

МИЦЕЛЛООБРАЗОВАНИЕ ПРИРОДНЫХ ЛИПИДОВ В ПОЛЯРНЫХ СРЕДАХ

Шишкина Л.Н., Климович М.А., Козлов М.В., Пластина И.Г., Повх А.Ю.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2018.

Аннотация. Используя соевый лецитин и липиды, выделенные из органов мышей, как источники природных липидов, проведено сравнительное изучение спонтанной агрегации лецитина в различных по составу и полярности системах и взаимосвязи между составом липидов и размером сформированных из них с помощью ультразвука липосом. Анализ экспериментальных данных позволил предположить, что процесс спонтанного образования мицелл из природных липидов в полярной среде в большей степени зависит от свойств среды, чем от соотношения фракций фосфолипидов в образцах лецитина. Однако при формировании мицелл из природных липидов в водной среде с помощью ультразвука роль состава липидов, в том числе минорных фракций фосфолипидов, существенно возрастает. Понимание механизма мембраногенеза в биологических системах обуславливает необходимость дальнейших исследований механизма мицеллообразования природных липидов в полярных средах.

Ключевые слова: лецитин, липиды из органов мышей, динамическое рассеяние света, состав фосфолипидов.

Структурное состояние биологических мембран, основу которых составляют фосфолипиды (ФЛ), во многом определяет их роль как регулятора клеточного метаболизма. Распределение различных фракций ФЛ в мембранах асимметрично: менее легкоокисляемые холинсодержащие фракции ФЛ преимущественно находятся во внешнем слое, а более легкоокисляемые фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и фосфатидилсерин (ФС) преимущественно сосредоточены во внутреннем слое мембран. Количественное соотношение различных фракций ФЛ в мембране изменяется и в процессе функционирования биологического объекта в норме, и при воздействии различных факторов на организм [1, 2]. Широкое использование липосом в практических целях также обуславливает необходимость изучения детального механизма формирования мицелл из природных фосфолипидов. Удобным модельным объектом для этих целей является лецитин (ЛС), представляющий собой смесь природных липидов, который широко используется в медицине и пищевой промышленности в качестве стабилизатора, солюбилизатора и эмульгатора, при формировании липосом, различных фармацевтических субстанций и промышленных систем. Являясь гидрофобным препаратом, в полярных средах ЛС образует прямые мицеллы. Ранее было показано, что параметры мицеллообразования ЛС зависят от нескольких факторов, среди которых его концентрация в растворе, состав среды и присутствие в системе других поверхностно-активных веществ [3-5]. Однако более детально процесс самоорганизации ЛС ранее был изучен в неполярной среде, в которой ФЛ образуют обращенные мицеллы, в то время как в биологических системах мембраны функционируют в полярной среде.

Поэтому целью первого этапа исследований явилось сравнительное изучение спонтанной агрегации лецитина в различных по составу и полярности системах.

В работе был использован 10% водно-спиртовой раствор соевого лецитина (Харьков, Украина), применявшийся без дополнительной очистки.

Качественный и количественный состав ФЛ природных липидов определяли методом ТСХ по Шталю, используя стеклянные пластины (90×120мм) с покрытием из силикагеля типа G (Sigma). В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформ: метанол: ледяная уксусная кислота: дистиллированная вода в соотношении 12,5:7,5:2:1 (об.). Проявление пластин проводили в парах йода. Количественный анализ фракций ФЛ проводили путем фотометрирования на спектрофотометре ПЭ 5400-ВИ (Россия) при длине волны 815 нм по образованию фосфорномолибденового комплекса в присутствии аскорбиновой кислоты. Подробности методики изложены в работе [6].

Мицеллообразование ЛС проводили в дистиллированной воде и смеси вода-этанол (1 мл и 11 мкл соответственно). Агрегацию лецитина в полярных средах исследовали методом динамического светорассеяния на приборе Zeta Sizer Nano (Malvern Instruments, UK), снабженным 4 мВт He-Ne лазером и автоматической программой обработки данных. Рабочая концентрация ЛС 30 мкг/мл. Измерения повторяли 5–10 раз для каждой пробы.

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными методами вариационной статистики, используя МО Excel, и с помощью пакета компьютерных программ KINS [7]. Результаты представлены в виде среднеарифметических величин с указанием их средних квадратичных ошибок ($M \pm m$).

Препаратам соевого ЛС, как и всем природным источникам ФЛ, присуща достаточно высокая вариабельность состава для образцов разных партий. Так, содержание основного компонента ФЛ лецитина – фосфатидилхолина (ФХ) – составило 90,8 % \pm 0,7 для образца № 1 и 83,6% \pm 0,6 % для образца № 2. Соотношение минорных фракций ФЛ в препаратах ЛС также существенно различалось, что следует из данных, представленных

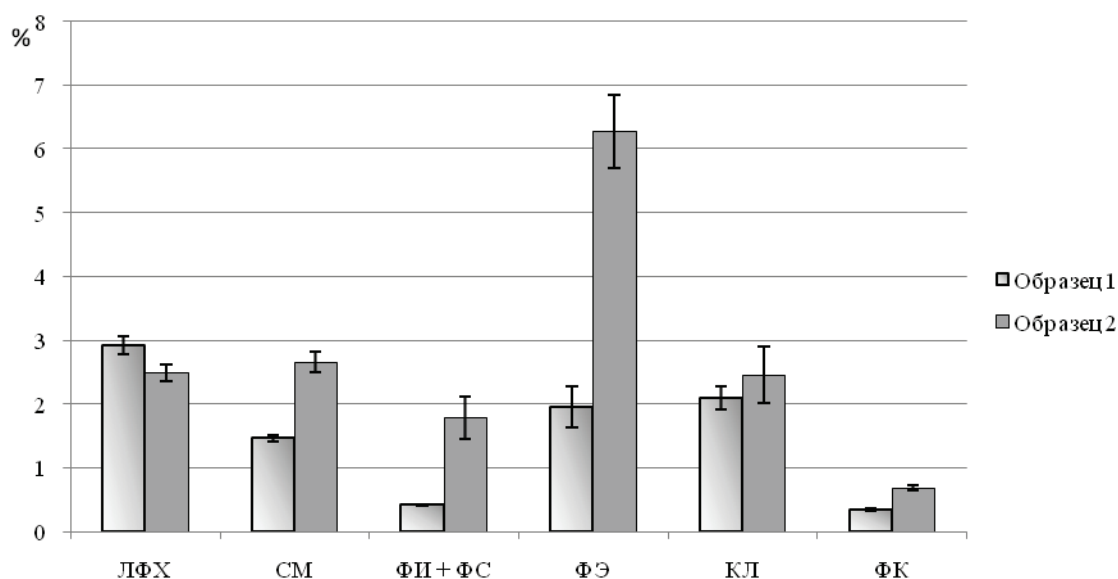


Рисунок 1. Относительное содержание минорных фракций фосфолипидов (% Р) в исследованных образцах лецитина

на рисунке 1. Наиболее значительные различия выявлены в относительном содержании таких минорных фракции ФЛ как фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и суммарная доля фосфатидинозита и фосфатидилсерина ((ФИ+ФС). Содержание этих более легкоокисляемых фракций в составе ФЛ лецитина в образце № 2 в 3,5 и 4,7 раза выше соответственно, как и увеличенной в 1,8 раза доле сфингомиелина (СМ), одной из наиболее трудноокисляемой фракции ФЛ. Относительное содержание лизоформ ФЛ (ЛФХ), кардиолипина (КЛ) и фосфатидной кислоты (ФК) в обоих образцах лецитина практически одинаково (рис. 1).

Как показано ранее [3], агрегация ФЛ в неполярном растворителе является сложным динамическим процессом, что обуславливает наличие в реакционной системе групп мицелл разного диаметра. Исследование агрегации ЛС в полярных средах также выявило появление двух групп агрегатов разного диаметра, одна из которых являлась доминирующей. Чтобы исключить влияние количественного соотношения фракций ФЛ, агрегацию лецитина в зависимости от времени экспозиции и полярности среды проводили на образце № 1.

Динамика изменения среднего диаметра основной фракции лецитина в водной среде представлена на рисунке 2, а в 1 %-ном водном растворе этанола на рисунке 3. Анализ представленных данных позволяет заключить, что динамическое равновесное состояние процесса мицеллообразования лецитина в полярных

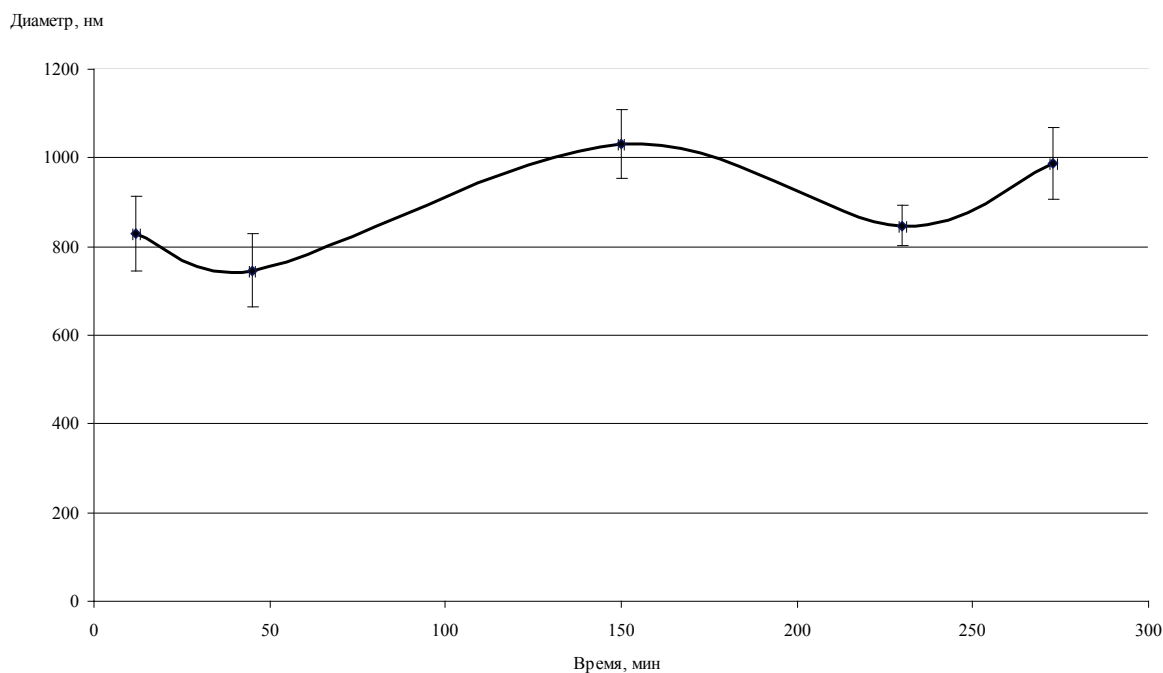


Рисунок 2. Влияние времени экспозиции на размер основной фракции агрегатов лецитина в дистиллированной воде

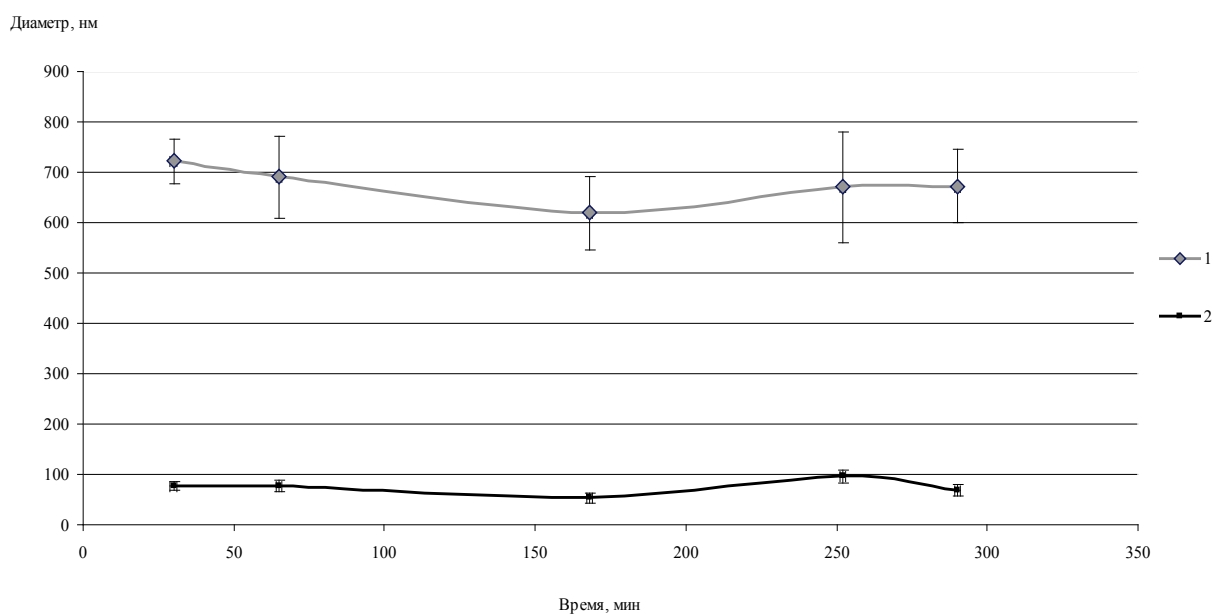


Рисунок 3. Влияние времени экспозиции на динамический диаметр агрегатов лецитина в 1 %-ном водном растворе этанола: 1 – основная фракция, 2 – группа более мелких частиц

средах устанавливается уже в течение первых 15-20 минут экспозиции. При этом даже незначительные добавки этанола вызывают определенные различия в механизме его агрегации. В то время как в водной среде за все время наблюдения более 98,9 % составляют агрегаты одного размера, присутствие этанола в концентрации 1 %, кроме основной фракции агрегатов, доля которой колеблется от 85,4 % до 91,5 %, обуславливает появление мицелл более мелкого размера. Диаметр фракции мелких мицелл в водно-этанольной среде колеблется в пределах от $53,7 \pm 9,9$ нм до $96,5 \pm 12,8$ нм.

Необходимо отметить также, что в водной среде ЛС образует мицеллы более крупного размера, средний диаметр которых варьирует от 745 ± 80 нм до 1030 ± 80 нм, в то время как в 1 %-ном водном растворе этанола средний диаметр мицелл в течение всего времени экспозиции составляет 675 ± 20 нм.

Безусловно, важное значение при формировании агрегатов природных ФЛ имеет их качественный и количественный состав. Так, при агрегации ЛС в той же концентрации (30 мкг/мл) в 0,8 %-ном водном растворе этанола средний диаметр частиц основной фракции составлял 114 ± 9 нм [5], что в 5,9 раза меньше выше приведенной аналогичной величины. Возможно, это обусловлено более высоким содержанием ФЛ в составе препарата ЛС, использованного в работе [5]: $79,9 \pm 0,9$ %, в то время как использованные в данной работе образцы ЛС характеризовались содержанием ФЛ в составе общих липидов $52,0 \pm 1,7$ % и $58,9 \pm 4,1$ % соответственно.

Анализ полученных данных позволяет предполагать, что на процесс формирования мицелл из природных ФЛ более существенное влияние оказывает присутствие минорных фракции ФЛ. Так, не обнаружено достоверных различий величин среднего диаметра мицелл, образованных в дистиллированной воде из образцов ЛС с разной долей ФХ в составе ФЛ ($90,8 \pm 0,7$ % и $83,6 \pm 0,6$ %): 930 ± 30 нм и 990 ± 80 нм соответственно.

В липидах, выделенных из органов животных, количественный состав минорных фракций ФЛ более разнообразен, а суммарная доля основных фракций ФЛ тканей млекопитающих (ФХ и ФЭ), как правило, не превышает 70-75 %. Поэтому следующим этапом работы явилось изучения влияния состава липидов, выделенных из органов животных, на размер сформированных из них липосом.

Формирование липосом, выделенных из липидов печени и головного мозга беспородных мышей, проводили с использованием ультразвука, диаметр липосом анализировали по спектрам мутности. Методические подробности представлены в работе [8]. Были выявлены достоверные различия между составом ФЛ и физико-химическими характеристиками липидов органов животных и аналогичными параметрами сформированных из них липосом [8-10]. При этом обнаружена прямая корреляционная взаимосвязь между долей стерина и содержанием диеновых конъюгатов в составе общих липидов как на уровне липидов органов мышей ($R^2 = 0,9978$), так и в липидах, сформированных из них липосом ($R^2 = 0,9929$) [10]. Выявлены также корреляционные взаимосвязи между содержанием кетодиенов и диеновых конъюгатов и для липидов органов мышей и лецитина ($R^2 = 0,9908$), и в липидах, сформированных из них липосом ($R^2 = 0,9929$) [10]. Это позволило сформулировать представление об однотипности функционирования физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов как на мембранном, так и на клеточном и органном уровнях [10].

Сравнительный анализ состава липидов липосом, сформированных из органов мышей, и их диаметра выявил наличие взаимосвязи между размером липосом и мольным отношением [стерина]/[ФЛ] в их липидах. При этом при формировании липосом из липидов печени мышей обнаружен рост среднего диаметра липосом при уменьшении отношения [стерина]/[ФЛ] в 1,8 раза, в то время как увеличение вдвое данного отношения в липосомах, сформированных из липидов головного мозга мышей, вызывает и увеличение среднего диаметра липосом в 3,3 раза.

Таким образом, совокупность представленных данных позволяет сделать ряд заключений. Процесс спонтанного образования мицелл из природных липидов в полярной среде в большей степени зависит от свойств среды, чем от соотношения фракций ФЛ в образцах лецитина. Это предположение подтверждается и отсутствием взаимосвязи между долей лизоформ ФЛ в лецитине и средним диаметром, образованным им агрегатов. Лизоформы ФЛ обладают детергентными свойствами, и ранее такая взаимосвязь была выявлена при спонтанном образовании мицелл из природных липидов в неполярной среде. При формировании мицелл из природных фосфолипидов в водной среде с помощью ультразвука роль состава липидов, в том числе минорных фракций ФЛ, существенно возрастает. Так, выявлена прямая корреляция между долей лизоформ ФЛ в липидах липосом, сформированных из липидов печени и головного мозга мышей и лецитина, и их средним диаметров ($R = 0,95 \pm 0,04$, $p < 0,05$). Динамический характер процесса мицеллообразования и высокая лабильность состава природных липидов, безусловно, требуют проведения дальнейших исследований его механизма, что представляет несомненный интерес для понимания процесса мембраногенеза в биологических системах.

Список литературы / References:

1. Burlakova, Ye.B., Pal'mina N.P., Mal'tseva Ye.L. A physicochemical system regulating lipid peroxidation in biomembranes during tumor growth. *Membrane Lipid Oxidation*. Boston: CRC Press, 1991, vol. III, pp. 209-237.
2. Шишкина Л.Н., Кушнирева Е.В., Смотряева М.А. Новые подходы к оценке биологических последствий воздействия радиации в малых дозах. *Радиация. биология. Радиоэкология*, 2004, т. 44, № 3, с. 289-295. [Shishkina L.N., Kushnireva E.V., Smotryaeva M.A. A new Approach to Assessment of Biological Consequences of Exposure to Low-Dose Radiation. *Radiation Biology and Radioecology*, 2004, vol. 44, no. 3, pp. 289-295. (In Russ.)]
3. Маракулина К. М., Плащина И. Г., Козлов М. В., Шишкина Л. Н. Влияние состава фосфолипидов на их агрегацию в неполярном растворителе. *Бутлеровские сообщения*, 2011, Т. 25, № 7, с. 96-100. [Marakulina K.M., Plashchina I.G., Kozlov M.V., Shishkina L.N. Effect of the phospholipid composition on their aggregation in non-polar solvent. *Butlerov Communication*, 2011, vol. 25, No. 7. pp. 96-100. (In Russ.)]
4. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Маракулина К.М. Плащина И.Г., Плюснина С.Н., Шевченко О.Г., Федорова И.В., Чукичева И.Ю., Кучин А.В. Поверхностно-активные свойства изоборнилфенолов в системах разной сложности. *Биофизика*, 2012, т. 57, вып. 6, с. 1008-1013. [Shishkina L.N., Kozlov M.V., Marakulina L.M., Plashchina I.G., Plusnina S.N., Shevchenko O.G., Fedorova I.V., Chukicheva I.Yu., Kutchin A.V. *Biophysics*, 2012, vol. 57, no. 6, pp. 786-791. (In Russ.)]
5. Shishkina L. N., Mazaletskaya L. I., Marakulina K. M., Lukanina Yu. K., Plashchina I. G., Sheludchenko N. I. Effect of complexation with phospholipids and polarity of medium on the reactivity of phenolic antioxidants. *Chemistry and Technology of Plant Substances*. Toronto, New Jersey: Apple Academic Press, 2017, pp. 93-110 (Chapter 5).
6. Shishkina L.N., Kushnireva Ye.V., Smotryaeva M.A. The combined effect of surfactant and acute irradiation at low dose on lipid peroxidation process in tissues and DNA content in blood plasma of mice. *Oxidation commun.*, 2001, vol. 24, no. 2, pp. 276-286.
7. Брин Э.Ф., Травин С.О. Моделирование механизмов химических реакций. *Хим. физика*, 1991, т. 10, с. 830-837. [Brin E.F., Travin S.O. Modeling the chemical reaction mechanism. *Chem. Physics*, 1991. vol. 10, no. 6, pp. 830-837. (In Russ.)]
8. Klimovich M.A., Shishkina L.N., Paramonov D.V., Trofimov V.I. Interrelation between the physicochemical properties and the composition of natural lipids and the liposomes formed from them. *Oxidation Commun.*, 2010, vol. 33, no. 4, pp. 965-973.
9. Klimovich M.A., Paramonov D.V., Kozlov M.V., Trofimov V.I., Shishkina L.N. Interrelation between the Peroxidation Parameters of Natural Lipids and the Liposomes Characteristics Formed from Them. *Modern Problems in Biochemical Physics. New Horizons*. N.Y.: Nova Science Publishers, 2012, pp. 255-262 (Chapter 32).
10. Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V. Functioning Similarity of the Physicochemical Regulatory System Parameters of the Lipid Peroxidation on the Membrane and Organ Levels. *Pharmaceutical and Medical Biotechnology. New Perspectives*. N.Y.: Nova Science Publishers, 2013, pp. 151-157 (Chapter 14).

MICELLAR FORMATION OF NATURAL LIPIDS IN THE POLAR MEDIA**Shishkina L.N., Klimovich M.A., Kozlov M.V., Plashchina I.G., Povkh A.Yu.**

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences

Kosygin st., 4, Moscow, 119334, Russia; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Abstract. Comparative analysis of the spontaneous aggregation of lecithin in systems with the different polarity and the interrelation between the lipid composition and size of liposomes formed from them by means of ultrasound are performed used the soy bean lecithin and lipids isolated from organs of mice as sources of the natural lipids. Analysis of the experimental data allows us to suppose that the process of the spontaneous aggregation of micelles from the natural lipids in the polar medium depends on the medium properties to more extent than from the quantitative ratio of the phospholipid fractions in lecithin samples. However, the role of the lipid composition including the minor fractions of phospholipids substantially increases under the micelle formation from the natural lipids in the polar medium by means of ultrasound. The understanding of the membrane-genesis in the biological systems is due to a necessity of further Investigations of the micellar formation mechanism from the natural lipids in the polar media.

Key words: *lecithin, lipids from the organs of mice, dynamic light scattering, phospholipid composition.*