БИОХИМИЯ
Т. 47, вып. 5 1982

УДК 576.347 : 547.422.426.1

ВЛИЯНИЕ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ПО РАСПРЕДЕЛЕНИЮ В ДВУХФАЗНЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМАХ

БОЙКО Н. М., БОНДАРЕНКО В. А., БЕЛОУС А. М.

Изучали влияние различных криопротекторов — диметилсульфоксида (Me_2SO), глицерина, этиленгликоля и полиэтиленоксида (ПЭО, молекулярная масса 400 дальтон) на распределение митохондрий печени крысы в двухфазной полимерной системе ПЭО-4000 — декстран 500. Характер перекрестного распределения митохондрий, обработанных криопротекторами, свидетельствует о сдвиге изоэлектрической точки органелл в более кислую область pH. Степень влияния криопротекторов при этом изменялась в ряду: Me_2SO > ПЭО-400 > глицерин > этиленгликоль. Изменение коэффициента распределения органелл после инкубации с криопротекторами в водных полимерных системах указывает также на снижение их поверхностного заряда.

К числу криопротекторов, т. е. веществ, предохраняющих клетки от разрушения при замораживании, относятся как низкомолекулярные соединения — диметилсульфоксид (Me_2SO), глицерин, этиленгликоль (ЭГ), так и полимеры — полиэтиленгликоли (ПЭГ), декстраны и некоторые другие [1, 2]. Криопротекторы способны оказывать влияние на структуру и функцию плазматических мембран [3—6]. В результате воздействия Me_2SO и глицерина на плазматические мембраны наблюдается образование пузырьков и изменение плотности внутримембранных частиц [6, 7]. ПЭГ (с молекулярной массой 1000 дальтон) вызывают перегруппировку компонентов плазматических мембран и изменяют морфологию поверхности клеток [5, 8]. На везикулах саркоплазматического ретикулума показано, что ЭГ и Me_2SO способны тормозить АТР-зависимое поглощение Ca^{2+} и сопряженный с транспортом гидролиз АТР [9]. На основании имеющихся в литературе данных можно сделать заключение об определенном сходстве мембранных эффектов различных криопротекторов, влияющих прежде всего на характер подвижности отдельных компонентов мембраны. Во многих случаях действие этих соединений приводит к общим перестройкам структуры клетки, что позволяет использовать их в качестве агентов, промотирующих слияние клеток [3].

Имеющиеся в настоящее время единичные указания о взаимосвязи мембранных эффектов криопротекторов с их способностью защищать клетки при замораживании (например, [10]) не позволяют сделать однозначного вывода о роли криопротекторов как веществ, способных осуществлять стабилизацию клеток посредством специфических взаимодействий с компонентами мембраны. В настоящее время роль защитных агентов в процессе низкотемпературной консервации клеток рассматривается в основном в аспекте их влияния на среду замораживания [11].

В этой связи представляет интерес изучение свойств поверхности клеток и клеточных органелл, поскольку эти структуры экспонированы в среду и подвергаются наиболее значительному воздействию факторов замораживания. В настоящей работе представлены результаты изучения влияния некоторых криопротекторов на свойства мембран митохондрий. Изменение поверхности мембран регистрировали с помощью метода, предложенного для разделения клеток в водных фазах двух полимеров; этот метод является одним из наиболее чувствительных для обнаружения изменений таких параметров поверхности, как заряд, гидрофобность и сродство к различным химическим агентам [12].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Митохондрии, полученные по методу [13], инкубировали с соответствующим криопротектором, приготовленным на 0,32 М сахарозе, pH 7,4, в течение 30 мин при 2—4°. В работе использовали хроматографически чистые глицерин, этиленгликоль (ЭГ), полиэтиленоксид (ПЭО-400) и диметилсульфоксид (Me_2SO).

Фазовые системы готовили как описано [12] и, варьируя pH применяемого буфера, делали серию образцов с pH от 3,0 до 7,0. После температурной эквилибрации при 2° в каждую пробирку серии, исключая холостую, добавляли митохондрии (0,5 мг белка на 1 мл). Холостая проба содержала только полимеры. Конечные фазовые системы после добавления митохондрий имели следующий состав (на 1 кг фазовой системы): 1) 6%-ный декстран 500, 6%-ный полиэтиленоксид (ПЭО-4000), 320 ммоль сахарозы, 5 ммоль цитрат-фосфатного буфера, 50 ммоль сульфата натрия; 2) 6%-ный декстран 500, 6%-ный ПЭО-4000, 320 ммоль сахарозы, 5 ммоль цитрат-фосфатного буфера, 100 ммоль хлористого натрия.

После фазового разделения 1 мл верхней фазы и 1 мл нижней фазы осторожно отбирали шприцом и смешивали с 2 мл 0,32 М сахарозы. После этого спектрофотометрически регистрировали поглощение при 520 нм. Оставшиеся фазовые системы разрушали добавлением 2 мл воды и измеряли pH.

Количество митохондрий в верхней фазе выражали в % от общего содержания в системе. Распределение выражали в виде коэффициента распределения K, равного $C_{в.ф.}/C_{н.ф.}$, где $C_{в.ф.}$, $C_{н.ф.}$ — концентрации митохондрий в верхней и нижней фазе соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении pH-зависимого распределения амфотерных материалов в двух сериях фазовых систем, содержащих различные соли, можно получить точку пересечения кривых распределения, соответствующую той величине pH, при которой коэффициент распределения становится одинаковым в каждой из серии фазовых систем [12]. Эта величина pH, как показано в ряде работ [14—16], соответствует изоэлектрической точке (ИЭТ) изучаемых клеток и органелл.

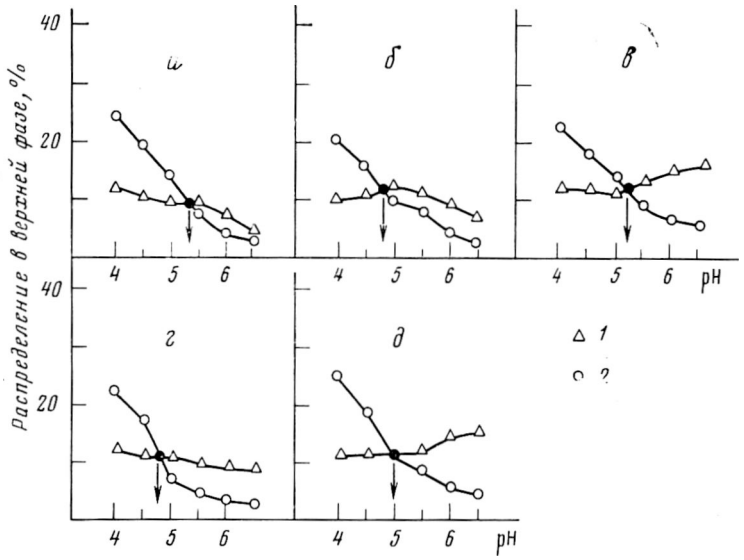


Рис. 1. Распределение митохондрий печени крысы как функции pH в системах: 6%-ный декстран 500, 6%-ный ПЭО-4000, 5 ммоль цитрат-фосфатного буфера, 320 ммоль сахарозы и 50 ммоль Na_2SO_4 (*1*) или 100 ммоль NaCl (*2*); содержание компонентов рассчитано на 1 кг системы. *а* — контроль, *б* — ПЭО-400, *в* — этиленгликоль, *г* — Me_2SO, *д* — глицерин

На рис. 1 представлено распределение митохондрий печени крыс в фазовых системах, содержащих хлорид и сульфат натрия. Полученные данные о том, что нормальные митохондрии имеют изоэлектрическую точку, равную 5,4, хорошо согласуются с результатами работы [14], где указанное значение ИЭТ митохондрий было определено как двухфазным распределением, так и изоэлектрическим фокусированием.

Изменение ИЭТ митохондрий, подвергнутых обработке различными криопротекторами, было не одинаковым. Общей особенностью обнаруженных изменений была направленность сдвига ИЭТ в сторону более кислых значений pH. Величина изменяемого интервала pH увеличивалась в ряду ЭГ (5,3), глицерин (5,0), ПЭО-400 (4,7), Me_2SO (4,6). Таким образом, Me_2SO и ПЭО-400 оказывают весьма сильное влияние на поверхностные свойства митохондрий, в то время как ЭГ практически такого влияния не оказывает.

Расположение изоэлектрической точки как нормальных, так и обработанных криопротекторами митохондрий в интервале pH между 4,0 и 6,0 свидетельствует о том, что при физиологических значениях pH (выше 7,0) поверхность митохондрий обогащена молекулами, несущими отрицательный заряд [14, 16]. Сдвиг в кислую область pH после обработки криопротекторами может указывать как на преимущественное (избирательное) взаимодействие молекул криопротекторов с положительно заряженными группами на поверхности мембраны, так и на дополнительное экспонирование на мембране отрицательно заряженных групп. Не исключена также возможность адсорбции молекул криопротектора на мембране. Некоторые из криопротекторов (Me_2SO и ПЭО-400) в водных растворах имеют слабо отрицательный заряд [1, 2], что делает достаточно вероятной последнюю возможность. Именно эти криопротекторы оказывают наиболее выраженное влияние на характер изменения ИЭТ митохондрий.

В то же время следует учитывать, что в большинстве мембран имеет место латеральная гетерогенность заряженных групп, характер распределения которых зависит от состава и состояния мембраны [17]. Можно предположить, что с изменением расположения поверхностных групп под влиянием криопротекторов связано изменение параметров мембраны, определяющих нормальное значение ИЭТ митохондрий. В целом данные, представленные на рис. 1, по-видимому, указывают на избирательное взаимодействие каждого из криопротекторов с мембраной митохондрий. В этой связи возникает вопрос о природе тех групп или молекул на мембране, с которыми взаимодействует криопротектор. Гетерогенность распределения заряда на мембране может определяться различным отношением кислых и основных аминокислот белков, экспонированных на поверхности мембраны, а также отношением положительно и отрицательно заряженных групп липидов и гликопротеидов. Следует отметить, что используемые нами фазовые системы (ПЭО-4000 — декстран 500) более чувствительны к изменению состояния положительно заряженных фосфатных групп [18]. Возможно, выявленные нами изменения ИЭТ под влиянием криопротекторов отражают более низкий вклад в распределение заряда на мембране положительно заряженных групп.

Более сложная картина влияния криопротекторов на состояние поверхности митохондрий наблюдается при сравнении коэффициентов распределения митохондрий K, т. е. отношения концентраций органелл в верхней и нижней фазе системы при определенной величине межфазной разности потенциалов. Из данных, представленных на рис. 2, видно, что отклонение $\lg K$ от величины, характерной для нормальных митохондрий, изменяется в ряду: ЭГ$<Me_2SO\simeq$глицерин. Сдвиг величины $\lg K$ ближе к 0 означает приближение значения K к 1, т. е. к равномерному распределению митохондрий в верхней и нижней фазе даже при наличии межфазной разности потенциалов. Это указывает на снижение общего электрического заряда поверхности [12, 14]. В белковых [19] и липидных [3] монослоях криопротекторы способны снижать поверхностный потенциал мембран, причем под влиянием Me_2SO наблюдается более выраженный эффект конденсации белковых монослоев. Возможно, изменение структуры белков под влиянием криопротекторов в определенной степени связано с их дегидратацией [20]. Влияние криопротекторов на структуру мембраны модельных липидных систем зависит от таких факторов, как природа полярных групп липидов, pH, наличия

двухвалентных катионов [4]. Снижение величины заряда липидных молекул под влиянием криопротекторов приводит к конденсации (стабилизации) заряженных участков мембраны, что проявляется в повышении температуры фазовых переходов липидов [4, 8]. Наиболее вероятно, что влияние криопротекторов (в первую очередь Me_2SO и глицерина) на заряд мембраны реализуется через изменение структурного состояния липидных и белковых молекул. В частности, как глицерин, так и Me_2SO способны нарушать гидрофобные взаимодействия в мембране

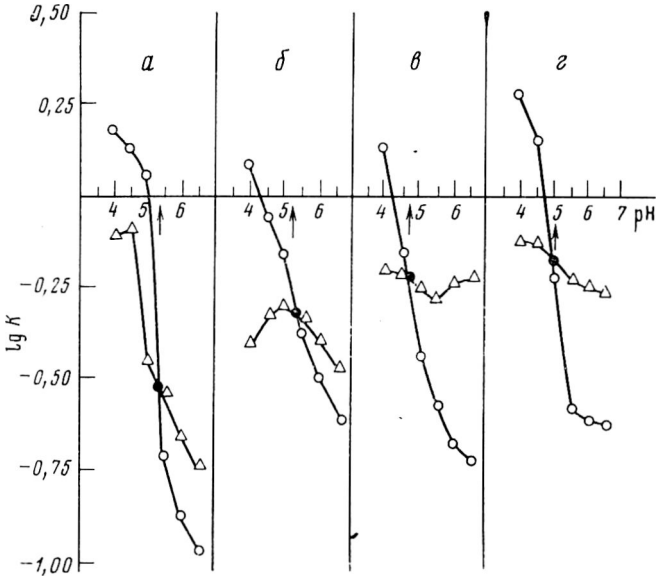


Рис. 2. pH-зависимость коэффициента распределения (K) митохондрий печени крысы в водно-полимерных системах (состав фазовых систем см. рис. 1). *а* — контроль, *б* — этиленгликоль, *в* — Me_2SO, *г* — глицерин

[21]. Me_2SO влияет также на водородные связи, стабилизирующие структуру мембранных компонентов [22]. Весьма вероятно, что полиэтиленоксиды также способны модифицировать структуру компонентов мембраны и параметры межмолекулярных взаимодействий. В частности, ПЭО с молекулярной массой 1000 дальтон способен индуцировать высвобождение липидов из мембран клеток [5]. В эритроцитах человека как глицерин, так и Me_2SO вызывают резкое ингибирование транспорта хлорида, которое коррелирует с уровнем перераспределения белковых компонентов мембраны [23]. В целом важен тот факт, что индуцированные криопротекторами изменения состояния поверхности мембран значительно повышают устойчивость клеток к действию фактора замораживания [24].

Поскольку биологические мембраны представляют собой высоко динамические системы, характеризующиеся несколькими структурными и морфологическими состояниями, которые модулируются температурой, двухвалентными ионами и различными химическими агентами [25], можно предположить, что в клетках существуют как основные, так и переходные типы архитектуры поверхности мембран, причем некоторые из переходных типов (в частности индуцированные криопротекторами) могут быть более устойчивыми к действию низких температур по сравнению с основными.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Белоус А. М., Шраго М. И., Пушкарь Н. С.* Криоконсерванты. Киев: Наукова думка, 1979. 200 с.
2. *Пушкарь Н. С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы. Киев: Наукова думка, 1978. 204 с.
3. *Maggio B., Ahkong Q. F., Lucy J. A.* Biochem. J., 1976, v. 158, № 3, p. 647—650.

4. *Lyman G., Preisler H. D., Papahadjopoulos D.* Nature, 1976, v. 262, № 5567, p. 360—363.
5. *McCammon J. R., Fan V. S. C.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 551, № 1, p. 67—73.
6. *De Groot C., Leene W.* Europ. J. Cell. Biol., 1979, v. 19, № 1, p. 19—25.
7. *Gilula N., Eger R. R., Rifkin D. B.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1975, v. 72, № 9, p. 3594—3598.
8. *Papahadjopoulos D., Poste G., Shaeffer B. E., Vail W. J.* Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 352, № 1, p. 10—28.
9. *The R., Hasselbach W.* Europ. J. Biochem., 1977, v. 74, № 3, p. 611—621.
10. *Pribor D. B.* Cryobiology, 1975, v. 12, № 4, p. 309—320.
11. *Meryman H. T.* Annual. Rev. Biophys. and Bioeng., 1974, v. 3, p. 341—363.
12. *Walter H.* In: Methods Cell. Biol., v. 9, N. Y.: Acad. Press, 1975, p. 25—50.
13. *Hunter F. E., Malison J. R., Bridges W. F.* J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 3, p. 693—699.
14. *Ericson I.* Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 356, № 1, p. 100—107.
15. *Lundberg P., Ericson I.* Biochem. and Biophys. Res. Communs, 1975, v. 65, № 2, p. 530—536.
16. *Akerlund H.-E., Andersson B., Persson A., Albertsson P. A.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 552, № 2, p. 238—246.
17. *Adam G., Adam G.* Expti Cell Res., 1975, v. 93, № 1, p. 71—78.
18. *Ericsson E., Albertsson P. A.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 507, № 3, p. 425—432.
19. *Weiner N. D., Lu M. Y., Rosoff M.* J. Pharm. Sci., 1972, v. 61, № 7, p. 1098—1101.
20. *Rammler D. H., Zaffaroni A.* Ann. N. Y. Acad. Sci., 1967, v. 141, p. 13—23.
21. *Rammler D. H.* In: Dimethylsulphoxide. I. Basic concepts. N. Y.: Marcel Dekker, Inc, 1971, p. 189—206.
22. *Henderson J. W. D.* Cryobiology, 1970, v. 6, № 6, p. 581—582.
23. *Mironescu S., Seed T. M.* Cryobiology, 1977, v. 14, № 5, p. 575—591.
24. *Gunn R. B., Kirk R.* J. Membrane Biol., 1976, v. 27, № 3, p. 265—282.
25. *Jain M. K., White H. B.* Adv. Lipid. Res., 1977, v. 15, p. 1—60.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины АН УССР, Харьков

Поступила в редакцию
3.IV.1981

EFFECTS OF CRYOPROTECTORS ON THE PROPERTIES OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE SURFACE AS DETERMINED BY DISTRIBUTION IN BIPHASIC AQUEOUS SYSTEMS

BOJKO N. M., BONDARENKO V. A., BELOUS A. M.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Ukrainian SSR Academy of Sciences, Kharkov

The effects of various cryoprotectors, e. g. dimethylsulfoxide (Me_2SO), glycerol, ethylene glycol and polyethylene oxide (PEO, m. w. 400) on the distribution of rat liver mitochondria in a biphasic polymeric PEO 4000-Dextrane 500 system were studied. The type of criss-cross distribution of cryoprotector-treated mitochondria suggests that the isoelectric point for the organelles is shifted towards the acidic values of pH. The effects of these agents decrease in the following order: Me_2SO>PEO-400>glycerol>ethylene glycol. The alteration of the distribution coefficient for the mitochondria after their incubation in aqueous polymeric systems in the presence of cryoprotectors is also indicative of a decrease of their surface charge.