюбилизованного октилглюкозидом [8], также свидетельствует о меньшей упорядоченности смешанных мицелл по сравнению с бислоем.

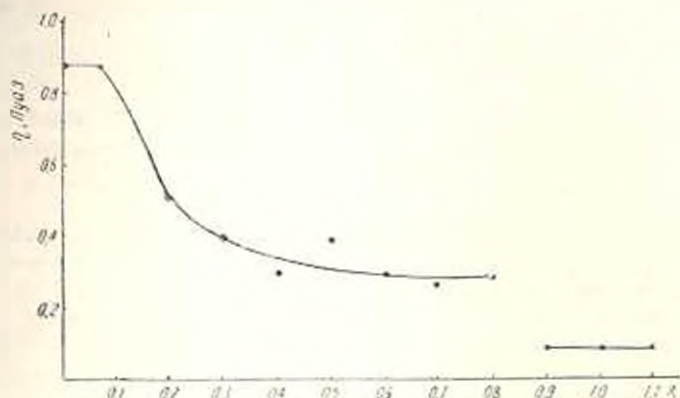


Рис. 2. Микровязкость мембраны (η) как функция соотношения детергент-липид (R) в суспензии. Концентрация липида равна 25 мМ. Приведен индивидуальный опыт.

Следовательно, наблюдаемое повышение проницаемости липосомальной мембраны [1] связано с разжижением мембраны, вызванным встраиванием детергента в мембрану.

Так как липосомы с нулевой или низкой концентрацией ДХНа озвучивались довольно долго, то следовало проверить возможность влияния длительного озвучивания на перекисное окисление липидов, чтобы убедиться в том, что различия в жидкости мембран не связаны со степенью окисления липидов. Для этого мы определяли «индекс окисления» (A), предложенный в работе [9], т. е. измеряли отношения максимумов абсорбции липосомальной суспензии при длинах волн, равных 233 и 215 нм. Согласно теории самоокисления липидов, существенной стадией окисления является конъюгация диеновых связей с последующим формированием гидроперекисей [5, 6]. Увеличение оптической плотности при $\lambda = 233$ нм связано с появлением гидроперекисей диеновых связей [10] и является ранним показателем процесса окисления.

Определение «индекса окисления» в диапазоне значений $R = 0 \div 0,7$ показало независимость процессов окисления от концентрации детергента: $A = 0,33 \div 0,36$. При $R = 0,9 \div 1,3$ значение A несколько возрастает и становится равным 0,44. Возможно, это связано с резким увеличением мутности суспензии при данных соотношениях и, следовательно, обусловлено вкладом рассеяния в оптическую плотность.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что увеличение проницаемости липидной мембраны связано с изменением ее микровязкости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алавердян Т. Г., Адамян С. Я., Марилян Г. Г., Петросян Л. С. Биол. ж. Армении, 10, 200–204, 1987.

2. Амбарцумян Т. Г., Адамян С. Я., Марилян Г. Г., Петросян Л. С. Биофизика (в печати).
3. Кленин В. И., Шеголов С. Ю., Лаврушин В. И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. Саратов, 1977.
4. Brunner J., Skrabal P., Hauser H. Biochim. et Biophys. Acta, 455, 322—331, 1976.
5. Farmer E., Satten J. Chem. Soc., 1, 9, 1943.
6. Holman T.: In Human R. T., Lundberg W. O., Matkin T. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids, 2, 51, London, 19 4.
7. Inou K., Kitagawa T. Biochem. et Biophys. Acta, 237, 361—372, 1971.
8. Jackson M. L., Schmidt C. E., Lichtenberg D., Litman B. J., Albert A. D. Biochemistry, 21, 4576—4582, 1982.
9. Klein R. A. Biochim. et Biophys. Acta, 233, 454—455, 1970.
10. Lea C. H. In Popjak and Le Preton. Biochemical Problems of Lipids, Butterworths 81, London, 1955.
11. Shintsky M., Barenholz Y. J. Biol. Chem., 249, 2652, 1974.

Поступило 26 XI 1987 г.

Биол. ж. Армении, т. 41, № 4, 1988

УДК 612.118.221.346.41

КИСЛОТНЫЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ. ВЛИЯНИЕ ХЛОПРОМАЗИНА

М. М. КОРХМАЗИН, Л. Г. МИКАЕЛЯН

Ереванский физический институт ГКАЭ СССР

Показано, что кислотный гемолиз эритроцитов является сложным много-
стадийным процессом, связанным с нарушением целостности плазматиче-
ской мембраны эритроцитов. При $\text{pH} > 3$ 10^{-5} М оказывает стабилизирующее влияние на структуру эритроцитов,
не предотвращая при этом гемолиза.

Քառուկանոթիկը և թրթռյալն ճնշողի որոշ փուլեր, առարկության գործնական
համապատասխան կրթական փուլի փուլ ձգողները թույլ և անհրաժեշտ
ճնշողի բարդ շնչով, որը ներառում է մեմբրանների վնասման մի քանի փու-
լեր: Քլորոպրոմազինը $3.5 \cdot 10^{-5}$ Մ կոնցենտրացիոն, երբ $\text{pH} > 3$, առաջ է դե-
րում մեմբրանային կառուցվածքի որոշակի կայունացում՝ բնորոշումը անփոփոխ
վածքով թրթռյալն ճնշողի:

Some aspects of acidic hemolysis of erythrocytes with an emphasis on initial phase of it have been studied. Results show the complex nature of
acidic hemolysis, which includes various stages of erythrocytic membrane
damage. $3.5 \cdot 10^{-5}$ M chlorpromazine at $\text{pH} > 3$ causes some stabilization
of membrane structure without prevention of hemolysis.

Эритроциты — кислотный гемолиз — хлорпромазин.

Известно, что амфифильные лекарственные соединения при определен-
ных концентрациях оказывают стабилизирующее влияние на устойчи-
вость эритроцитов к осмотическому лизису [6]. Механизм осмотиче-
ского гемолиза давно и интенсивно исследуется. Установлена важная
роль мембраны как в процессе гемолиза, так и в модификации этого про-

Сокращения: XII — хлорпромазин.