



УДК 547.953.04

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ  
НА МОРФОЛОГИЮ МОДЕЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН*Евсильенко И. А., Викторов А. В., Евстигнеева Р. П.**Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова**Тараховский Ю. С., Образцов В. В., Боровягин В. Л.**Институт биофизики Академии наук СССР, Пущино Московской обл.*

С помощью электронной микроскопии (замораживание-скальвание) исследованы морфологические изменения, вызываемые перекисным окислением фосфолипидных мембран, образованных яичным фосфатидилхолином, а также смесью яичного фосфатидилхолина и дифосфатидилглицерина (кардиолипина) в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Установлено, что окисление фосфатидилхолина до значений индекса окисленности 0,6–0,9 нарушает ламеллярную упаковку фосфолипидов в бислое, давая искаженную гофрированную поверхность. Дальнейшее окисление фосфатидилхолина приводит к измельчению агрегатов фосфолипидов. Накопление продуктов перекисного окисления в смеси фосфатидилхолин – дифосфатидилглицерин в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает исчезновение внутримембранных частиц липидной природы и появление популяции липосом, гидрофобные области которых имеют шероховатую поверхность.

Известно, что ряд важнейших функциональных процессов биологических мембран связан с определенными морфологическими изменениями в структуре мембран [1]. Одним из факторов, влияющих на функцию биологических мембран, является перекисное окисление фосфолипидов. В предыдущих работах методом ЯМР было показано, что накопление продуктов перекисного окисления в мембране, состоящей из фосфатидилхолина, приводит к появлению популяции молекул липида, движущихся более изотропно по сравнению с протяженным бислоем [2, 3]. Это может быть связано с образованием в мембране участков большой кривизны, а также с появлением мелких фосфолипидных агрегатов. Прямой ответ на этот вопрос может дать электронно-микроскопический анализ дисперсий.

Кроме того, неизвестно, какое влияние оказывает перекисное окисление на мембрану, содержащую внутримембранные образования липидной природы (частицы), образующиеся при действии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Поэтому в данной работе нами предпринята попытка исследовать влияние перекисного окисления на фосфолипидные мембраны, образованные фосфатидилхолином и смесью фосфатидилхолина и дифосфатидилглицерина в соотношении 1 : 1 в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , с использованием электронной микроскопии (замораживание-скальвание).

Фосфатидилхолин с индексом окисленности  $D_{233}/D_{215}$ , не превышающим 0,4, в воде образует агрегаты с ламеллярной упаковкой липидов, проявляющейся на сколах в виде аморфных гладких поверхностей (рис. 1а). Увеличение индекса окисленности до значений 0,6–0,9 нарушает ламеллярную упаковку липидов (рис. 1б). На сколах эти изменения выражаются в появлении гофрированных поверхностей, соответствующих как гидрофильным, так и гидрофобным поверхностям мембран. Ранее было показано [2, 3], что при этом в спектре  $^{31}\text{P}$ -ЯМР появляется сигнал, отвечающий молекулам фосфолипидов, двигающимся изотропно. Дальнейшее окисление фосфолипидов до значений индекса окисленности  $D_{233}/D_{215} = 0,9–1,0$  на сколах проявляется в виде прогрессивно увеличивающейся фракции мелких однослойных липосом. Так, на рис. 1в виден последовательный переход многослойных крупных липосом в однослойные мелкие липосомы. Как было найдено ранее [2, 3], в спектрах  $^{31}\text{P}$ -ЯМР развитие процессов окисления

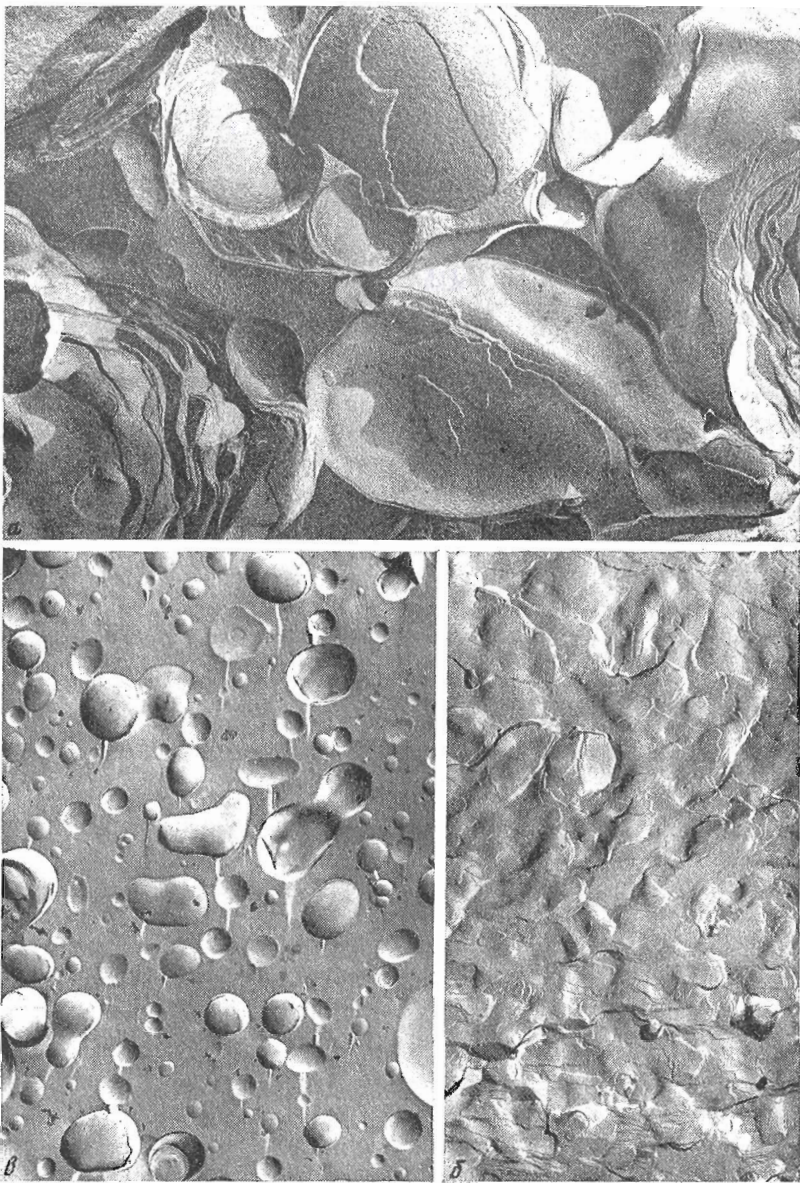


Рис. 1. Платиноуглеродные реплики с фосфатидилхолиновыми незвученными липосом при различном индексе окисленности липида: *a* — контрольная суспензия (индекс окисленности 0,3); *б, в* — последовательное окисление контрольного образца, индексы окисленности 0,6 и 1,00. Увеличение  $\times 37\ 000$

липосомальных фосфолипидов приводит к увеличению «изотропного» сигнала, т. е. к возрастанию доли молекул липидов,двигающихся изотропно. Таким образом, как процесс искажения геометрии липидных бислоев, так и переход крупных липидных агрегатов в мелкие регистрировался нами ранее как непрерывный процесс накопления количества молекул,двигающихся изотропно.

Перекисное окисление дисперсии, состоящей из смеси фосфатидилхолин.— дифосфатидилглицерин (1:1), так же как и «чистой» фосфатидилхолиновой дисперсии, сопровождается переходом части многослойных липосом в небольшие сферические агрегаты (рис. 2*a*). Ранее методами  $^{31}\text{P}$ -ЯМР и электронной микроскопии (замораживание-скальвание) [4, 5] было показано, что добавление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  к дисперсии смеси неокисленных фосфатидилхолина и дифосфатидилглицерина вызывает появление в гидрофобных областях мембран внутримембранных частиц (рис. 2*б*). Нами



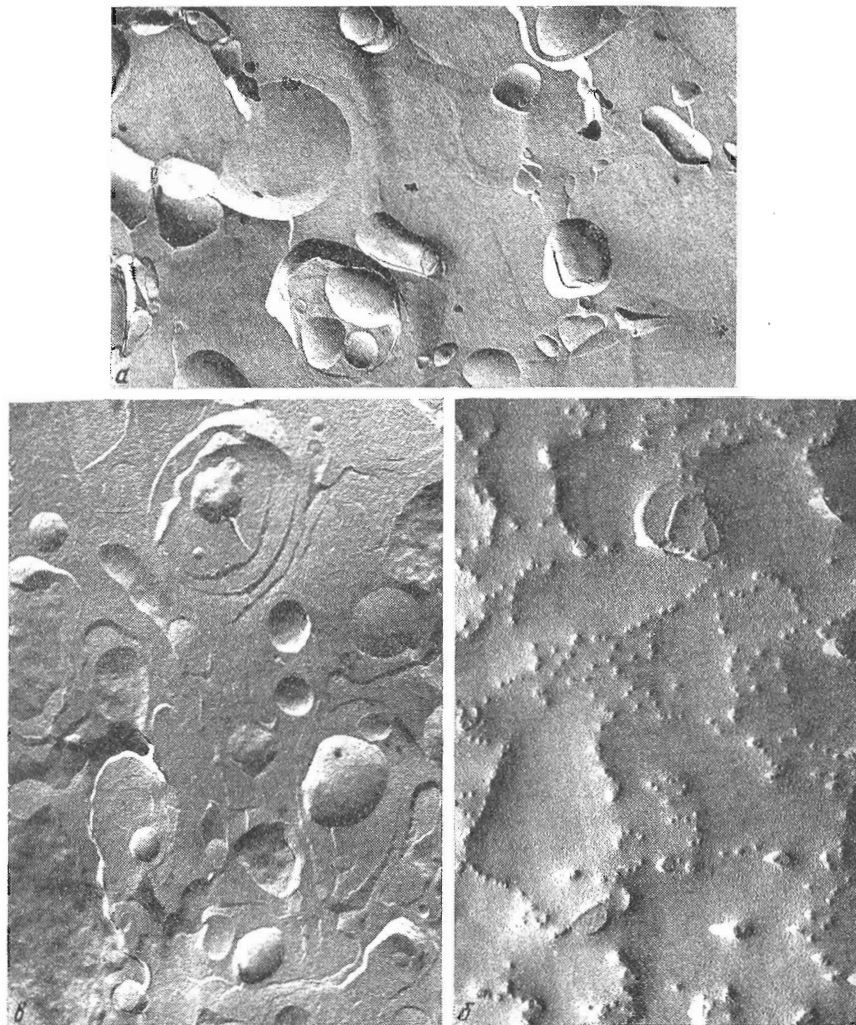


Рис. 2. Платиноуглеродные реплики с кардиолипин-фосфатидилхолиновых (1:1) липосом: *a* — индекс окисленности 0,9, инкубация при 23° С без ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ; *b* — индекс окисленности 0,3, инкубация при 23° С в присутствии 50 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; *c* — образец «б» после окисления до индекса окисленности 0,9. Увеличение  $\times 37\,000$  — *a*, *c*;  $\times 100\,000$  — *b*

было обнаружено, что накопление продуктов перекисного окисления в подобных мембранных препаратах приводит к исчезновению внутримембранных частиц и появлению популяции липосом, гидрофобные области которых имеют шероховатую поверхность (рис. 2*б*). Если же ионы  $\text{Ca}^{2+}$  добавляли к дисперсии фосфатидилхолин — дифосфатидилглицерин после ее окисления, внутримембранные частицы вообще не образовывались. Следует отметить, что окисление модельных мембран до или после введения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  всегда сопровождается появлением фракции однослойных липосом небольшого размера.

Полученные данные прямо свидетельствуют о том, что накопление продуктов перекисного окисления фосфолипидов может изменять как морфологию гидрофобных областей модельных мембран, так и общую симметрию бислоя — увеличение кривизны при образовании гофрированной структуры или при уменьшении размера липосом.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали хроматографически чистые фосфолипиды. Фосфатидилхолин выделяли из яичных желтков [6], дифосфатидилглицерин — из сердец крупного рогатого скота [7]. Водные неозвученные липид-

ные дисперсии готовили механическим встряхиванием сухих липидов в буфере трис-HCl (рН 6,8), 20 мг липидной массы в 1 мл буфера, как описано ранее [3, 4]. Контроль за окислением двойных связей фосфолипидов осуществляли с помощью УФ-спектроскопии [8]. УФ-спектры были получены на спектрофотометре Hitachi EPS-3T (Япония) в метаполе. Платиноуглеродные реплики липидных дисперсий сняты на электронном микроскопе Jeol JM-7A (Япония) [9].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Verkleij A. J., Vergaert P. H. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 415, № 3, p. 303-327.
2. Викторов А. В., Василенко И. А., Евстигнеева Р. П. *Биоорганическая химия*, 1979, т. 5, № 10, с. 1584-1586.
3. Barsukov L. I., Victorov A. V., Vasilenko I. A., Evstigneeva R. P., Bergelson L. D. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 598, № 1, p. 153-168.
4. Vail W., Stollery Y. G. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 551, № 1, p. 74-84.
5. Kruijff de B., Verkleij A. J., Echteld van C. J. A., Gerritsen W. J., Mombers C., Noordam P. C., Gier de J. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 555, № 2, p. 200-209.
6. Швець В. И., Сеников Г. А., Голбец И. И., Орлова Г. Л., Краснополянский Ю. М. *Фармацевт. ж.*, 1977, т. 4, № 1, с. 79-81.
7. Орлова Г. Л., Голбец И. И., Краснополянский Ю. М., Сеников Г. А., Швець В. И. *Химия и технология органических производств. Межвузовский сборник*, 1979, т. 9, № 2, с. 86-91.
8. Klein A. R. *Biochim. et biophys. acta*, 1970, v. 210, № 3, p. 485-489.
9. Боровягин В. Л., Северина Е. П., Тараховский Ю. С. *Докл. АН СССР*, 1976, т. 227, № 5, с. 1229-1231.

Поступила в редакцию  
26.I.1982  
После доработки  
12.V.1982

#### INFLUENCE OF PHOSPHOLIPID PEROXIDATION ON THE MORPHOLOGY OF MODEL PHOSPHOLIPID MEMBRANES

VASILENKO I. A., VICTOROV A. V., EVSTIGNEEVA R. P., TARAKHOVSKY Yu. S.,  
OBRAZTSOV V. V., BOROVYAGIN V. L.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;  
Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

Morphological changes caused by peroxidation of phospholipid membranes formed both by egg phosphatidylcholine and mixture of phosphatidylcholine and diphosphatidylglycerol (cardiolipin) in the presence of  $Ca^{2+}$  ions have been examined by electron microscopy (freeze-fracturing) and  $^{31}P$  NMR. Peroxidation of phosphatidylcholine up to 0.6-0.9 values of oxidation index was shown to perturb the lamellar packing of phospholipid molecules in bilayer, producing the membrane with a wrinkled surface. Subsequent oxidation entails fragmentation of the phospholipid aggregates. Accumulation of peroxides in phosphatidylcholine - diphosphatidylglycerol mixture in the presence of  $Ca^{2+}$  ions results in removal of all lipidic intramembrane particles and appearance of liposome population whose hydrophobic region has a rough surface.

Технический редактор Е. С. Кузьминкина

Сдано в набор 21.03.82 Подписано к печати 05.03.82 Т-1253; Формат бумаги 70×108<sup>1/16</sup>  
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 10,9 тыс. Уч.-изд. л. 14,1 Бум. л. 4,5  
Тираж 850 экз. Зак. 1779

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 10