

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.8.015

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭПР-СПИНОВОГО
ЗОНДИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ТЕРМОИНДУЦИРОВАННЫХ ПЕРЕХОДОВ В ЛИПИДНОМ
МАТРИКСЕ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ

Горбунов Н.В.

*Институт эволюционной физиологии и
биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград*

Для описания термоиндуцированных фазовых переходов в интактных мембранах синапсом мозга крысы были применены различные методические подходы, основанные на использовании липотропных спиновых зондов. Различие этих методических подходов обусловлено особенностью распределения молекулярных зондов (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил, 12-имоксилстеариновая кислота, этиловый эфир 7-имоксилстеариновой кислоты, метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты) между водной фазой инкубационной среды, а также фазой «жидких» липидов и фазой геля липидного матрикса мембран. При сравнительном анализе показано, что наиболее информативным оказывается использование таких зондов, которые обладают способностью равномерно распределяться между различными областями липидного матрикса мембран (метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты и этиловый эфир 7-имоксилстеариновой кислоты). Предлагается способ адекватной оценки изменения доли «жидких» липидов в интактных мембранах синапсом с помощью метода спиновых зондов, который может быть использован для изучения динамики микрогетерогенного состояния мембран в процессе реализации их специфических функций.

* * *

Исследования в различных направлениях мембранологии связаны с изучением микроструктурных изменений в биомембранах, что наблюдается при изменении физиологического состояния клетки. На основании полученных данных стало возможным создать модифицированную метаморфную жидко-мозаичную модель (metamorphik fluid mosaik model) [1], согласно которой образование и распад липидных доменов и кластеров является динамическим процессом, играющим важную роль в термоадаптации [2], пролиферации и адгезии клеток [1, 3, 4]; изменение микрогетерогенности липидного бислоя происходит также при воздействии различных химических агентов (иммуномодуляторов, анестетиков, канцерогенов, агонистов гормонов и нейромедиаторов).

Использование методов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения и методов электронной микроскопии позволило установить, что сепарация липидов в клеточных мембранах связана с формированием мицелл из так называемой «гексагональной фазы II» [3, 4], образованием кластеров — особых структур с ограниченной подвижностью липидов (подобной их подвижности в фазе геля) [8, 9], а также появления доменов из нейтральных липидов и доменов, подобных липопротеиновым комплексам [1, 4].

Обширная информация о структурной организации биомембран полу-

чена методами молекулярного зондирования. Так, применение флуоресцентных зондов позволило продемонстрировать важную роль изменений микрогетерогенного состояния мембранных липидов в реализации специфических функций возбудимых клеток [7, 10]. Менее разработанными для данных целей остаются методы ЭПР-спектроскопии ввиду сложности интерпретации спектров спиновых зондов, локализованных в мембранных структурах, образованных липидами, различными по своей степени подвижности. Распространенный способ оценки [11] доли «жидких» липидов в бислое (то есть липидов с высокой подвижностью), кластеризованных и иммобилизованных белками липидов, основанный на специфике распределения зонда между водной фазой среды и «жидкой» фазой мембран, требует проведения дополнительных исследований на реконструированных мембранах.

Задача нашей работы состояла в проведении сравнительного анализа различных методических подходов, основанных на спиновом зондировании, к изучению динамики термоиндуцированных переходов в интактных мембранах. Для решения поставленной экспериментальной задачи был разработан и предложен способ оценки изменения доли «жидких» липидов в мембранах синапсом в условиях изменяющейся температуры среды.

Материалы и методы

Исследование проводили на мембранах синапсом мозга крыс линии *Wistar* массой 200—250 г. Для сравнения были использованы синапсомные мембраны из головного мозга минтая (*Theragra chalcogramma*), отловленного на глубине около 100 м в заливе Пасъет Японского моря (температура среды обитания 4°). Выделение мембран синапсом проводили по ранее отработанному методу [12]. Содержание мембранного белка в исследуемом методом спинового зондирования образце составляло 3 мг. Липосомы из яичного лецитина («Koch Light», Англия) получали методом впрыскивания микролитровым шприцем («Hamilton») спиртового раствора (0,1 г/мл) липида в буферный раствор (40 мМ трис-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7,2) с последующим отмыванием диализом в течение 5 ч. Спиновые зонды вводили в мембранную суспензию в спиртовом растворе из расчета 1 моль зонда на 200 моль липидов; содержание спирта не превышало 0,2%. Спектры ЭПР регистрировали на малогабаритном спектрометре типа СЭПР-03 (ЛОЭП «Светлана», Ленинград).

Для зондирования липидного матрикса мембран были использованы липотропные зонды на основе НР: 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО), метиловый эфир 5-доксилстеариновой кислоты (М5ДС) — («Sigma», США), а также 12-имоксилстеариновая кислота, этиловый эфир 7-имоксилстеариновой кислоты* (12ИС, Э7ИС).

При оценке термоиндуцированных изменений фазового состояния липидов в мембранах использовали общепринятые параметры, рассчитанные из спектров ЭПР [3, 13—15] и характеризующие: 1 — упорядочен-

* Автор благодарит М.Л.Борина (МИТХТ, Москва) за предоставленные для проведения данной работы спиновые зонды на основе имоксильного фрагмента.

ность липидных ацилов (параметр A_{II}) в мембранном матриксе; 2 — температурозависимый уровень распределения зонда между водной фазой среды и «жидкой» фазой мембран (параметры α и $1 - \frac{A}{A_0}$); рис. 1, б, 2.

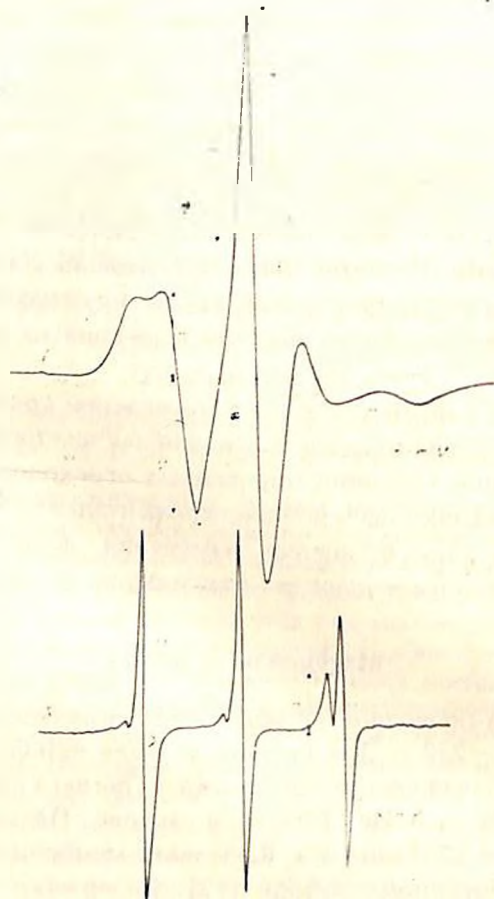


Рис. 1. Спектры ЭПР нитроксильных зондов в липосомах и мембранах синапсом:
а — зонды на основе эфиров жирных кислот, б — ТЕМПО.

Непосредственную информацию о соотношении пулов липидов с высокой и низкой подвижностью можно получить при использовании липотропных зондов, обладающих способностью равномерно распределяться по всем зонам липидного матрикса мембран (например, М5ДС, Э7ИС). В этом случае спектр ЭПР будет представлять собой суперпозицию двух или более спектров спиновых зондов, локализованных в разных (по фазовому состоянию) зонах мембраны [3]. Анализ такого сложного сигнала представляется возможным в рамках математической модели, позволяющей оценить вклад каждого пула молекул зонда в интегральном спектре ЭПР [3], и требует дополнительных расходов на привлечение вычислительной техники.

В предварительных исследованиях, проведенных на липосомах из яичного лецитина, нами было показано, что для оценки доли «жидких» липидов в мембранах возможно использование параметра ϕ , который определяется (рис. 1) как отношение амплитуд спектральных линий «м» (зонд в «жидкой» липидной фазе [3]) и «М» (общее количество зонда

ного значения — 1,0, которое характерно для мембранных структур, образованных исключительно «жидкими» липидами, что имеет место при температурах выше фазового перехода липидов [15]. Это может свидетель-

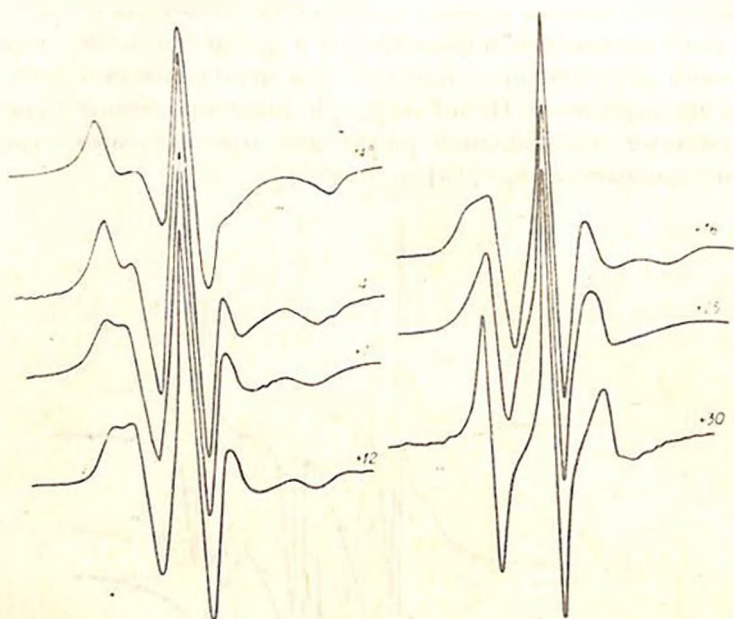


Рис. 3. Динамика температурозависимых изменений в спектре ЭПР метилового эфира 5-доксилстеариновой кислоты, включенного в липосомы из яичного лецитина.

ствовать о наличии в мембранах синапсом крысы некоторой доли липидных кластеров и иммобилизованных белками липидов, уровень содержания которых невозможно оценить непосредственно, используя зонды

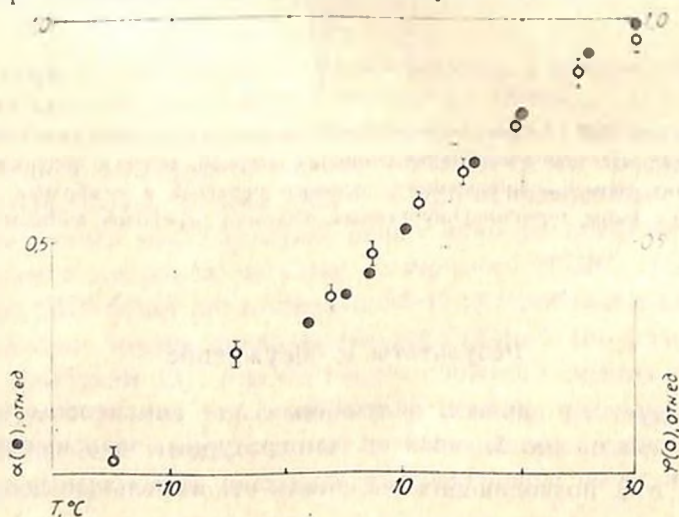


Рис. 4. Температурная зависимость параметра α (●) — для ТЕМПО и ϕ (○) — для метилового эфира 5-доксилстеариновой кислоты, введенных в суспензию липосом из яичного лецитина.

ТЕМПО и 12ИС (то есть определяя параметры α и $1 - \frac{A}{A_0}$), ввиду

распределения этих зондов в липидном матриксе мембран [13, 15].

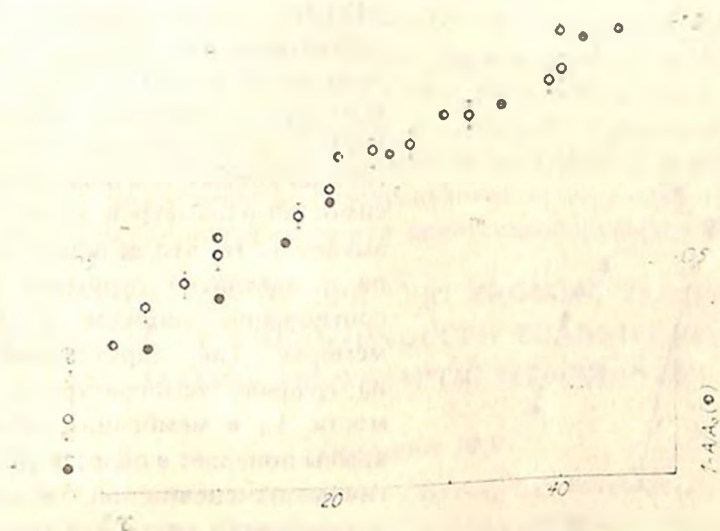


Рис. 5. Температурные зависимости характеристических параметров зондов, введенных в суспензию мембран синапсом мозга крысы α (◇) — для ТЕМПО; ϕ (○) — для этилового эфира 7-имоксилстеариновой кислоты; $1 - \frac{A}{A_0}$ (◐) — для 12-имоксилстеариновой кислоты

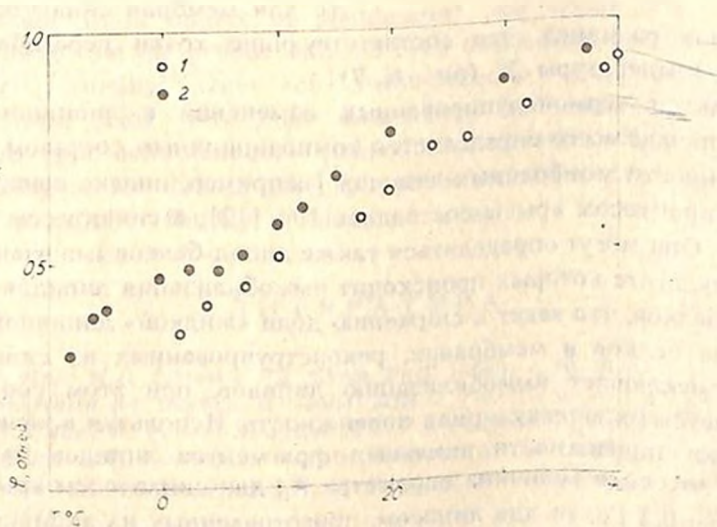


Рис. 6. Температурная зависимость параметра ϕ этилового эфира 7-имоксилстеариновой кислоты в мембранах синапсом мозга крысы (1) и мяты (2)

Сравнительная оценка температурозависимого изменения параметр ϕ для мембран синапсом крысы и мяты (рис. 6), характеризующихся различным липидным составом [16] и различиями температурных переходов в мембранах (рис. 6, 7), свидетельствует о чувствительности указанного параметра к различиям фазового соотношения мембранных липидов.



Рис. 7. Температурозависимое изменение параметра A_{II} этилового эфира 7-имоксилстеариновой кислоты в мембранах синапсом мозга крысы (1) и минтая (2)

с той лишь разницей, что соответствующие точки перегиба попадают в область температуры 2° (рис. 6, 7).

Характер термоиндуцированных изменений в липидном матриксе мембран прежде всего определяется композиционным составом и степенью ненасыщенности мембранных липидов (например, индекс ненасыщенности липидов синапсом крысы составляет 194 [12], а синапсом минтая — 311 [16]). Они могут определяться также липид-белковыми взаимодействиями, в результате которых происходит иммобилизация липидов в микроокружении белков, что ведет к снижению доли «жидкой» липидной фазы [3]. Отсутствие белков в мембранах, реконструированных из синапсомных мембран, исключает иммобилизацию липидов, при этом соответственно увеличивается их молекулярная подвижность. Используя в качестве критерия оценки подвижности ацильных фрагментов липидов параметр A_{II} , показали, что если величина параметра A_{II} для синапсом крысы при 40° равна $32,5 \pm 0,2$ Гс, то для липосом, приготовленных из липидных экстрактов синапсом, значение величины параметра, равное $32,5 \pm 0,2$ Гс, достижимо уже при температуре 32° . При температуре 23° (температура области структурного перехода синапсом крысы) величина параметра A_{II} для синапсом составляла $49,0 \pm 0,5$ Гс, тогда как для липосом, приготовленных из липидных экстрактов тех же мембран, значение структурного параметра A_{II} уменьшалось до $43,9 \pm 0,2$ Гс. Это указывает на значительное снижение энтальпии структурного перехода в липидных бислоях в отсутствие мембранных белков [17].

Полученные данные указывают на то, что латеральное фазовое

Совпадение результатов оценки характера термоиндуцированных структурных переходов в мембранах синапсом крысы и минтая по данным двух независимых способов расчета — по определению точек перегиба на кривых температурных зависимостей параметров A_{II} и φ — указывает на то, что величина параметра φ адекватно отражает фазовое соотношение липидов в матриксе мембран. Так, характерный излом на графике температурной зависимости A_{II} в мембранах синапсом крысы попадает в область 23° ; аналогичные изменения при той же температуре имеют место для кривой температурной зависимости параметра φ . Совпадение изломов на кривых температурных зависимостей параметров φ и A_{II} не зависят от природы мембран; этот же эффект имеет место для мембран синапсом минтая

распределение липидов, зависящее от композиционного состава мембран синапсом, может быть оценено с помощью параметра (φ), определяемого исходя из относительной интенсивности низкопольной «быстрой» компоненты спектра ЭПР эфиров 5-доксилстеариновой и 7-имоксилстеариновой кислот. Этот методический подход может быть использован при рассмотрении фазового состояния липидов в сложных процессах, связанных с проявлением функциональной активности возбудимых мембран, таких как экспрессия и латеральное перераспределение мембранных рецепторов, диссипация энергии, сопровождающая релаксацию возбуждения и т.п.

APPLICATION OF EPR SPIN PROBING TECHNIQUE IN STUDIES OF THERMOINDUCED TRANSITION IN LIPID MATRIX OF SYNAPTIC MEMBRANES

Gorbunov N.V.

*Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Leningrad*

Various methodological approaches involving lipophilic spin probes were used to describe thermoinduced phase transitions in intact synaptic membranes of rat brain. These methods are based on different distribution of spin probes (2,2,6,6-tetramethylpiperidino-1-oxyl, 12-ioxyl-stearic acid, ethyl ether of 7-ioxyl-stearic acid and methyl ether of 5-doxyl-stearic acid) in fluid lipids, gel-lipid phase (lipid matrix of membranes) and water. The comparative analysis showed that the probes with the even distribution in different areas of lipid matrix (methyl ether of 5-doxyl-stearic acid, ethyl ether of 7-ioxyl-stearic acid) were most informative for membrane thermotropic processes. An approach to adequate estimation of variation of fluid lipid fraction in intact biological membranes using spin probe technique was suggested. It can be applied to monitor fluidity of biomembranes.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cullis P.R., Hope M.J., Tilcock C.P.S. *Chem. Phys. Lipids*, v. 40, p. 127—144, 1988.
2. Pape L., Kristensen B.I. *Biochim. et biophys. acta*, v. 770, N1, p. 7—15, 1984.
3. De Kruijff B., Cullis P.R., Verkley A.J., Hope M.J., Von Hoogevest P., Taraschi T.F., Von Echteld C.J.A., Killian J.A., Rietveld A., Van der Steen A.T.M.—In: *Progress in Protein—Lipid Interactions* (eds. A.Watts, J.J.H.M. De Pont), p. 89—142, Elsevier, Amsterdam, N.-Y., Oxford, 1985.
4. Mountford C.E., Wright L.C. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 13, N5, p. 172—177, 1988.
5. Juliano R.L., Ling V. *Biochim. et biophys. acta*, v. 455, N2, p. 152—162, 1976.
6. Brockerhoff H., Brockerhoff S., Box L.L. *Lipids*, v. 21, N6, p. 405—408, 1986.
7. Crews F.T. *Psychopharmacology Bulletin*, v. 18, N4, p. 135—143, 1982.
8. Lee A.G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 472, N2, p. 237—281, 1977.
9. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. — В сб.: *Замораживание и криопротекция*, с. 16—29, М., МГУ, 1987.
10. Бергельсон Л.Д. — В сб.: *Материалы V Всесоюзного биохимического съезда*, с. 221—222, М., Наука, 1985.
11. Tyurin V.A., Kagan V.E., Shukolyukov S.A., Klaan N.K., Novikov K.N., Azizova O.A.J. *J. of thermal Biology*, v. 4, p. 203—208, 1979.

12. Тюрин В.А., Горбунов Н.В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, N6, с. 591—594, 1983.
13. Polnaszek C.F., Shreier Sh., Butler K.W., Smith J.C.P. J. Amer. Chem. Soc., v. 100, p. 8223—8232, 1978.
14. Твердислав В.А., Тихонов А.Н., Яковенко Л.В. — В сб.: Физические механизмы функционирования биологических мембран, с. 73—87, МГУ, 1987.
15. Ерин А.Н., Горбунов Н.В., Скрыпин В.И., Каган В.Е., Прилипко Л.Л. Биологические науки, МГУ, N1, с. 10—16, 1987.
16. Крепс Е.М., Тюрин В.А., Челомин В.П., Горбунов Н.В., Наливаева И.Н., Тюрина Ю.Ю., Аврова Н.Ф., Каган В.Е. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. XXIII, N4, с. 461—467, 1987.
17. Papahadjopoulos D., Moskarello M., Eylar E.H., Isac T. Biochim. et biophys. acta, v. 401, N3, p. 317—335, 1975.

Поступила 11.03.1989