

УДК 577.352:616—006.487

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ C 1300 С ИЗМЕНЕННЫМ ЛИПИДНЫМ СОСТАВОМ

ВОЛКОВ Г. Л.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

На моделях культивируемых клеток мышинной нейробластомы C1300 N18 с направленно измененным липидным составом показано, что повышение или понижение содержания холестерина в плазматической мембране не сопровождается каким-либо нарушением ее нормальной микровязкости. Отмечается, что ранее обнаруженная перестройка липидного бислоя, вызванная изменением концентрации холестерина в плазматической мембране, носит характер компенсации уплотняющего эффекта холестерина. Обсуждается вопрос о роли холестерина и ацильных цепей липидов как основных агентов липидного бислоя в процессе компенсации возникающих возмущений микровязкости плазматической мембраны живой клетки.

Многочисленные эксперименты на искусственных и биологических мембранах свидетельствуют, что холестерин, введенный тем или иным способом в липидный бислой, вызывает увеличение его микровязкости [1—5]. С другой стороны, эксперименты, выполненные в опытах на ряде мембранных препаратов, противоречат, казалось бы, постулированному положению о холестерине как конденсирующем агенте. Garda, Brenner не обнаружили существенного увеличения микровязкости фракции микросом при накоплении в ней холестерина [6, 7]. Необходимо отметить, что ранее при исследовании транспорта $^{86}\text{Rb}^+$ из предварительно нагруженных изотопом клеток нейробластомы C1300 с повышенным или пониженным содержанием холестерина мы не установили изменений в базальном выходящем токе одновалентного катиона [8], что косвенно может свидетельствовать в пользу выводов Garda, Brenner. Кроме того, при исследовании клеток мышинной нейробластомы C1300 N18 с повышенным или пониженным содержанием холестерина нами показано, что активность ряда ферментов липидного обмена в плазматической мембране и клетке в целом зависит от уровня холестерина. Накопление /снижение холестерина в указанной мембране активирует /ингибирует лецитин:холестерин:ацетилтрансферазу и десатуразы высокомолекулярных ацильных цепей фосфолипидов, что приводит к накоплению /снижению в мембране эфиров холестерина, лизофосфатидилхолина и полиненасыщенных ацильных цепей липидов. Наряду с этим ингиби-

руется/активируется в клетке синтез собственного холестерина и насыщенных высокомолекулярных жирных кислот [9—14].

С нашей точки зрения эти холестеринзависимые процессы усилили ярко выраженный характер компенсации конденсирующего эффекта холестерина на липидный бислой плазматической мембраны [3].

Таким образом, разрешить возникающее противоречие можно было только в эксперименте по определению микровязкости плазматической мембраны клеток с измененным содержанием холестерина, что и явилось целью данной работы.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на культивируемых клетках мышинной нейробластомы C1300 N18, используя методические подходы, описанные ранее [8—12]. В результате инкубации с фосфатидилхолиновыми или фосфатидилхолинхолестеринновыми липосомами в заданных условиях получали жизнеспособные клетки с пониженным или повышенным содержанием холестерина [9—15]. Изменения в содержании липидов в клетке и мембранных фракциях регистрировали разработанными нами методами [16]. Контрольные клетки проводили через все процедуры, но без липосом.

Высокоочищенные плазматические мембраны и фракцию микросом выделяли по разработанному нами методу [17]. Приготовление проб и измерения поляризации флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГТ) и перилена («Sigma», США) проводили в соответствии с методическими рекомендациями McVey и соавт. [18]. Степень эксимеризации бензофенантрена пирена («Sigma», США) измеряли по методу, описанному Макаровой и соавт. [19].

Результаты и обсуждение

Для определения микровязкости плазматической мембраны клеток нейробластомы C1300 N18 с измененным содержанием холестерина мы выбрали метод измерения поляризации флуоресценции ДФГТ и перилена, а также интенсивностей флуоресценции эксимеров и мономеров пирена. Чем вызвано использование именно этих зондов? Во-первых, ДФГТ и перилен при соблюдении определенных ограничений при приготовлении образцов характеризуют плотность упаковки углеводородных цепей бислоя [20]. Во-вторых, пирен характеризует два взаимосвязанных, но не одинаково изменяющихся параметра—плотность упаковки углеводородных цепей липидов и гидрофобный объем бислоя [20, 21]. В-третьих, три указанных зонда обычно располагаются в различных, но перекрывающихся зонах фосфолипидов: ДФГТ—глицеринный остаток и ацильные цепи, перилен—ацильные цепи, пирен—ацильные цепи и концевые метильные группы [20].

Данные по измерению поляризации флуоресценции ДФГТ и пери-

Таблица 1

Поляризация флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена в целых клетках, плазматической мембране и фракции микросом при инкубации клеткок мышиной нейробластомы С1300 N18 с липосомами различного состава (5,0 мкмоль фосфатидилхолина на 1 мл липосом); $M \pm m$

Липосомы	Время инкубации (мин)	Целые клетки (n=5)		Плазматическая мембрана (n=3)		Мембраны микросом (n=3)	
		поляризация	степень	поляризация	степень	поляризация	степень
Контроль	—	$0,209 \pm 0,008$	1,000	$0,319 \pm 0,019$	1,000	$0,248 \pm 0,017$	1,000
Фосфатидилхолиновые	15	$0,205 \pm 0,015$	0,981	$0,322 \pm 0,025$	1,009	$0,233 \pm 0,014$	0,980
	30	$0,201 \pm 0,011$	0,976	$0,307 \pm 0,034$	0,962	$0,237 \pm 0,021$	0,955
	45	$0,145 \pm 0,017^{**}$	0,695	$0,311 \pm 0,029$	0,978	$0,189 \pm 0,018^*$	0,762
	60	$0,139 \pm 0,018^{**}$	0,666	$0,295 \pm 0,027$	0,925	$0,175 \pm 0,025^*$	0,706
	75	$0,120 \pm 0,015^{***}$	0,574	$0,168 \pm 0,019^{**}$	0,527	$0,164 \pm 0,026^*$	0,661
	90	$0,093 \pm 0,011^{***}$	0,445	$0,162 \pm 0,028^{**}$	0,508	$0,138 \pm 0,029^*$	0,558
Фосфатидилхолинхолестериновые	15	$0,217 \pm 0,009$	1,038	$0,330 \pm 0,020$	1,034	$0,251 \pm 0,019$	1,012
	30	$0,223 \pm 0,017$	1,067	$0,316 \pm 0,017$	0,991	$0,264 \pm 0,023$	1,065
	45	$0,253 \pm 0,020$	1,211	$0,334 \pm 0,027$	1,047	$0,338 \pm 0,025^*$	1,404
	60	$0,296 \pm 0,011^*$	1,416	$0,382 \pm 0,029$	1,197	$0,350 \pm 0,029^*$	1,411
	75	$0,312 \pm 0,033^*$	1,493	$0,402 \pm 0,029$	1,260	$0,368 \pm 0,027^*$	1,484
	90	$0,321 \pm 0,034^*$	1,536	$0,398 \pm 0,016^*$	1,248	$0,362 \pm 0,030^*$	1,460

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

лена, а также степени эксимеризации пирена — представлены в табл. 1—3. Важно отметить, что во всех экспериментах время затухания флуоресценции ДФГТ ($\tau=8,0-8,4$ нс), перилена ($\tau=5,4-5,8$ нс) и пирена ($\tau=46-51$ нс) практически не изменялось и соответствовало результатам подобных экспериментов [3, 18].

Обнаружение нами флуоресценции всех трех зондов во фракции микросом свидетельствует о проникновении их внутрь клетки и согласуется с литературными данными [22, 23].

Как следует из результатов, представленных в табл. 1—3, поляризация флуоресценции ДФГТ и перилена, а также степень эксимеризации пирена в целых клетках остается неизменной в течение очень короткого времени инкубации с липосомами (не более 30 мин), что соответствует увеличению содержания холестерина на 10—11% или снижению его концентрации на 9—10% в целой клетке. При дальнейшем изменении концентрации стерина в клетке параметры флуоресценции зондов соответственно резко изменяются. Параллельно параметрам поведения зондов в целой клетке регистрируется повышение или снижение поляризации флуоресценции ДФГТ и перилена, а также степени эксимеризации пирена в мембранах фракции микросом. При концентрации стерина во фракции микросом от +12 до +143% поляризация флуоресценции ДФГТ возрастает от 10 до 50%, а перилена от 10 до 35%; степень эксимеризации пирена снижается от 15 до 70%. В случае снижения концентрации стерина от —20 до —60% поляризация флуоресценции ДФГТ снижается на 25—45%, перилена на 10—40%; степень эксимеризации пирена возрастает на 20—50%.

Эти данные свидетельствуют об изменении плотности упаковки ацильных цепей фосфолипидов, то есть о повышении микровязкости мембран микросом при накоплении в них холестерина и её снижении при удалении из них стерина.

Поведение зондов в плазматической мембране клеток в течение всего времени накопления или снижения содержания в ней холестерина не изменяется. Следует учесть, что максимально возможное изменение содержания холестерина в плазматической мембране клеток нейробластомы C1300 N18 достигается уже через 10—30 мин при инкубации с липосомами различного состава [11—15].

Таким образом, поведение флуоресцентных зондов в процессе изменения содержания холестерина при измерениях на целой клетке фактически зависит от поведения зондов во фракции микросом и повышения или понижения микровязкости последней в связи с изменением в ней содержания холестерина. Действительно, в период накопления/снижения холестерина в плазматической мембране (10—30 мин инкубации с липосомами) изменений в параметрах флуоресценции зондов мы не наблюдали, так как в этот период еще не осуществлялся трансмембранный перенос холестерина (плазматическая мембрана-микросомы) [9—14]. Как только холестерин начинал

Таблица 2

Поляризация флуоресценции перилена в целых клетках, плазматических мембранах
и фракции микросом при инкубации клеток мышечной нейробластомы С1300 N18
с липосомами различного состава (5,0 мкмоль фосфатидилхолина
на 1 мл липосом), $M \pm m$

Липосомы	Время инкубации (мин)	Целые клетки (n=5)		Плазматические мембраны (n=)		Мембраны микросом (n=)	
		поляризация	степень	поляризация	степень	поляризация	степень
Контроль	—	$0,078 \pm 0,006$	1,000	$0,118 \pm 0,004$	1,000	$0,206 \pm 0,007$	1,000
Фосфатидил- холиновые	15	$0,076 \pm 0,007$	0,974	$0,117 \pm 0,007$	0,992	$0,211 \pm 0,008$	1,024
	30	$0,082 \pm 0,006$	0,795	$0,110 \pm 0,004$	0,932	$0,193 \pm 0,006$	1,937
	45	$0,041 \pm 0,006^{**}$	0,523	$0,123 \pm 0,005$	1,042	$0,131 \pm 0,004^{***}$	0,650
	60	$0,034 \pm 0,005^{**}$	0,436	$0,105 \pm 0,012$	0,893	$0,117 \pm 0,006^{***}$	0,568
	75	$0,02 \pm 0,003^{***}$	0,282	$0,081 \pm 0,009^{**}$	0,686	$0,122 \pm 0,007^{***}$	0,592
	90	$0,014 \pm 0,003^{***}$	0,179	$0,074 \pm 0,003^{***}$	0,627	$0,12 \pm 0,004^{***}$	0,583
Фосфатидил- холинхолес- териновые	15	$0,074 \pm 0,005$	1,940	$0,112 \pm 0,003$	0,949	$0,201 \pm 0,007$	0,976
	30	$0,083 \pm 0,005$	1,128	$0,116 \pm 0,005$	0,983	$0,207 \pm 0,008$	1,005
	45	$0,099 \pm 0,006^*$	1,269	$0,121 \pm 0,011$	1,025	$0,263 \pm 0,016^*$	1,277
	60	$0,108 \pm 0,007^*$	1,359	$0,123 \pm 0,006$	1,042	$0,269 \pm 0,001^{***}$	1,403
	75	$0,118 \pm 0,010^{**}$	1,513	$0,168 \pm 0,005^{***}$	1,421	$0,291 \pm 0,016^{**}$	1,413
	90	$0,132 \pm 0,013^{**}$	1,692	$0,163 \pm 0,006^{***}$	1,481	$0,283 \pm 0,013^{**}$	1,374

Таблица 3

Степень эксимеризации пирена (выражена отношением интенсивностей флуоресценции эксимерной и мономерной форм, I_3/I_1) в целых клетках, плазматических мембранах и фракции микросом при инкубации клеток мышинной нейробластомы C1300 N18 с липосомами различного состава (5,0 мкмоль фосфатидилхолина на 1 мл липосом), $M \pm m$

Липосомы	Время инкубации (мин)	Целые клетки n=5		Плазматические мембраны. n=3		Мембраны микросом n=3	
		степень эксимеризации	соотношение	степень эксимеризации	соотношение	степень эксимеризации	соотношение
Контроль	—	$0,603 \pm 0,027$	1,000	$0,762 \pm 0,031$	1,000	$0,814 \pm 0,026$	1,000
Фосфатидил-холиновые	15	$0,589 \pm 0,034$	0,992	$0,784 \pm 0,032$	1,029	$0,829 \pm 0,012$	1,018
	30	$0,718 \pm 0,029^*$	1,191	$0,769 \pm 0,037$	1,009	$0,962 \pm 0,041^*$	1,182
	45	$0,764 \pm 0,021^*$	1,267	$0,770 \pm 0,052$	1,010	$1,103 \pm 0,084^*$	1,355
	60	$0,790 \pm 0,043^{**}$	1,310	$0,789 \pm 0,043$	1,035	$1,173 \pm 0,076^{**}$	1,447
	75	$0,838 \pm 0,051^{**}$	1,390	$0,846 \pm 0,041$	1,110	$1,206 \pm 0,088^{**}$	1,482
	90	$0,907 \pm 0,064^{**}$	1,504	$0,938 \pm 0,049^*$	1,231	$1,200 \pm 0,072^{**}$	1,474
Фосфатидил-холинхопестеринные	15	$0,590 \pm 0,036$	0,978	$0,794 \pm 0,053$	1,042	$0,800 \pm 0,068$	0,983
	30	$0,482 \pm 0,020^{**}$	0,799	$0,751 \pm 0,038$	0,986	$0,591 \pm 0,043$	0,849
	45	$0,389 \pm 0,028^{***}$	0,645	$0,759 \pm 0,033$	0,996	$0,562 \pm 0,029^{**}$	0,691
	60	$0,305 \pm 0,023^{***}$	0,506	$0,775 \pm 0,042$	1,017	$0,448 \pm 0,037^{**}$	0,538
	75	$0,223 \pm 0,019^{***}$	0,370	$0,613 \pm 0,039^*$	0,804	$0,351 \pm 0,024^{***}$	0,431
	90	$0,164 \pm 0,012^{***}$	0,305	$0,428 \pm 0,030^{**}$	0,562	$0,212 \pm 0,028^{***}$	0,260

поступать извлекаться из фракции микросом, немедленно менялись параметры флуоресценции зондов в целой клетке. Близкий к этому результат был получен McVey и соавт. [18] при изучении поляризации флуоресценции ДФГТ и перилена в EL4 клетках, выращенных на различных насыщенных и ненасыщенных жирных кислотах. Авторы при обнаружении накопления в плазматической мембране различных жирных кислот (от 6,7 до 40,3%) изменений в степени поляризации зондов не зарегистрировали, однако получили достоверные различия на целой клетке. Мы пришли к заключению, что изменения поляризации флуоресценции на целых клетках при использовании ДФГТ и перилена не дают объективной информации о физическом состоянии плазматических мембран. Такие же выводы из подобных исследований сделали и другие авторы [24, 25], предположив, что флуоресцентные исследования на целой клетке суммируют информацию и о физическом статусе внутриклеточных липидных компартментов. Наши исследования убедительно показывают, что существует достаточно близкая корреляция изменения в поведении зондов целой клетки и фракции микросом. Это указывает на то, что состояние липидного бислоя микросом (и, по-видимому, всех эндоплазматических мембран) вносит основную информацию при флуоресцентных исследованиях на целой клетке.

Выше было отмечено, что микровязкость плазматической мембраны клеток нейробластомы C1300 N18 при изменении в ней концентрации холестерина не изменяется. Но нельзя оставить без внимания разительные изменения поляризации флуоресценции и степени эксимеризации зондов в плазматической мембране в последние сроки инкубации с липосомами (75—90 мин). Эти изменения непосредственно не связаны с повышением или снижением содержания холестерина в плазматической мембране [9—14]. Скорее всего, происходит следующее. Первые 60 мин инкубации повышенное или пониженное содержание холестерина в плазматической мембране компенсируется работой ферментов липидного обмена, трансмембранным переносом холестерина, а также ингибированием/активированием ферментных систем микросом, ответственных за синтез собственного холестерина и высокомолекулярных жирных кислот. Однако к 75-ой мин инкубации механизмы компенсации полностью исчерпывают собственные резервы. И теперь любое дополнительное встраивание/извлечение холестерина плазматическая мембрана компенсировать не в состоянии, так как все резервы исчерпаны, и наступает гибель клетки [11—15]. Таким образом, изменения в поведении зондов в плазматической мембране через 75—90 мин инкубации клеток с липосомами отражают физическое состояние липидного бислоя уже погибшей клетки, то есть ситуацию, когда все возможные резервы компенсации исчерпаны.

Понятно, что при нормальном состоянии организма холестерин поступает в клетку в количествах далеко не стабильных (больших или меньших), но в среднем также нормальных. И обнаруженные

компенсаторные реакции [13], прежде всего лецитинхолестерилацил-трансферазная, а затем десатуразные и элонгазные, являясь обратимыми, могут быстро «ремонтировать» отклонения в микровязкости плазматической мембраны. Постоянная флуктуация активности указанных систем является нормальной для живой клетки и не должна приводить к резким нарушениям функций плазматической мембраны.

Как нами ранее было установлено, холестерин в плазматической мембране функционально разделен как минимум на три пула: структурный, обмениваемый и прочно (ковалентно) связанный с белками [11, 12, 14]. Причем, структурный и обмениваемый могут подвергаться этерификации [9—15]. Но, с нашей точки зрения, обмениваемый холестерин этерифицируется в процессе транспорта через мембрану, а структурный только в случае компенсации возникающих возмущений микровязкости мембраны. Однако это предположение нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что холестерин и ацильные цепи липидов живой клетки выполняют важнейшую функцию, а именно, посредством обратимой модификации соответствующими ферментными системами осуществляют регуляцию микровязкости липидного бислоя плазматической мембраны.

PHYSICAL PROPERTIES OF PLASMA MEMBRANE OF CULTIVATED NEUROBLASTOMA C 1300 CELL WITH MODIFIED LIPID COMPOSITION

VOIKOV G. L.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian Academy of Science, Kiev

Using the mouse neuroblastoma C 1300 cells with modified content of cholesterol we showed that plasma membrane fluidity of these cells did not depend from cholesterol level. Earlier found lipids reconstruction stimulated by abnormal cholesterol level was directed to compensate the condensing effect of cholesterol. The physiological role of lipid acyl chains and cholesterol as general agents of bilayer in the compensation of the appearing plasma membrane fluidity defects is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feinstein M. B., Fernandez S. M., Sha'afi R. I. *Biochim. et biophys. acta*, N 3, p. 314—370, 1975.
2. Cogan U., Shinitzky M., Weber G., Nishida T. *Biochemistry*, N 3, p. 521—528 1973.
3. Galia H.—J., Sackmann E. *Biochim. et biophys. acta*, N 1, p. 103—115, 1974.
4. O'driscoll E., Chapman D. *FEBS Lett.*, N 3, p. 303—306, 1972.
5. Vanderkooi J., Fischkoff S., Chance B., Cooper R. A. *Biochemistry*, N 8, p. 1589—1595, 1974.
6. Garda H. A., Brenner R. R. *Biochim. et biophys. acta*, N 1, p. 45—54, 1985.
7. Garda H. A., Brenner R. R. *Biochim. et biophys. acta*, N 1, p. 160—170, 1984.

8. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Лишко В. К. Укр. биохим. журн., № 1, с. 44—48, 1986.
9. Волков Г. Л., Гулая Н. М., Говсеева Н. Н., Артеменко И. П. Цитология, № 9, с. 1064, 1984.
10. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Артеменко И. П. Укр. биохим. журн., № 1, с. 39—43, 1986.
11. Волков Г. Л., Худякова Н. А., Гулая Н. М., Артеменко И. П. Бюл. мембраны, № 2, с. 185—190, 1986.
12. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Артеменко И. П. Укр. биохим. журн., № 4, с. 64—69, 1987.
13. Волков Г. Л., Худякова Н. А., Говсеева Н. Н., Гулая Н. М. Докл. АН УССР, сер. Б, № 4, с. 31—37, 1990.
14. Gu'aya N. M., Vol'kov G. L., Klimashe'sky V. M. et al. Neuroscience, v. 34, N 3, p. 785—792, 1990.
15. Волков Г. Л., Гулая Н. М., Говсеева Н. М. Укр. биохим. журн., т. 61, № 6, с. 69—75, 1989.
16. Волков Г. Л. Укр. биохим. журн., т. 61, № 6, с. 76—89, 1989.
17. Волков Г. Л. Укр. биохим. журн., т. 61, № 5, с. 71—77, 1989.
18. McVey E., Yguerabide J., Hanson D. C., Clark W. R. Biochim. et biophys. acta, v. 652, N 1, p. 106—118, 1981.
19. Макарова Т. Б., Королев Н. П., Гуськова Р. А. Биофизика, т. 32, в. 5, с. 787—793, 1988.
20. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. — В кн.: Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран, М., Наука, 1980.
21. Болдырев А. А., Лопика О. Д., Прокопьева В. Д. Нейрохимия, т. 4, № 1, с. 80—95, 1985.
22. Van Hoeyn P. P., Van Blitterswijk W. J., Emmelot P. Biochim. et biophys. acta., v. 551, N 1, p. 44—44, 1979.
23. Van Blitterswijk W. J., Emmelot P., Hakman H. A. M. et al. Biochem. et biophys. acta., v. 467, N 3, p. 309—310, 1977.
24. Esko J., Gilmore J., Glaser M. Biochim. et biophys. acta, v. 689, № 3, p. 562—568, 1982.
25. Pessin J., Satter D., Glasser M. Biochemistry, v. 17, N 10, p. 1997—2004, 1978.

Поступила 5. VII. 1990