

## МИЦЕЛЛООБРАЗОВАНИЕ СФИНГОМИЕЛИНА В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Шишкина Л.Н., Маракулина К.М., Плащина И.Г.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

**Аннотация.** Обобщены результаты изучения процесса мицеллообразования сфингомиелина (СМ), одного из основных фосфолипидов внешнего слоя мембран в клетках млекопитающих, в зависимости от концентрации препарата, наличия других фосфолипидов в малых количествах, времени экспозиции раствора и полярности среды. Чистоту коммерческих препаратов СМ контролировали методом тонкослойной хроматографии. Используя метод динамического рассеяния света, в неполярной среде (*n*-гексан) обнаружена нелинейная зависимость размера мицелл СМ как от концентрации препарата, так и времени экспозиции раствора при самопроизвольной агрегации. Размер мицелл СМ в *n*-гексане уменьшается с ростом суммарного содержания лизоформ и фосфатидилэтаноламина и увеличивается с возрастанием суммарного содержания СМ и фосфатидилхолина в составе ФЛ коммерческих препаратов СМ. Агрегация СМ в полярной среде (0.8%-ный водно-этанольный раствор) приводит к существенному уменьшению среднего диаметра мицелл по сравнению с аналогичным показателем в *n*-гексане при равных концентрациях СМ в растворе. Очевидно, это обусловлено разрывом внутримолекулярной водородной связи в молекуле СМ между ОН-группой остатка сфингозина и эфирным кислородом в фосфатной группе головки СМ в полярной среде.

**Ключевые слова:** сфингомиелин, агрегация, полярность среды, тонкослойная хроматография, динамическое рассеяние света.

## FORMATION OF SPHINGOMYELIN MICELLES UNDER DIFFERENT CONDITIONS

Shishkina L.N., Marakulina K.M., Plashchina I.G.

Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences,

Kosygin St., 4, Moscow, 119334, Russia

e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

**Abstract.** Results of the investigation about the formation of the sphingomyelin (SM) micelles, which is one of the major phospholipids in the outer leaflet of membranes in the animal cells, are generalized in dependence on the preparation concentration, presence of another phospholipids at the low amounts, the exposure duration of solution and the medium polarity. The purity of commercial samples of SM was controlled by thin layer chromatography method. Non-linear dependence of the SM micelle size both on the preparation concentration and the exposure duration of solution was discovered by means of dynamic light scattering method under the self-aggregation in non-polar medium (*n*-hexane). When the sum content of lysoforms and phosphatidylethanolamine decreases and the sum amount of the SM and phosphatidylcholine increases in the phospholipid composition of SM commercial preparations, the size of the SM micelles in hexane is found to be bigger. The SM aggregation in polar medium (0.8 % water-ethanol solution) results in the substantial diminution of the mean diameter of micelles as compared with than in hexane under equal concentrations of SM in the solution. Obviously, it is due to the disruption of an intramolecular H-bond between of ОН-group of the sphingosine moiety and the phosphate ester oxygen of the head group in polar medium.

**Key words:** sphingomyelin, aggregation, medium polarity, thin layer chromatography, dynamic light scattering.

Мембраны клеток млекопитающих характеризуются четко выраженным ассиметричным расположением фосфолипидов между внутренним и внешним слоями, поэтому, несмотря на относительно небольшую долю в составе фосфолипидов, сфингомиелин (СМ) является одним из основных фосфолипидов (ФЛ) внешнего слоя мембран [1]. Это определяет его значение как одного из важных компонентов в структурной организации мембран и регуляции клеточного метаболизма [2] и вызывает необходимость более детального изучения его физико-химических свойств в различных системах.

Целью настоящей работы явилось исследование поверхностно-активных свойств СМ в зависимости от условий образования мицелл и полярности среды.

Как источник СМ использовали хлороформный раствор СМ из мозга быка (Россия). После отгонки хлороформа СМ растворяли в *n*-гексане (неполярная среда) или 0,8 %-ном растворе этанола в воде (полярная среда). Качественный и количественный состав липидов анализировали методом тонкослойной хроматографии, используя стеклянные пластинки 9×12 см, силикагель типа G (Sigma, USA) и смесь хлороформ: метанол: ледяная уксусная кислота: дистиллированная вода: в соотношении 12,5:7,5:2:1 (v/v) в качестве мобильной фазы. На каждый образец анализировали не менее пяти параллельных хроматографических дорожек. Методика анализа подробно изложена в работе [3]. Размер мицелл определяли методом динамического рассеяния света. Измерения проводили на ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instrument, UK), находящемся в распоряжении Центра коллективного пользования ИБХФ РАН и снабженном 4 мВ He-Ne лазером, автоматической программой обработки данных, при температуре 25 °С и фиксированном угле рассеяния 173 °. Определение распределения частиц по размерам в каждой пробе повторяли не менее пяти раз. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятым методом вариационной статистики, используя пакет программ MO Excel. Данные представлены в виде среднеарифметических значений с указанием их среднеквадратичной ошибки ( $M \pm m$ ).

Ранее было установлено, что коммерческие препараты ФЛ могут существенно различаться и по содержанию ФЛ в составе общих липидов, и по фракционному составу ФЛ [4,5]. В работе были использованы 6 образцов коммерческих препаратов СМ. Анализ состава их липидов показал, что доля ФЛ в составе общих липидов в использованных образцах варьировала от  $50,2 \pm 2,4$  % до  $75,4 \pm 3,6$  %, а содержание основной фракции (СМ) от  $91,15 \pm 0,55$  % до  $97,25 \pm 0,50$  %. Следовательно, суммарная доля остальных фракций ФЛ не превышает 8,2%. Однако, несмотря на преобладающее содержание в составе ФЛ исследованных образцов основной фракции (СМ), наличие других фракций ФЛ даже в малых количествах может оказывать влияние на процесс мицеллообразования. Это следует из того, что характер упаковки ФЛ в фазе геля и в биологических мембранах существенно зависит от их природы [6].

Безусловно, самопроизвольная агрегация ФЛ в неполярном растворителе является достаточно сложным динамическим процессом. Тем не менее, при концентрациях СМ в растворе 20 мкг/мл уже в течение первых 10-15 мин. более 80 % агрегатов представлены мицеллами одного размера. При повышении концентрации СМ равновесное состояние системы достигается быстрее, и доля частиц с равным средним динамическим диаметром варьирует от 91,3 % до 100 %.

Первым этапом работы явилось изучение динамического диаметра мицелл СМ в зависимости от времени экспозиции раствора в неполярной среде. Результаты экспериментов, использованные препараты СМ которых содержали 92,8-96,7 % основной фракции, представлены на рисунке 1. Анализ представленных данных свидетельствует как об отсутствии линейной зависимости, так и о росте размера мицелл с увеличением времени экспозиции. При этом эффекты более выражены при содержании СМ в растворе 35 мкг/мл (см. рис. 1, кривая 2).

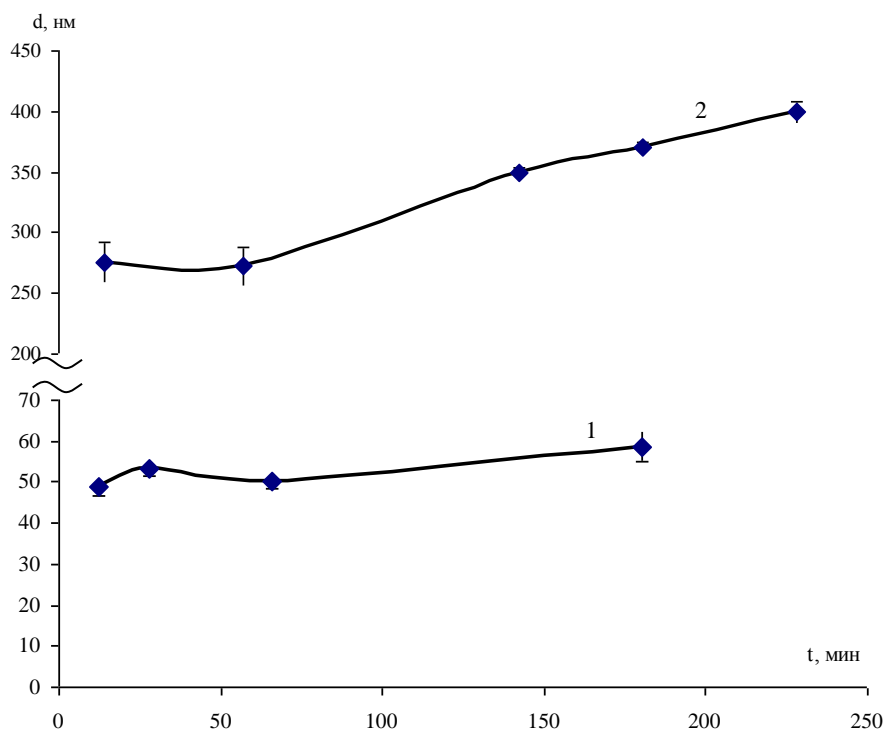


Рисунок 1 – Зависимость среднего диаметра мицелл сфингомиелина в гексане от времени экспозиции раствора: 1 – [СМ] = 20 мкг/мл; 2 - [СМ] = 35 мкг/мл

Необходимо отметить также, что данные образцы СМ характеризовались почти равным относительным содержанием лизоформ (0,66-0,8 %) и фосфатидилэтаноламина (1,35-1,65 %) в составе ФЛ, т.е. фракций, способствующих образованию кластеров в липидном бислое [6].

Как видно из данных рисунка 1, при более высокой концентрации СМ средний диаметр образовавшихся мицелл существенно больше. Более детальный анализ зависимости размера мицелл от концентрации СМ выявил отсутствие линейной зависимости размера мицелл и от концентрации СМ в растворе, что следует из данных, представленных на рисунке 2. В данной серии экспериментов доля лизоформ в ФЛ препаратов СМ не превышала 0,8 %, относительное содержание фосфатидилэтаноламина варьировало от 0 до 1,65 %, а времена экспозиции растворов составляли 2,5-3 часа. Выбор времени экспозиции обусловлен тем, что именно в этот срок выявлены самые незначительные изменения размера мицелл СМ при анализе зависимости данного параметра от времени экспозиции раствора (см. рис. 1), а системы были представлены практически во всех случаях мицеллами одного размера (доля основной фракции варьировала от 97,1 до 100 %).

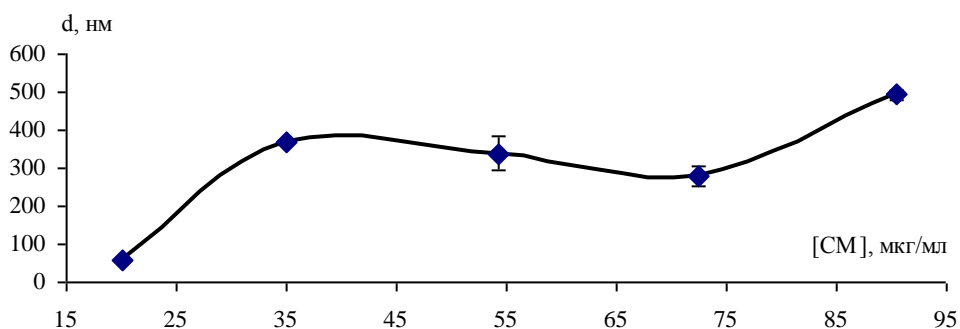


Рисунок 2 – Зависимость среднего диаметра мицелл сфингомиелина в гексане от концентрации препарата в растворе

Изменение размера агрегатов в зависимости от концентрации СМ, с нашей точки зрения, обусловлено наличием в препаратах других фракций ФЛ. Действительно, сопоставление размеров мицелл, образовавшихся в *n*-гексане спустя 1 час после начала эксперимента при концентрации 35 мкг СМ в 1 мл гексана, позволило выявить следующие закономерности. При увеличении суммарного содержания лизоформ (обладают выраженными детергентными свойствами) и фосфатидилэтаноламина (характеризуется образованием гексагональной упаковки полярных головок) в последовательности 0,82±0,03%; 1,65±0,20; 2,45±0,50 % в составе ФЛ диаметр агрегатов уменьшается в ряду 735±90 нм; 550,0±9,5 нм и 274±10 нм. Одновременно прямая корреляция обнаружена между суммарным содержанием в растворе СМ и фосфатидилхолина, т.е. фракций ФЛ, поддерживающих ламеллярное строение липидного слоя, и средним диаметром мицелл основной фракции при той же концентрации СМ и времени экспозиции раствора в течение 2,5- 3 часов (см. рис. 3).

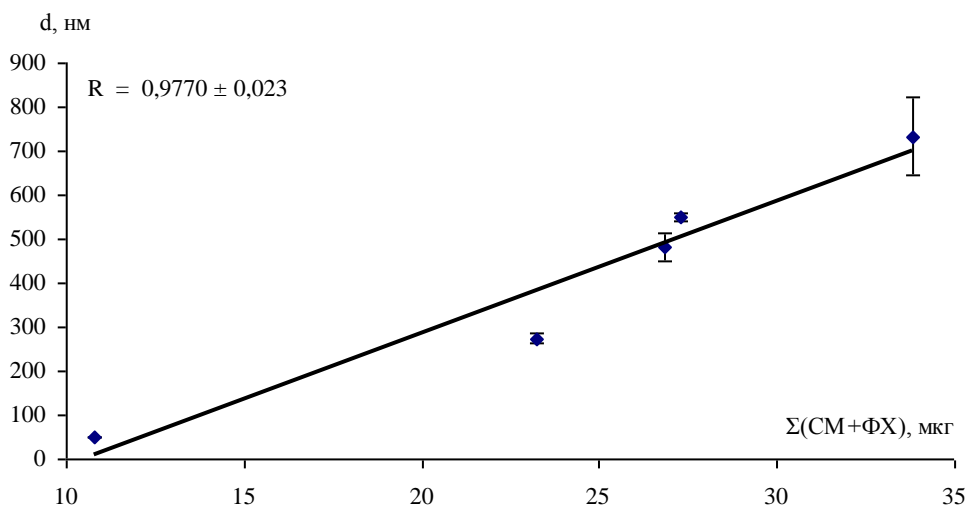


Рисунок 3 – Взаимосвязь между размером мицелл сфингомиелина в *n*-гексане и суммарным содержанием сфингомиелина и фосфатидилхолина в растворе

Для изучения влияния полярности среды на мицеллообразование СМ анализ проводили, используя 0,8 % раствор этанола в дистиллированной воде. Состав липидов данной партии СМ соответствовал составу препаратов СМ в экспериментах в неполярной среде: суммарная доля СМ + фосфатидилэтаноламина не превышала 1,55 %, относительное содержание СМ равнялась 92,65±0,40 %, а доля ФЛ в составе липидов препарата была 66,1±3,9 %. В то время как в гексане размер мицелл СМ при концентрации препарата в растворе 35 мкг/мл спустя 15-20 мин после начала эксперимента был 276±16 нм (доля основной фракции 69,9 %), в полярной среде размер основной фракции мицелл (85,5±4,0 %) составлял 20,5±0,9 нм. Столь существенное уменьшение размера агрегатов СМ в полярной среде, очевидно, обусловлено разрывом внутримолекулярной водородной связи в молекуле СМ между ОН-группой остатка сфингозина и эфирным кислородом в фосфатной группе головки СМ, что было показано методом ЯМР в работе [7].

Таким образом, условия формирования мицелл, наличие других фракций ФЛ даже в незначительных количествах, как и полярность среды оказывают существенное влияние на способность СМ к самопроизвольному образованию мицелл. Это необходимо учитывать при использовании различных модельных систем для анализа поверхностно-активных свойств различных биологически активных соединений при первичном отборе наиболее перспективных для практического использования.

**Список литературы / References:**

1. Quinn P.J. Plasma membrane phospholipid asymmetry. *Subcell. Biochem.*, 2002, vol. 36, pp. 39-60.
2. Ramstedt B., Slotte J.P. Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Letters*, 2002, vol. 531, pp. 33-37.
3. Shishkina L.N., Kushnireva Ye.V., Smotryaeva M.A. The combined effect of surfactant and acute irradiation at low dose on lipid peroxidation processes in tissues and DNA content in blood plasma of mice. *Oxidation Commun.*, 2001, vol. 24, pp. 276-286.
4. Sotirhos N., Herslof B., Kenne L. Quantitative analysis of phospholipids by <sup>31</sup>P-NMR. *J. Lipid Res.*, 1986, vol. 27, pp. 386-392.
5. Hielsher R., Hellwig P. Specific Far Infrared Spectroscopic Properties of Phospholipids. *Spectroscopy: An International J.*, 2012, vol. 27, iss. 5-6, pp. 525-532.
6. Геннис Р. *Биомембраны: Молекулярная структура и функции*. М.: Мир, 1997, 624 с. [Hennis R. *Biomembranes: Molecular structure and functions*. М.: Mir, 1997, 664 p. (In Russ.)]
7. Talbott M., Vorobiov I., Borchman D., Taylor K.G., DuPre D.B., Yappert M.C. Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin. *Biochem Biophys. Acta*, 2000, vol. 1467, pp. 326-337.

**РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ**

Патапович М.П., Булойчик Ж.И., Пашковская И.Д., Нечипуренко Н.И., Зажогин А.П.  
Белорусский государственный университет  
пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, РБ  
e-mail: zajogin\_an@mail.ru

**Аннотация.** Разработана методика для количественного определения основных эссенциальных элементов в твердых биологических субстратах (волосах). В качестве модельных систем для изготовления стандартных образцов опробованы х/б нитки различной толщины. Показана возможность повышения чувствительность определения элементов методом лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии с использованием ортофосфата калия в качестве осадителя. Методом лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии со вдвоенными импульсами изучено пространственное распределение кальция, магния и алюминия по длине волос пациентов с нарушением мозгового кровообращения. Оценена динамика изменения содержания этих элементов за длительный промежуток времени, предшествующий заболеванию. Предложенная методика дает возможность заранее оценить риск возникновения патологии мозга и, возможно, предупредить его развитие профилактическими мерами.

**Ключевые слова:** твердые биологические субстраты; лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; вдвоенные лазерные импульсы; пространственное распределение элементов; кальций, магний, алюминий.

**RETROSPECTIVE ESTIMATES OF THE CONTENT OF ESSENTIAL ELEMENTS FOR THE PATENTS WITH CEREBRAL DISEASES OBTAINED USING LASER ATOMIC-EMISSION SPECTROMETRY**

Patapovich M.P., Bulovichik J.I., Pashkovskaya I.D., Nechipurenko N.I., Zajogin A.P.  
Belarusian State University  
Nezavisimosti av., 4, Minsk, 220030, Belarus  
e-mail: zajogin\_an@mail.ru

**Abstract.** A quantitative technique for identification of the principal essential elements in solid biological substrates (hair) has been developed. The standard samples have been prepared with the use of different-breadth cotton yarn as model systems. The possibility to improve sensitivity of the technique due to the use of laser atomic emission spectrometry and of potassium orthophosphate as a precipitator has been demonstrated. Double-pulse laser atomic-emission spectrometry has been applied to study the spatial distribution of calcium, magnesium, and aluminum along the hair length of the patients with disturbances in cerebral circulation. The dynamics of changes in the content of these elements has been analyzed for a great space of time preceding the disease. The proposed technique enables one to estimate the chances for the brain pathology in good time and possibly to warn about the disease development or to suggest the preventive measures.

**Key words:** solid biological substrates; laser atomic-emission spectrometry; double laser pulses; spatial distribution; calcium, magnesium, aluminum.

К настоящему времени накоплены многочисленные научные данные, показывающие взаимосвязь возникновения заболевания с аномальным содержанием макро- и микроэлементов в организме человека. Доказано, что деформированный минеральный обмен не только вносит свой вклад в патогенез заболеваний, но и изменяет фармакокинетический и фармакодинамический ответ на лекарственное воздействие [1].

Для ранней диагностики ряда заболеваний, оптимального подбора лечения, коррекции восстановительных процессов существует потребность в экспрессных методиках определения содержания элементов в биологических материалах.