

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАН ПРИ РАЗВИТИИ СПОНТАННОГО ЛЕЙКОЗА У МЫШЕЙ ЛИНИИ AKR

Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ: e-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Целью работы было изучение изменений структуры мембран при развитии спонтанного лейкоза у мышей линии АКР. Наблюдались похожие стадийные изменения текучести прибелковых и липидных областей изучаемых мембран с отставанием стадий изменений в липидных областях от прибелковых. Было показано, что структурное состояние мембран играет одну из важных ролей при развитии патологии.

Ключевые слова: микровязкость мембран, мыши линии AKR.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое количество исследований связано с изучением структуры и активности белков, в которых не учитывается липидный состав и структура мембран. Между тем, большинство белков и ферментов являются трансмембранными или мембраносвязанными, и их функциональность и активность напрямую зависят от липидного состава и структуры мембран.

В организме существует физико-химическая система регуляции клеточного метаболизма мембранами, основанная на связи между процессами пероксидного окисления липидов (ПОЛ) мембран с одной стороны и скоростью обновления липидов – с другой [1-3]. В процессе регуляции ПОЛ происходит изменение липидного состава, что, в свою очередь, приводит к изменению структуры мембран. Кроме того, известно, что многие мембранные белки и ферменты являются липидзависимыми и их активность тесно связана со структурным состоянием липидного бислоя [2]. Одной из важных структурных характеристик биологических мембран является микровязкость. Микровязкость липидного бислоя тесно связана с процессами окисления, поэтому при исследовании действия антиоксидантов на клеточные структуры необходимо изучать изменение вязкостных свойств липидного бислоя мембран.

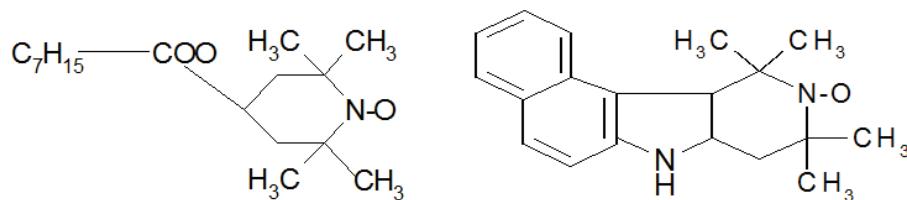
В настоящее время не вызывает сомнений эффективность действия биологически активных веществ в сверхмалых дозах ($< 10^{-13}$ М) [5-7], механизм действия которых до конца не изучен. Одним из возможных механизмов действия является чувствительность текучести липидного бислоя к веществам не только в физиологических, но и малых концентрациях.

Поэтому в работе было изучено действие синтетического антиоксиданта фенозана в разных дозах на микровязкость липидных и прибелковых областей мембран мозга мышей при развитии спонтанного лейкоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах со спонтанным лейкозом использовали мышей линии АКР, самок, массой 25-30 г, подверженных развитию спонтанного лейкоза под действием вируса мышевого лейкоза. Животных получали из научно-исследовательской лаборатории экспериментальных биологических моделей. Мышей содержали в условиях вивария на стандартной диете. Средняя и максимальная продолжительность жизни самок составляла 254 ± 6 и 412 ± 14 суток соответственно. Объектом исследований служил головной мозг мышей, который извлекали ежемесячно на протяжении 3-9 месяцев. В каждом опыте использовали от 8-10 животных. Проведено 2-3 серии экспериментов. Микросомы и синаптосомы получали методом дифференциального центрифугирования [8].

Микровязкость липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоксилперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксил (зонд II), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН.



Зонд I

Зонд II

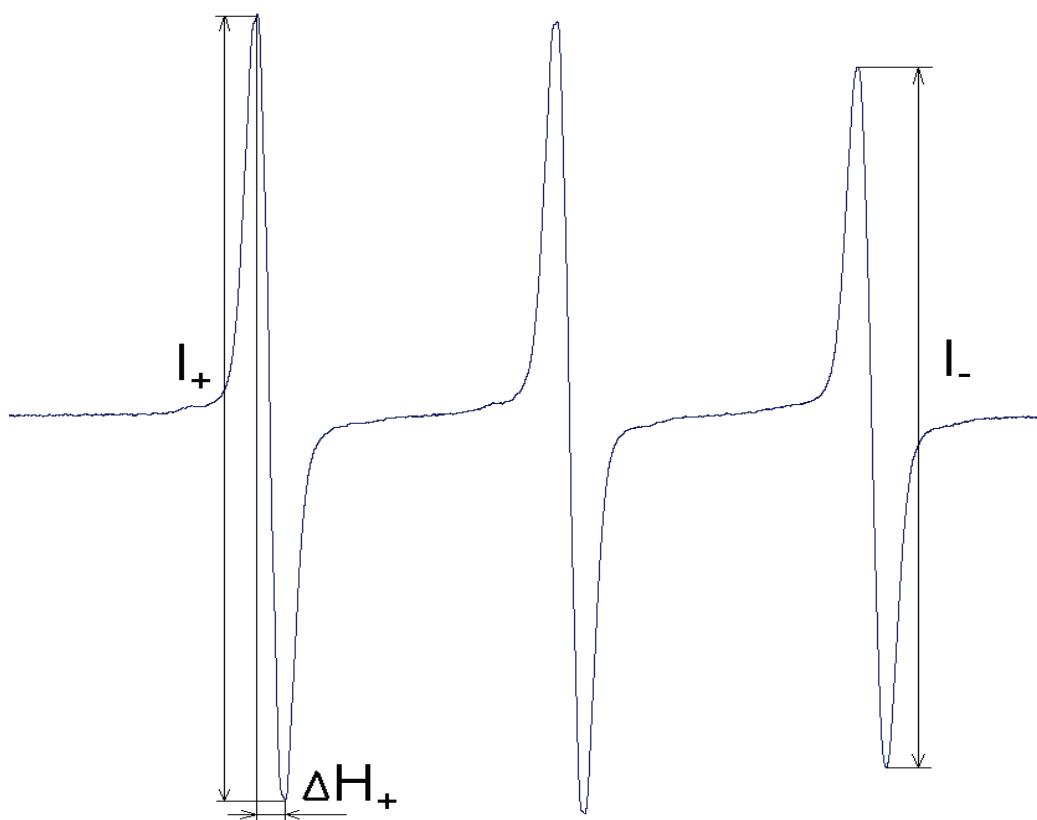


Рисунок 1. Пример спектра ЭПР спиновых зондов I и II

В работе [10] показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое липидных компонент мембраны, а зонд II - в липидах, прилегающих к белкам, что позволяет по поведению зондов I и II в липидном бислойе судить о липид-белковых взаимодействиях в мембранах. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I "липидным", а зонд II – "белковым".

Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле $\tau_c=6.65\times10^{-10}\times\Delta H_+\times((I_+/I_-)^{0.5}-1)$, приведенной в работе [11]. Регистрацию спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре ER 200D-SRC фирмы "Bruker".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью работы было изучение изменений структуры мембран при развитии спонтанного лейкоза у мышей линии AKR. В процессе развития патологии у мышей (от 3-9 месяцев) обнаружены значительные изменения текучести мембран как синаптосом (рис. 2b), так и микросом (рис. 2a). На ранней стадии (3-4 месяца) микровязкость прибелковых областей синаптосом (рис. 2b) растет на 20 %, а затем в течение долгого периода падает до значений ниже изначальной τ_c . После седьмого месяца значение времени корреляции вращательный диффузии прибелкового зонда резко увеличивается (до 1,5 раз). Аналогичные изменения микровязкости прибелковых областей наблюдаются и в микросомах (рис. 2a). В липидных областях мембран синаптосом и микросом наблюдаются подобные периодические изменения. Микровязкость липидных областей исследуемых мембран растет вплоть до 6го месяца, с шестого по 8 месяц падает, а на поздних стадиях снова показывает тенденцию к росту.

Как видно из полученных данных, наблюдаются похожие стадийные изменения текучести прибелковых и липидных областей изучаемых мембран с отставанием стадий изменений в липидных областях от прибелковых. Это означает, что при развитии спонтанного лейкоза в первую очередь изменяются функциональные характеристики белков, что, в свою очередь, приводит к изменению структурного состояния липидного бислоя. Такие изменения характерны при развитии опухолей [12], и указывают на то, что в процессе развития патологии происходит изменение состава липидов мембран на уровне их синтеза. Так, например, нами в работе [9] было показано, что удаление обонятельных луковиц у мышей приводит к симбатным изменениям микровязкостей липидной и прибелковых областей, тогда как у ложнооперированных животных эти изменения антибатны (Рис. 3). Таким образом, симбатные изменения, по-видимому, характерны при наличии патологических состояний, связанных с изменениями функционирования белков и ферментов, так как состав и структура липидного бислоя мембран тесно связана с функциональной активностью мембранных ферментов и белков.

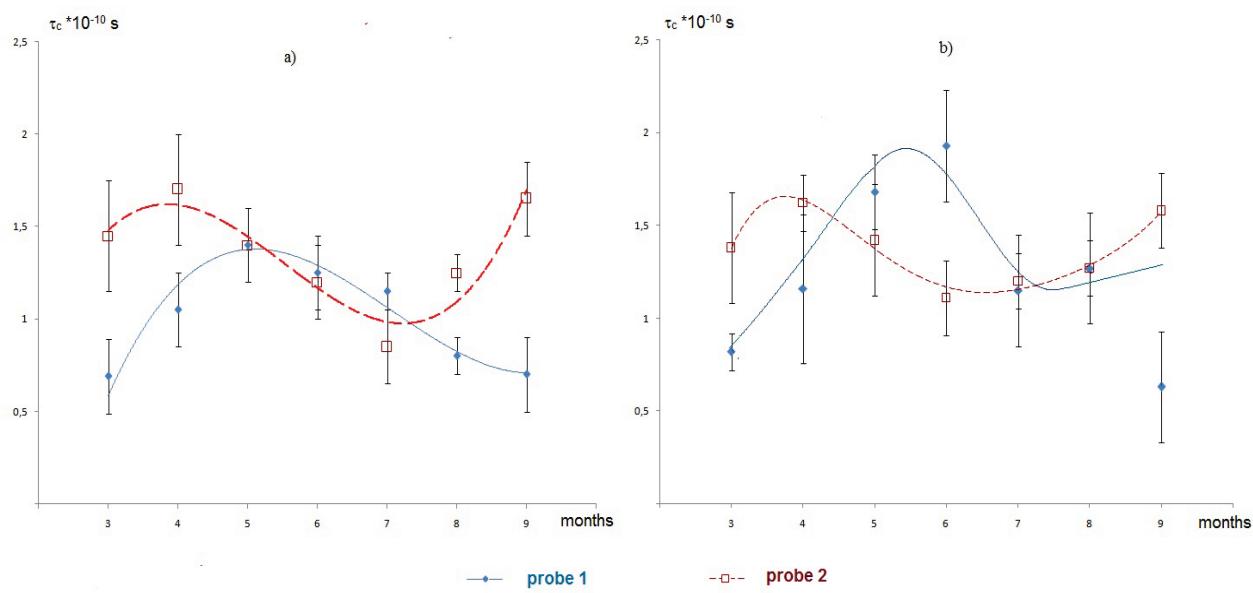


Рисунок 2. Динамика изменения времени корреляции вращательной диффузии при введении фенозана
а – микросомы, б – синаптосомы

На следующем этапе исследовали действие фенозана на микровязкость мембран микросом при развитии спонтанного лейкоза у мышей. Фенозан вводили в концентрациях $2 \cdot 10^{-14}$ и $3 \cdot 10^{-4}$ в латентный период развития патологии (3-6 месяцев). Изменения микровязкости микросомальных мембран через двое суток и через месяц показаны на рисунке 4 (а, б). Введение антиоксиданта в обеих дозах приводило к увеличению текучести липидных областей мембран (probe 1) через двое суток после введения. По истечении месяца после введения фенозана текучесть обеих областей мембран увеличивалась. Учитывая стадии изменения микровязкости при патологии (рис. 4), можно эффективно использовать введение фенозана с целью возвращения структурных характеристик к норме. Для этого необходимо вводить фенозан на 5-6 месяцев, когда микровязкость мембран повышена, а через месяц резко снижается. Таким образом, введение фенозана приведет к тому, что в период от 5 до 7-8 месяца текучесть липидного бислоя окажется близко к начальному контрольному уровню. Заметим, что время корреляции вращательной диффузии зондов через месяц после введения фенозана меняется в одну сторону относительно контроля. Такие изменения микровязкости характерны при развитии патологий [12].

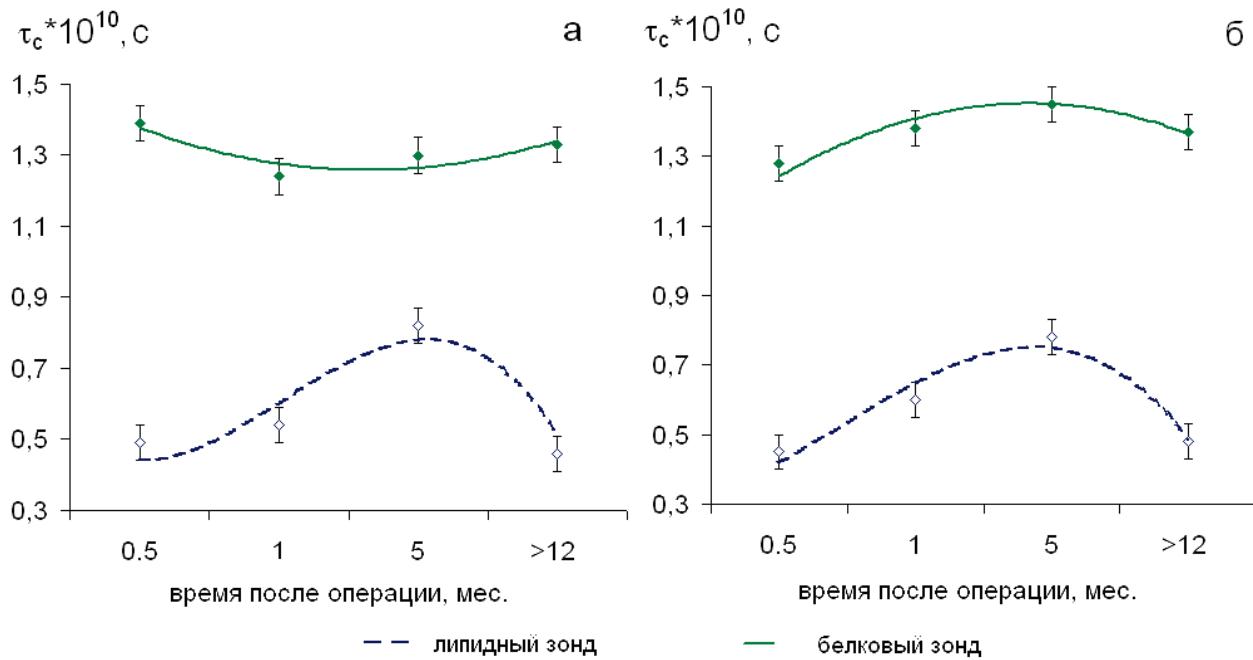


Рисунок 3. Изменение микровязкости мембран микросом мозга: а – при ложной операции; б – при удалении обонятельных луковиц

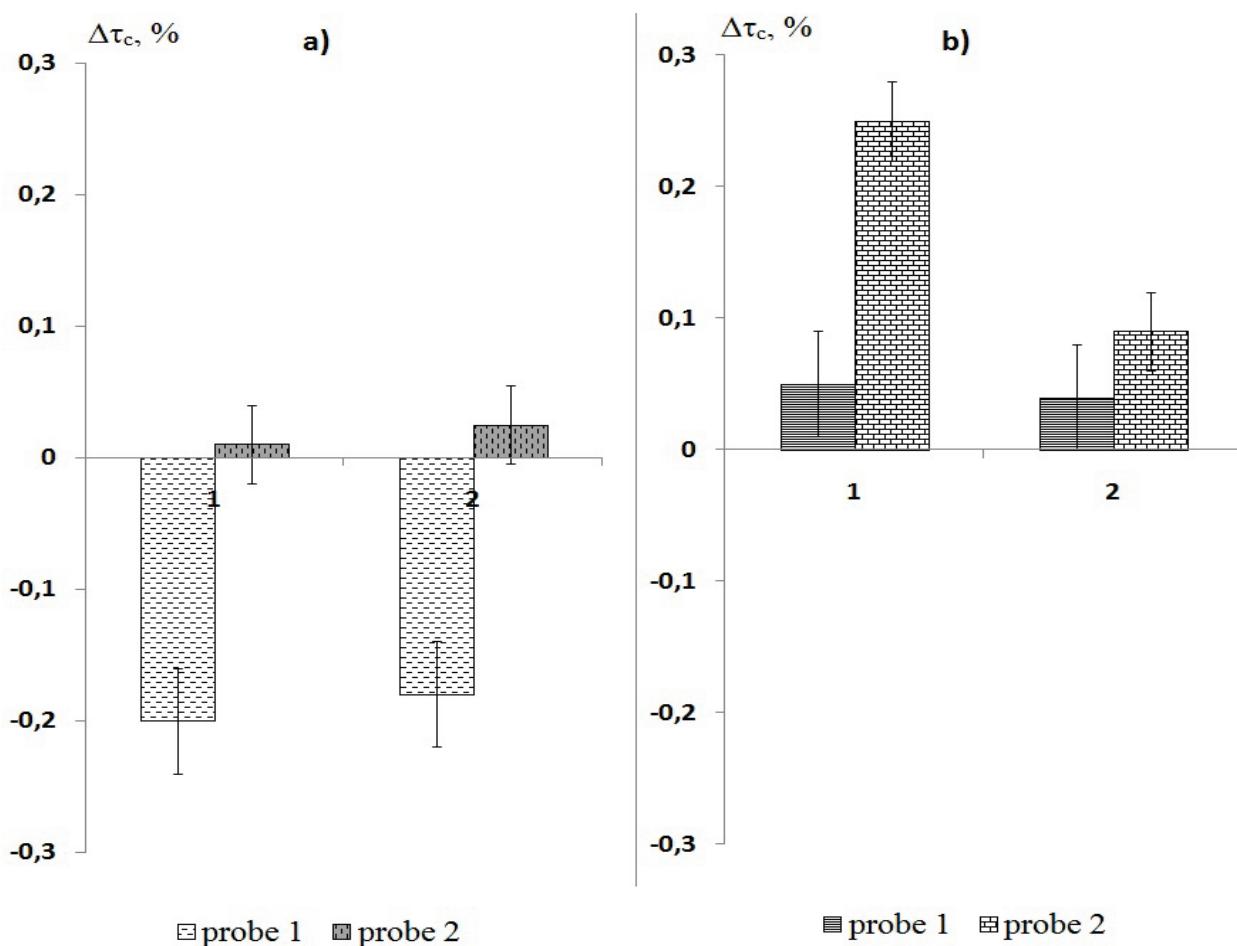


Рисунок 4. Относительные изменения времени корреляции вращательной диффузии зондов в микросомальных мембранах при введении фенозана в латентный период развития лейкоза: а – через 48 часов после введения; б – через месяц после введения

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что структурное состояние мембран играет одну из важных ролей в метаболизме. Поэтому мы считаем, что при исследовании развития различных патологий, необходимо изучать изменение структуры липидного бислоя. При исследовании влияния препаратов и биологически активных веществ, в том числе и антиоксидантов, необходимо учитывать изменения текучести мембран, что может помочь увеличить эффективность их использования при терапии патологий различного этиопатогенеза.

Список литературы / References:

1. Аристархова С.А., Архипова Г.В., Бурлакова Е.Б. [и др.] *ДАН СССР*, 1976, т. 228, с. 215. [Aristarhova S.A., Arhipova G.V., Burlakova E.B. [et al.] *DAN USSR*, 1976, vol. 228, p. 215. (In Russ.)]
2. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. *Успехи химии*, 1985, т. 54, № 9, с. 540. [Burlakova E.B., Hrapova N.G. *Uspekhi himii*, 1985, vol. 54, no. 9, p. 540. (In Russ.)]
3. Бурлакова Е.Б. *Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты*, М.: Химия, 2005, т. 2, с. 10. [Burlakova E.B. *Himicheskaya i biologicheskaya kinetika. Novye gorizonty*, Moscow: Himiya, 2005, vol. 2, p. 10 (In Russ.)]
4. Геннис Р. *Биомембранны. Молекулярная структура и функции*. М.: Мир, 1997, 208 с. [Gennis R. *Biomembrany. Molecular structure and functions*. Moscow: Mir, 1997, 208 p. (In Russ.)]
5. Бурлакова Е.Б. Эффект сверхмалых доз. *Вестник Российской Академии Наук*, 1994, 64(5), с. 425-431. [Burlakova E.B. The effect of ultralow doses. *Vestnik Rossiskoj Akademii Nauk*, 1994, 64(5), pp. 425-431 (In Russ.)]
6. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов. *Биофизика*, 2004, т. 49, с. 551-564. [Burlakova E.B., Konradov A.A., Mal'ceva E.L. The effect of ultralow doses of the biologically active agents and low-molecular physical factors. *Biofizika*, 2004, vol. 49, pp. 551-564. (In Russ.)]
7. Пальмина Н.П., Часовская Т.Е., Белов В.В., Мальцева Е.Л. Дозовые зависимости изменения микровязкости липидов биологических мембран, индуцированные синтетическим антиоксидантом фенозаном

- калия. *Докл. Акад. Наук.*, 2012, т. 443, с. 463-499. [Pal'mina N.P., Chasovskaya T.E., Belov V.V., Mal'ceva E.L. Dose dependences of the microviscosity changes of the biological membrane lipids induced by the synthetic antioxidant phenosan-potassium. *Dokl. Akad. Nauk.*, 2012, vol. 443, pp. 463-499 (In Russ.)]
8. Прохорова М.И. *Методы биохимических исследований*. Изд-во Ленинград. ун-та, 1982, 272 с. [Prohorova M.I. *Methods of the biochemical investigations*. Ed. of Leningrad. un-ty, 1982, 272 p. (In Russ.)]
9. Герасимов Н.Ю. Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Исследование методом ЭПР спиновых зондов изменений текучести мембран органелл мозга мышей с экспериментальной патологией, моделирующей болезнь Альцгеймера. *Биофизика*, 2013, т. 58, № 2, с. 252-256. [Gerasimov N.Yu., Goloshchapov A.N., Burlakova E.B. Studying by the method of EPR of spin probes of the changes of fluidity of brain organell membrane from mice with experimental pathology modeling Alzheimer's disease. *Biofizika*, 2013, vol. 58, no. 2, pp. 252-256. (In Russ.)]
10. Бинюков В.И., Борунова С.Ф., Гольдфельд М.Г. [и др.] *Биохимия*, 1971, 36(6), с. 1149. [Binyukov V.I., Borunova S.F., Gol'dfel'd M.G. [et al.] *Biochimiya*, 1971, 36(6), p. 1149. (In Russ.)]
11. Вассерман А.М., Бучаченко А.Л., Коварский А.Л., Нейма И.Б. *Высокомолекулярные соединения*, 1968, т. 10A, с. 1930. [Vasserman A.M., Buchachenko A.L., Kovarskij A.L., Nejma I.B. *Vysokomolekulyarnye soedineniya*, 1968, vol. 10A, p. 1930. (In Russ.)]
12. Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Термоиндуцированные структурные переходы в мембранах при введении антиоксидантов и злокачественном росте. *Биофизика*, 1980, т. 25, № 1, с. 97-101. [Goloshchapov A.N., Burlakova E.B. Thermoinduced structural transitions in membranes under antioxidant injection and with malignant growth. *Biofizika*, 1980, vol. 25, no. 1, pp. 97-101. (In Russ.)]
13. Bachurin S., Tkachenko I. [et al.] *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 2001, vol. 939, p. 219.
14. Grigorev V.V., Dranyi O.A., Bachurin S.O. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2003, 136(5), p. 474.
15. Grigoriev V.V., Proshin A.N., Kinzirskii A.S., Bachurin S.O. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2012, 153(3), p. 298.
16. Касаринская О.В., Виноградова Д.В., Шевцова Е.Ф., Зарипов В.Н. Модуляция свойств митохондрий как механизм нейропротекции. *Вестник молодых ученых ИвГУ*, 2014, вып. 14, с. 12-15. [Kasarinskaya O.V., Vinogradova D.V., Shevcova E.F., Zaripov V.N. Mitochondria properties modulation as the mechanism of the neuroprotection. *Vestnik molodyh uchenykh IvGU*, 2014, iss. 14, pp. 12-15. (In Russ.)]

CHANGE OF MEMBRANES MICROVISCOSITY IN DEVELOPMENT OF SPONTANEOUS LEUKEMIA IN AKR MICE LINES

Herasimov N.Yu., Nevrova O.V., Holoshchapov A.N., Burlakova E.B.

N.M. Emanuel Institute of biochemical physics RAS

Kosygin str., 4, Moscow, 119334, Russia: e-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

Abstract. Studying the changes of the membrane structure with the development of the spontaneous leucosis in AKR line mice was the aim of this paper. Similar phasic fluidity changes of lipidic and proteinic regions of the membranes with lag of the stages in lipidic areas with respect to proteinic regions was observed. It was shown that the structural state of membranes plays one of the central roles in the pathology development.

Key words: membranes microviscosity, AKR mice lines.