

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПЕРЕКИСНЫМ ОКИСЛЕНИЕМ ЛИПИДОВ И МИКРОВАЗКОСТЬЮ В ЛИПОСОМАХ ИЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА. ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНОГО АНТИОКСИДАНТА И БЕЛКА

© 2019 г. Н.П. Пальмина, Н.Г. Богданова, Н.Н. Сажина, В.В. Каспаров, В.И. Бинюков, И.Г. Плащина, А.С. Антипова, М.Г. Семёнова

*Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН,
119334 Москва, ул. Косыгина, 4
E-mail: npalm@mail.ru*

Поступила в редакцию 15.04.2019 г.

После доработки 15.04.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Влияние перекисного окисления липидов на структуру биологических мембран и липосом исследуется уже достаточно давно, однако до сих пор существует ряд невыясненных вопросов, которые требуют дополнительного изучения. В частности, имеются противоречия в оценке состояния структуры глубоко лежащих липидов мембран в процессе развития перекисного окисления липидов. В данной работе проведены целенаправленные исследования изменения микровязкости липидной компоненты методом ЭПР с применением спинового зонда (16-доксилстеариновой кислоты) в процессе инициированного перекисного окисления липидов в липосомах из фосфатидилхолина и фосфатидилхолина с добавкой растительного антиоксиданта и инкапсуляцией в белковую оболочку при двух температурах – физиологической (37°C) и повышенной (60°C). Было установлено, что развитие перекисного окисления липидов во всех экспериментах сопровождается увеличением микровязкости глубоко лежащих слоев липидов, которое прямо пропорционально степени развития перекисного окисления липидов. Этот эффект обусловлен, главным образом, увеличением относительного содержания насыщенных жирных кислот в липидах липосом, хотя некоторый вклад в него могут вносить и новые структурные формы окисленных липидов. Методами динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии показано, что перекисное окисление липидов вызывает увеличение среднего диаметра и объема индивидуальных липосом, возрастание абсолютной величины их отрицательного дзета-потенциала. Растительный антиоксидант и белок тормозят этот процесс.

Ключевые слова: липосомы, перекисное окисление липидов, микровязкость липидов, диаметр и объем липосом, дзета-потенциал.

DOI: 10.1134/S0006302919040070

Липосомы из фосфатидилхолина (ФХ) широко используются в биологии и медицине как в качестве модели для изучения механизмов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и скрининга антиоксидантов [1,2], так и в качестве контейнеров для доставки в организм животных и человека различных лекарственных препаратов и нутрицевтиков – антиоксидантов, незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (омега-3 и омега-6), фосфолипидов, витаминов (группы В, Е и др.), витаминоподобных веществ (L-карнитина, липоевой кислоты, холина, убихинона и др.) [3,4].

Сокращения: ФХ – фосфатидилхолин, ПОЛ – перекисное окисление липидов, Cas-Na – казеинат натрия, C16 – 16-доксилстеариновая кислота, ЭМГ – эфирное масло гвоздики, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, АСМ – атомно-силовая микроскопия.

Наличие в ФХ полиненасыщенных жирных кислот обуславливает их подверженность перекисному окислению и вызывает необходимость в его предотвращении или торможении за счет введения антиоксидантов. Кинетика ПОЛ в липосомах является более сложным процессом, нежели окисление в гомогенных растворах [1,2,5], так как реакция ПОЛ в липосомах чрезвычайно чувствительна к таким параметрам, как структура липидной компоненты липосом и их способности к созданию агрегатов [5,6]. Кроме того, само ПОЛ может приводить к изменению агрегационной способности липосом и, соответственно, влиять на скорость процесса ПОЛ [5,6].

Несмотря на то что данные предположения были высказаны достаточно давно, их экспериментальная проверка осуществлялась в основном

на качественном уровне, причем большинство исследований было направлено на изучение структуры липосом, в которые встраивались индивидуальные окисленные липиды [7–9], в основном они касаются поверхностных слоев липидов (не более 8 Å). Сведения об изменении состояния глубоко лежащих слоев липидов, размеров и формы липосом в процессе их окисления носят отрывочный и противоречивый характер: есть отдельные данные как об увеличении [1,10], так и об уменьшении [1,12,13] микровязкости липидов при ПОЛ.

В связи с этим цель данной работы состояла в последовательном изучении изменения микровязкости глубоких слоев липидов (22–24 Å), где расположены жирнокислотные хвосты ФХ, среднего диаметра и объема липосом из ФХ сои с встроенным в них растительным антиоксидантом и инкапсулированных в казеинат натрия в процессе их инициированного окисления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использовали фосфатидилхолин фирмы Lipoid GmbH (Германия); казеинат натрия (Cas-Na) фирмы Sigma (Новая Зеландия); парамагнитный зонд 16-доксилстеариновую кислоту (C₁₆) фирмы Sigma (США); органические растворители фирмы Merck (Германия), азо-инициатор ААРН – 2,2'-азо-бис(амидинопропан)дигидрохлорид (Fluka, Германия). В качестве растительного антиоксиданта использовали эфирное масло фирмы Plant Lipids Ltd (Индия), которое вводили в липосомы в количестве 4% от веса ФХ.

Приготовление растворов казеината натрия. 1%-е растворы казеината натрия готовили в фосфатном буфере (рН 7,0, I = 0,001 М, с добавкой 0,02% азида натрия), перемешивая с помощью магнитной мешалки до полного растворения, центрифугировали (30 мин, 1800 g, 20°C.)

Приготовление липосом. Для приготовления липосом использовали суспензию ФХ (1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфохолин, фирмы Lipoid GmbH, Германия) с концентрацией 1 мг/мл в фосфатном буфере (рН 7,2, I = 0,001 М, с добавкой 0,02% (вес/объем) азида натрия) [14]. Смесь перемешивали в течение 20 мин в шейкере, добавляя эфирное масло гвоздики (ЭМГ), растворенное в 100–200 мкл этанола (4 вес.% по отношению к ФХ). Затем проводили механическую гомогенизацию полученной смеси при помощи гомогенизатора (Heidolph, Германия) – 2 мин при 20000 об/мин. Для формирования липосом использовали ультразвуковой гомогенизатор VCSX-130 (Sonics & Materials, США), работающий в режиме (15 с : 15 с) при мощности 50% от максимальной в течение 3 × 5 мин. Для предохранения липосом от нагревания и окисления во время

озвучивания раствор охлаждали во льду. Далее смесь липосом центрифугировали 20 мин при 13000 об/мин на настольной микроцентрифуге Micro 22 R Hettich Zentrifugen (Германия) при 4°C. Супернатант представлял собой готовые липосомы, которые затем хранили при 4°C и использовали в течение двух суток. Инкапсулирование липосом казеинатом натрия осуществляли согласно методике, изложенной в работах [14,15], со следующим весовым соотношением компонентов: Cas-Na : ФХ = 10 : 1, а для липосом с ЭМГ – Cas-Na : ФХ : ЭМГ = 10 : 1 : 0,04 при концентрации ФХ в липосомах 1 мг/мл.

Перекисное окисление липидов. Для инициирования окисления липосом использовали водорастворимый азо-инициатор ААРН (2,2'-азо-бис(амидинопропан)дигидрохлорид) с конечной концентрацией в растворе липосом 2 мМ. Окисление липосом проводили в пробирках, термостатированных при физиологической (37°C) или повышенной (60°C) температуре. Степень развития ПОЛ контролировали спектрофотометрически при регистрации во времени ультрафиолетовых спектров поглощения (от 200 до 300 нм) на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Продукты ПОЛ (диеновые конъюгаты) определяли по максимуму поглощения при λ = 233 нм [16].

Метод спиновых зондов. Для характеристики структурного состояния мембран липосом использовали метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Параметры, характеризующие структуру мембран, рассчитывали из спектров, полученных при температуре 293 К на ЭПР-спектрометре Bruker 200D (ФРГ) методом спинового зонда [17], в качестве которого для изучения микровязкости глубоколежащих областей липидного бислоя (~20 Å) использовали C₁₆ (16-доксилстеариновую кислоту). Микровязкость мембраны в области локализации зонда C₁₆ оценивали на основании времен вращательной корреляции зонда τ_{c1} и τ_{c2}, которые определяли по формулам для быстрого анизотропного вращения радикалов [17]

$$\tau_{c_1} = 6,5 \cdot \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{I_0}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ с},$$

$$\tau_{c_2} = 6,65 \cdot \Delta H_+ \left(\sqrt{\frac{I_{+1}}{I_-}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} \text{ с}.$$

Измерения проводили в Центре коллективного пользования ЭПР ИБХФ РАН.

Метод атомно-силовой микроскопии. Форму и объем липосом определяли методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Метод АСМ позволяет исследовать рельеф поверхности образца с разрешением порядка нескольких нанометров [18].

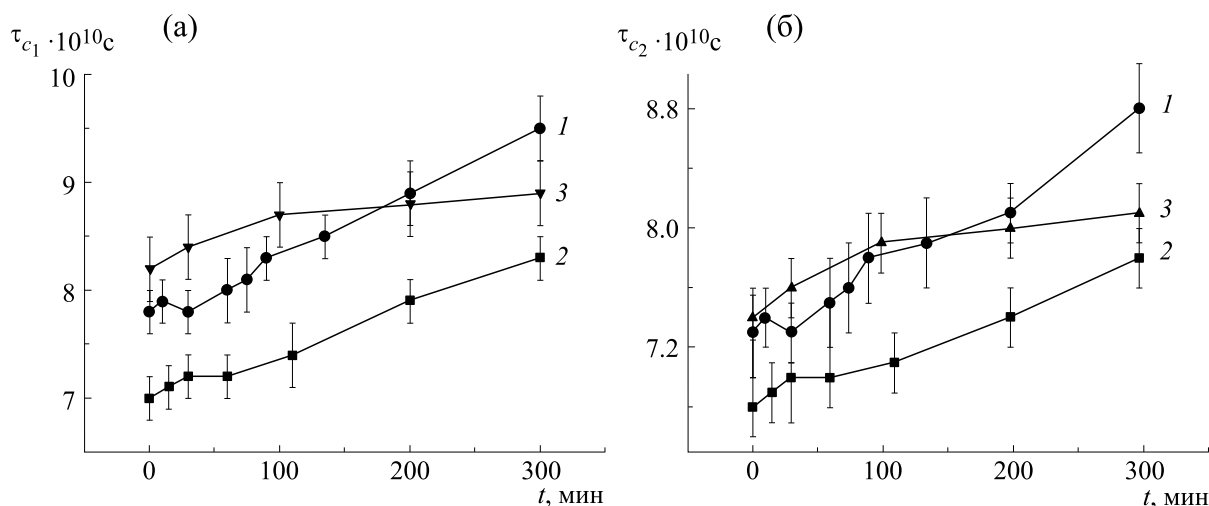


Рис. 1. Изменение времен вращательной корреляции τ_{c1} (а) и τ_{c2} (б) парамагнитного зонда S_{16} в липосомах из ФХ (кривые 1), ФХ с ЭМГ (кривые 2) и ФХ с казеинатом натрия (кривые 3) в процессе их инициированного окисления при 37°C.

АСМ-изображения липосом были получены с помощью атомно-силового микроскопа SMENA на платформе SOLVER P47 (NT-MDT, Россия), в полуконтактном режиме при частоте колебаний 150 кГц, с использованием кантилевера NSG 11. Измерения проводили на воздушно-сухих пленках препарата [18]. Размер сканируемой области составлял 20×20 мкм. Полученные АСМ-изображения обрабатывали с помощью программы Image Analysis V. 2.2.0 (NT-MDT, Россия). Измерения проводили в Центре коллективного пользования АСМ ИБХФ РАН.

Метод динамического светорассеяния. Измерения среднего диаметра и дзета-потенциала липосом в растворе проводили методом динамического светорассеяния на высокочувствительном анализаторе Zetasizer Nano ZS (фирма Malvern Instrument, Великобритания) [19] при температуре 25°C. Каждую пробу измеряли от 7 до 10 раз с 15 накоплениями.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных осуществляли методами непараметрической статистики с использованием пакета компьютерных программ Origin® 6.1 при статистической надежности 95% [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение структурного состояния липидного бислоя липосом в процессе ПОЛ. Ранее нами было показано, что растительный антиоксидант, эфирное масло гвоздики (ЭМГ), существенно ингибирует инициированное окисление липосом из фосфатидилхолина [16], аналогичный эффект наблюдался и в том случае, когда ЭМГ использовали одновременно с инкапсуляцией липосом в

оболочку из казеината натрия [16]. Следует отметить, что антиоксидантное действие этих веществ сохранялось и при высокой температуре окисления (60°C). Поэтому мы провели эксперименты по определению микровязкости в глубоко лежащих слоях липидного бислоя липосом как при развитии инициированного (ПОЛ) в липосомах из ФХ, так и в липосомах с добавками ЭМГ и Cas-Na.

На рис. 1 приведены кинетические кривые изменения времен вращательной корреляции τ_{c1} и τ_{c2} в процессе развития ПОЛ при температуре 37°C. Видно, что по мере развития ПОЛ микровязкость липидов в области локализации зонда S_{16} увеличивается (кривые 1), а растительный антиоксидант ЭМГ задерживает этот процесс (кривые 2). ЭМГ сразу после его введения в липосому уменьшает микровязкость липидов на 10–15%, что было показано нами ранее [21] и подтвердилось в этой работе («нулевая» точка кривых 2 на рис. 1). Далее, после инициации ПОЛ, микровязкость возрастает, но остается на более низком уровне по сравнению с контролем (кривые 1). Можно полагать, что ингибирование ПОЛ ЭМГ, которое было зарегистрировано нами в работе [16], осуществляется как за счет взаимодействия ЭМГ с перекисными радикалами, так и за счет снижения исходного уровня микровязкости липидов. Инкапсуляция липосом в белковую оболочку существенно увеличивает исходные значения τ_c , что было показано нами ранее [21], но потом они держатся приблизительно на том же уровне в течение всего времени окисления (кривые 3). Аналогичный эффект ЭМГ мы наблюдали и при повышении температуры окисления до

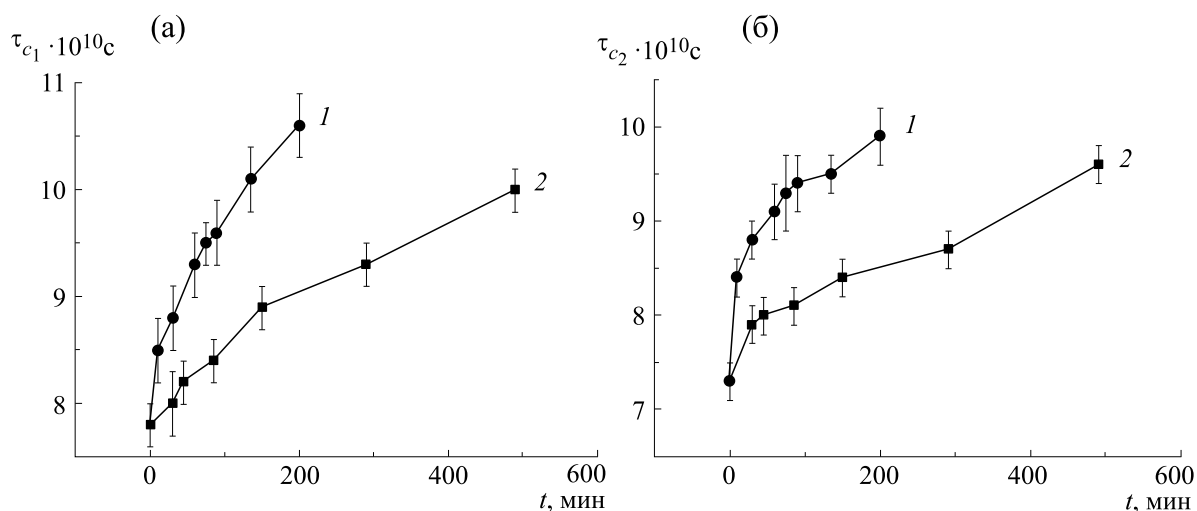


Рис. 2. Изменение времен вращательной корреляции парамагнитного зонда C_{16} τ_{c1} (а) и τ_{c2} (б) в липосомах из ФХ (кривые 1) и ФХ с ЭМГ (кривые 2) в процессе инициированного ПОЛ при 60°C.

60°C и по критерию изменения τ_{c1} , и по критерию τ_{c2} (рис. 2).

Так как данные об изменении содержания продуктов ПОЛ в липосомах из ФХ, ФХ с ЭМГ и ФХ с Cas-Na подробно приведены и проанализированы нами с кинетической точки зрения в работе [16], а условия проведения экспериментов были абсолютно идентичными, мы сравним результаты, полученные в работе [16] и в данном исследовании. Сопоставив кривые накопления продуктов ПОЛ, полученные в работе [16], и кривые увеличения микровязкости липидов (рис. 1 и 2) в зависимости от времени окисления, можно отметить их аналогию: обе величины растут по

мере развития ПОЛ, как в контрольных липосомах из ФХ, так и при использовании липосом с ЭМГ. Существует ли взаимосвязь между содержанием продуктов ПОЛ и микровязкостью липосом? Для выяснения этого вопроса мы проводили инициированное окисление липосом, отбирали параллельные пробы, в одной из которых фиксировали уровень продуктов ПОЛ, в другой — измеряли микровязкость на приборе ЭПР. Далее мы построили зависимость параметра τ_{c1} от оптической плотности растворов липосом при $\lambda = 233$ нм, которая пропорциональна содержанию диеновых конъюгатов, первичных продуктов окисления липидов. Эти результаты приведены на рис. 3.

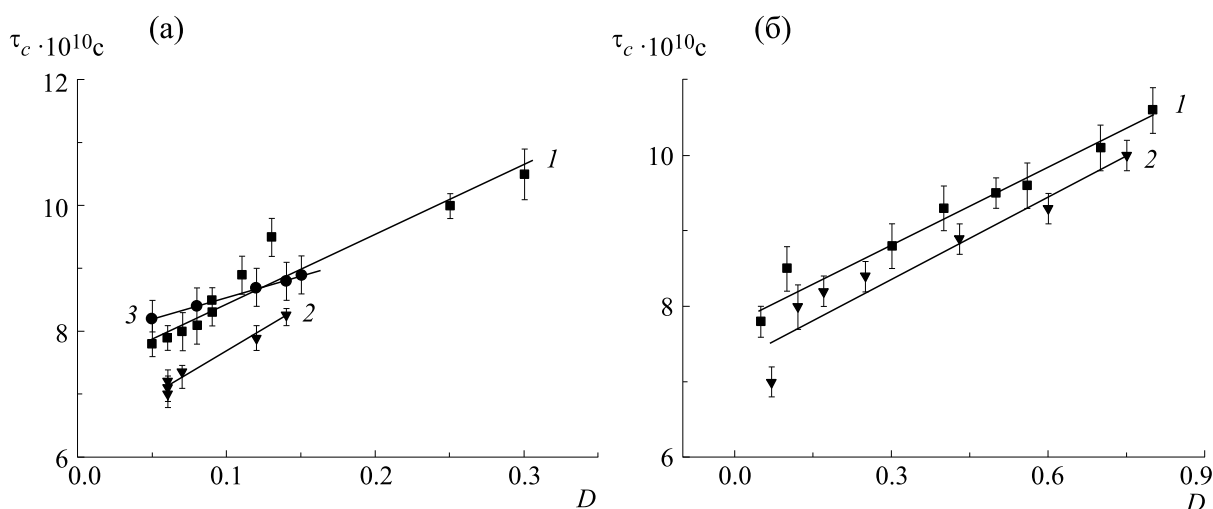


Рис. 3. Зависимости от степени развития ПОЛ времени вращательной корреляции зонда C_{16} τ_{c1} в липосомах из ФХ (кривые 1), ФХ и ЭМГ (кривые 2); ФХ и казеината натрия (кривая 3) при инициированном окислении при 37°C (а) и при 60°C (б).

Таблица 1. Данные статистической обработки показателей для прямолинейных зависимостей τ_{c1} от D

	a	$+\backslash-$	b	$+\backslash-$	R^2	P
ФХ 37°C	7.34	0.12	11.1	1.01	0.9306	0.001
ФХ + ЭМГ 37°C	6.29	0.10	14.0	1.11	0.9691	0.001
ФХ + казеинат 37°C	7.85	0.02	6.92	0.02	0.9974	0.001
ФХ 60°C	7.80	0.10	3.43	0.2	0.9660	0.001
ФХ + ЭМГ 60°C	7.30	0.20	3.65	0.5	0.985	0.001

Из рис. 3 следует, что как для контрольных липосом из ФХ, так и для липосом с добавками ЭМГ и Cas-Na наблюдается линейная зависимость между концентрацией первичных продуктов ПОЛ и микровязкостью липидов. Зависимости для параметра τ_{c2} были абсолютно аналогичны, поэтому в работе не приводятся.

В табл. 1 представлены результаты статистической обработки полученных данных. Видно, что для всех экспериментов между τ_{c1} и оптической плотностью D существует статистически достоверная (R близко к 1; $p < 0,01$) линейная зависимость, подчиняющаяся уравнению $y = a + bx$, где a – отрезок, отсекаемый на оси ординат, а b – угол наклона прямой. Из рис. 3 и табл. 1 следует, что прямые для липосом из ФХ и (ФХ+ЭМГ) практически параллельны и различаются только величинами a , в то время как инкапсуляция липосомы в Cas-Na, напротив, почти не изменяет a , но в 1,6 раза уменьшает угол наклона соответствующей прямой (кривая 3 на рис. 3а). При повышении температуры окисления до 60°C мы наблюдаем параллельные изменения τ_{c1} в липосомах из ФХ и липосомах из ФХ с добавлением ЭМГ (рис. 3б).

Таким образом, мы ответили на основной вопрос, стоявший перед нами в начале нашего исследования: микровязкость липидов увеличивается в процессе ПОЛ, причем это изменение прямо пропорционально образованию продуктов ПОЛ. Что же является причиной данных изменений? Можно высказать следующие предположения: изменение микровязкости липидов вызвано либо накоплением продуктов ПОЛ в липосомах, либо изменениями в жирнокислотном составе липосом. Следует отметить, что в литературе очень подробно и обстоятельно был изучен вопрос о том, как могут влиять различные окисленные продукты липидов на структуру мембраны липосом [7–13]. Наиболее планомерно эти исследования велись группой итальянских исследова-

телей [7,8,12], которые использовали различные спиновые зонды для картирования мембраны липосом из ФХ с жирными кислотами различной степени ненасыщенности после введения в их структуру нескольких продуктов окисления лецитина, выделенных и очищенных хроматографическим методом. Им удалось установить, что окисленные липиды в большей степени влияют на поверхностные слои липидов (области локализации зондов 5-доксилстеарата и 3-доксилхолестана), уменьшая степень упорядоченности липидов в этой области и снижая температуру фазовых переходов, ликвидируя анизотропию в поведении указанных зондов. В то же время окисленные липиды практически не влияли на микровязкость глубоко лежащих слоев липидов (область локализации зонда 16-доксилстеарата). Полный анализ действия еще более широкого круга окисленных липидов на биофизические свойства мембран проведен в обзоре [13], где обобщены результаты об эффекте нескольких классов окисленных липидов на структуру и проницаемость мембран. Помимо влияния окисленных липидов на указанные выше физико-химические характеристики липидов, авторы отмечают такие изменения в мембранах, как утоньшение липидного бислоя, изменение профиля гидратации, увеличение латеральной подвижности липидов и облегчение флип-флопа, создание дефектов в мембране и дезинтеграцию липидного бислоя [13]. Необходимо подчеркнуть, что все эти изменения относятся исключительно к поверхностным слоям липидов, в более глубоко лежащих липидах (область локализации зонда 16-доксилстеарата) незначительные изменения микровязкости (увеличение) было отмечено только в том случае, когда использовались липосомы из дипальмитоилфосфатидилхлина, а на липосомы из линолеил–пальмитоил–фосфатидилхолина окисленные продукты эффекта не оказывали вообще [12]. К аналогичным заключениям о преимущественной регидратации поверхностных об-

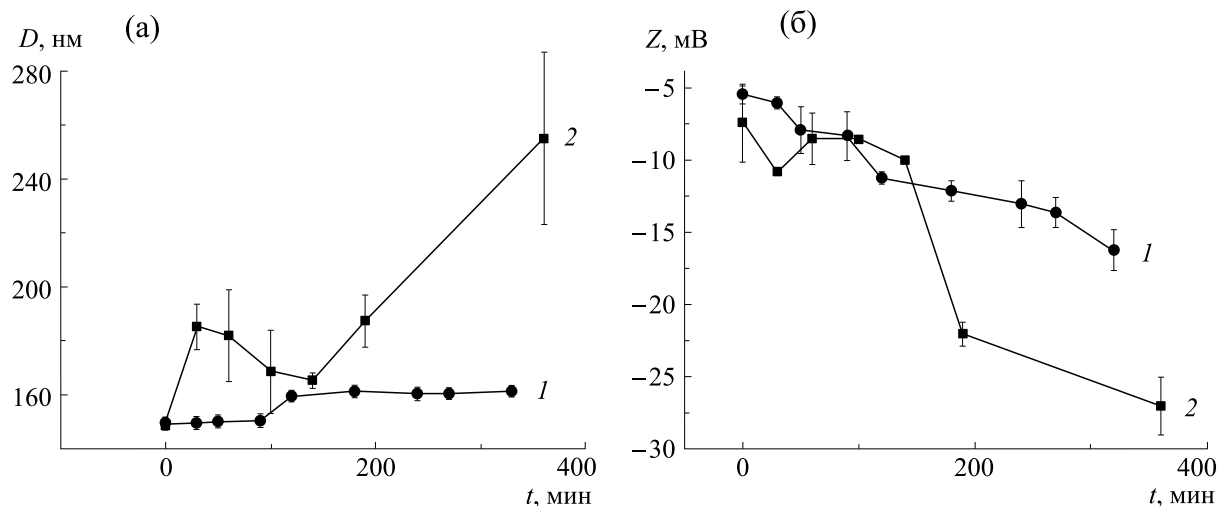


Рис. 4. Изменение среднего диаметра (а) и дзета-потенциала (б) липосом из ФХ в процессе их инициированного окисления при температуре 37°C (кривые 1) и 60°C (кривые 2).

ластей мембраны пришла и группа авторов, изучавшая ПОЛ в липосомах методом флуоресцентных зондов [22].

Совсем недавно появилась интересная работа бразильских исследователей [23], в которой, исследуя поведение гигантских однослойных везикул под действием гидроперекисного ФХ и окисленного ФХ с укороченной цепью, авторы делают вывод о том, что гидроперекисный липид образует цилиндрическую молекулярную форму и способствует созданию мембранных микродоменов, увеличивающих микровязкость бислоя. ФХ с укороченной цепью имеет коническую форму, не вызывает фазовой сегрегации, не влияет на структуру мембраны. Таким образом, эти данные говорят о том, что однозначное отрицание влияния продуктов окисления на микровязкость липидов, частично подтвержденное в работах [7,8,12], не является исчерпывающим. Однако остается вопрос о том, какой процесс является ведущим в увеличении данного параметра по мере окисления липосом.

Учитывая данные о том, что при развитии ПОЛ в первую очередь расходуются полиненасыщенные жирные кислоты [13], вполне естественно предположить, что по мере их расходования происходит относительное обогащение липосом НЖК и соответственно увеличивается вязкость глубоко лежащих слоев липидов.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что увеличение микровязкости глубоко лежащих слоев липидов обусловлено, главным образом, их относительным обогащением насыщенными жирными кислотами, хотя некоторый вклад в это явление вносят и продукты ПОЛ, которые, как установлено в работах [8,9,13], преимущественно действуют именно на насыщен-

ные липиды, несколько увеличивая их микровязкость.

Изменение размеров и заряда липосом различного состава в процессе инициированного ПОЛ. В обзоре [1] на основании анализа большого литературного материала авторы приходят к заключению, что в процессе ПОЛ в липосомах из яичного ФХ преимущественно образуются *транс-транс*-, а не *цис-транс*-гидроперекиси. Также ими было высказано предположение, что именно эти перестройки в конфигурации ацильных цепей фосфолипидов приводят к важным изменениям в структуре липосомальной мембраны, и, как следствие, в размерах и дзета-потенциале липосом [1,6]. Увеличение микровязкости глубоко лежащих слоев липидов было убедительно продемонстрировано нами в предыдущем разделе. Теперь мы поставили своей задачей изучить размеры среднего диаметра липосом из ФХ с различными добавками и их дзета-потенциала в процессе ПОЛ методом динамического светорассеяния.

На рис. 4 представлены изменения среднего диаметра липосом из ФХ и их дзета-потенциала в процессе ПОЛ при 37°C (кривые 1) и при 60°C (кривые 2). Видно, что ПОЛ сопровождается увеличением диаметра липосом и возрастанием абсолютной величины их отрицательного дзета-потенциала, причем при более высокой температуре эти отличия более выражены. Эти результаты не являются неожиданными, так как они совпадают с наблюдениями авторов работы [6]. При больших глубинах окисления при 60°C наблюдалось уширение пиков светорассеяния и увеличение ошибки среднего для диаметра липосом (рис. 4а, кривая 2). В работе [24] было установлено, что окисленные липиды занимают большее молеку-

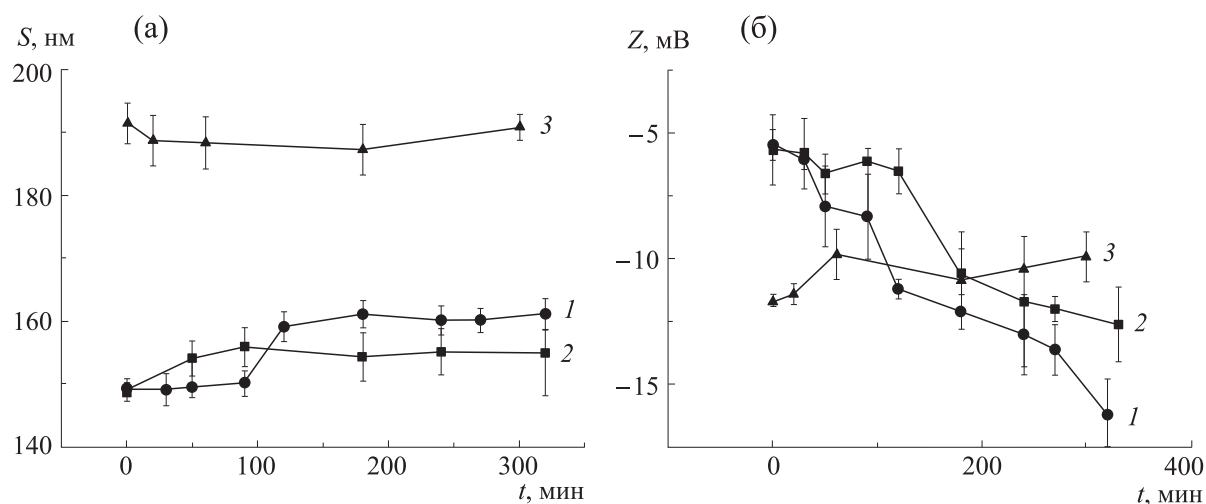


Рис. 5. Изменение среднего диаметра (а) и дзета-потенциала (б) липосом из ФХ (кривые 1), ФХ и ЭМГ (кривые 2), ФХ и казеината натрия (кривые 3) в процессе ПОЛ при 37°C.

лярное пространство, чем неокисленные, а сформированные из них мембраны — на 20% тоньше.

Далее мы провели эксперименты по определению влияния на изменения диаметра и дзета-потенциала липосом растительного антиоксиданта (ЭМГ) и белка (казеината натрия), которые, как было установлено нами ранее, при встраивании в липосомы существенно тормозят ПОЛ. Результаты этих экспериментов представлены на рис 5.

Из рис 5а следует, что введение в липосомы ЭМГ несколько снижает величины среднего диаметра липосом в процессе ПОЛ (до 100 мин окисления, затем увеличивает его по сравнению с контролем). Инкапсуляция липосом из ФХ в белковую оболочку сразу значительно (в 1,3 раза) увеличивает диаметр наночастицы, но затем он не изменяется в процессе развития ПОЛ. Из рис. 5б видно, что абсолютная величина отрица-

тельного дзета-потенциала в липосомах с ЭМГ возрастает медленнее, чем в контрольных липосомах из ФХ, а казеинат натрия увеличивает абсолютную величину отрицательного дзета-потенциала в нулевой точке и затем держит ее на постоянном уровне в течение всего времени окисления.

Таким образом, нами установлено, что растительный антиоксидант и белок предохраняют структуру липосомы от физико-химических изменений, вызываемых ПОЛ.

Изменения формы и объема липосом в процессе инициированного ПОЛ, фиксируемые методом АСМ. В качестве дополнительного метода исследования размеров и формы липосом в процессе ПОЛ мы использовали метод атомно-силовой микроскопии. Хотя известно, что метод динамического светорассеяния дает более надежные ко-

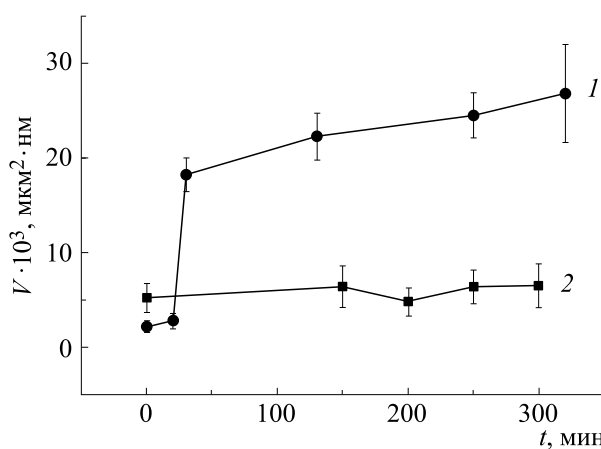
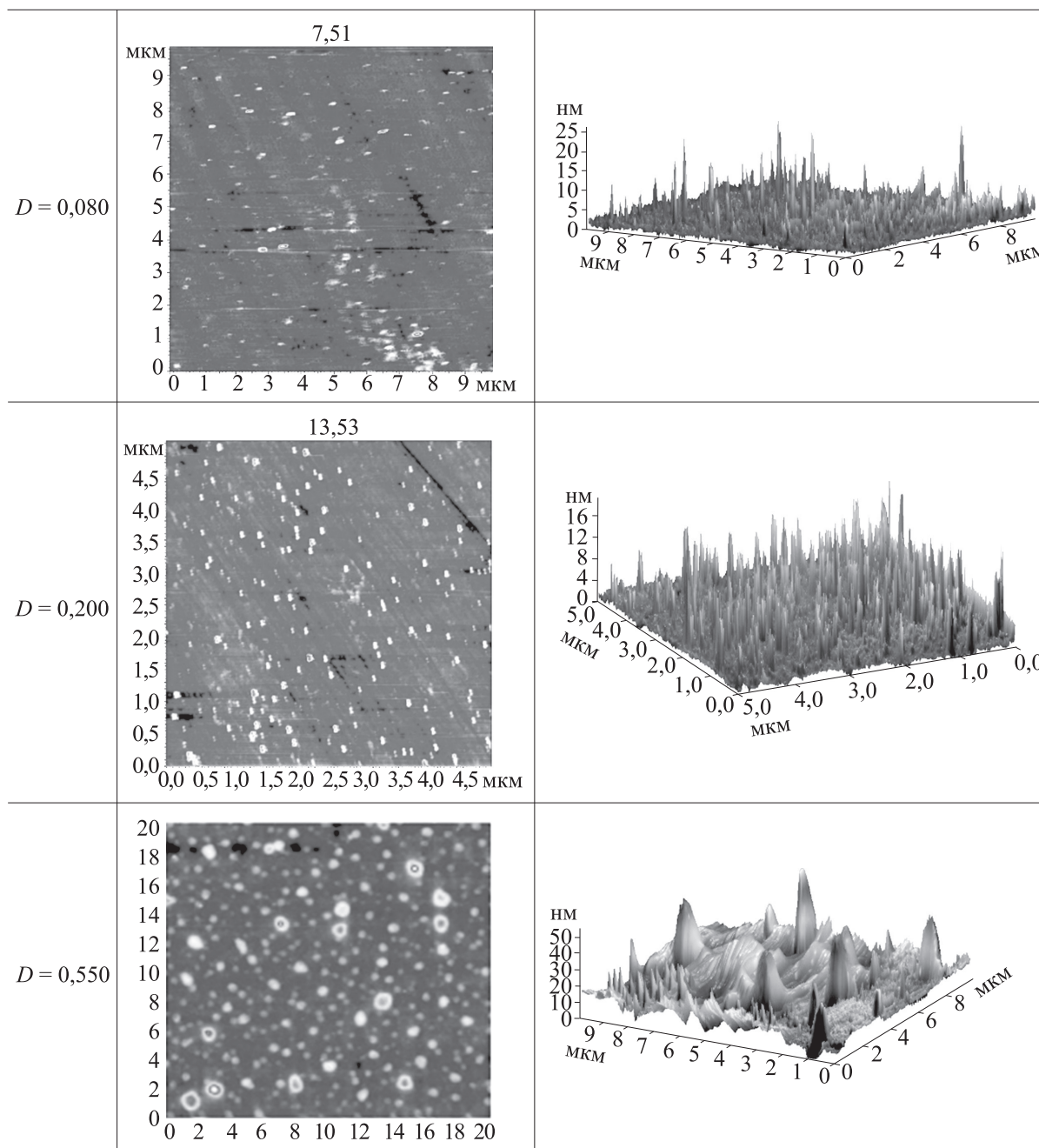


Рис. 6. Изменение среднего объема липосом из ФХ (кривая 1), ФХ и ЭМГ (кривая 2) в процессе ПОЛ при 37°C.

Таблица 2. Двухмерные и трехмерные имиджи липосом из фосфатидилхолина в зависимости от степени их окисленности (уровня диеновых конъюгатов, первичных продуктов ПОЛ)



личественные результаты размеров липосом, метод АСМ позволяет получить более наглядные качественные изображения. Поэтому, на наш взгляд, при разумном сочетании этих методов исследования можно составить более всестороннюю картину изменений, происходящих в форме липосом при различных воздействиях. Программа NT- Image Analysis V. 2.2.0 позволяет в автоматическом режиме определить диаметр, высоту и объем каждой липосомы и провести статистическую обработку полученных данных. Наиболее достоверными являются результаты об объеме частиц. На рис. 6 представлены изменения среднего объема липосом из ФХ (кривая 1) и ФХ с ЭМГ (кривая 2) в процессе их инициированного окисления при 37°C. Видно, что ПОЛ в контрольных

ческом режиме определить диаметр, высоту и объем каждой липосомы и провести статистическую обработку полученных данных. Наиболее достоверными являются результаты об объеме частиц. На рис. 6 представлены изменения среднего объема липосом из ФХ (кривая 1) и ФХ с ЭМГ (кривая 2) в процессе их инициированного окисления при 37°C. Видно, что ПОЛ в контрольных

липосомах из ФХ приводит к значительному увеличению их объема, в то время как введение антиоксиданта несколько увеличивает объем до начала окисления, но потом держит его на постоянном уровне (кривая 2). Следовательно, мы получили принципиально те же закономерности, что и при использовании метода динамического светорассеяния. Качественную картину изменений в липосомах из ФХ при разных глубинах окисления можно видеть в табл. 2, где представлены двумерные и трехмерные имиджи липосом из ФХ. Увеличение глубины окисления от 0,08 до 0,550 сопровождается увеличением объема и изменением формы липосом. Введение ЭМГ практически не влияло на эти параметры; инкапсуляция липосом в казеинат натрия увеличивала исходные размеры липосом, которые не изменялись в процессе ПОЛ, поэтому эти данные не приводятся из-за ограниченности объема статьи.

Таким образом, результаты, полученные методом АСМ, подтверждают выводы, сделанные на основании метода динамического светорассеяния, а также соответствуют результатам, полученным в работах [23,24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что взаимосвязь ПОЛ в липосомах и биологических мембранах и структуры их липидного бислоя уже долгие годы находится в центре внимания мембранологов, до настоящего времени существует ряд невыясненных вопросов. В частности, имеются определенные противоречия в оценке состояния микровязкости глубоко лежащих слоев липидов при различных глубинах ПОЛ [7–13]. В данной работе нами были проведены целенаправленные исследования методом ЭПР изменения этого параметра в процессе инициированного ПОЛ в липосомах из ФХ и ФХ с добавкой растительного антиоксиданта и белка при двух температурах – физиологической (37°C) и повышенной (60°C). Было установлено, что развитие ПОЛ во всех экспериментах сопровождается увеличением микровязкости глубоко лежащих слоев липидов, которое прямо пропорционально степени развития ПОЛ. Этот эффект обусловлен главным образом увеличением относительного содержания насыщенных жирных кислот в липидах липосом, хотя некоторый вклад в него могут вносить и новые структурные формы окисленных липидов, о которых указывается в работе [23].

ПОЛ вызывает увеличение среднего диаметра индивидуальных липосом, возрастание абсолютной величины их дзета-потенциала. Растительный антиоксидант и белок тормозят этот процесс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Schnitzer, I. Pinchuk, and D. Lichtenberg, *Eur. Biophys. J.* **36**, 499 (2007).
2. A. Catala, *Chem. Phys. Lipids* **157**, 1 (2009).
3. D. J. McClements, *Nanoparticle- and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds* (CRC Press Taylor and Francis Group, New York, 2014).
4. M. G. Semenova and E. Dickinson, *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions* (Brill, Leiden, 2010).
5. B. Bose and S. N. Chatterjee, *J. Photochem. Photobiol.* **28**, 149 (1995).
6. M. Mosca, A. Ceglie, and L. Ambrosone, *Chem. Phys. Lipids* **164**, 158 (2011).
7. F. M. Megli and K. Sabatini, *Chem. Phys. Lipids* **125**, 161 (2003).
8. F. M. Megli, E. Conte, and L. Russo, *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 1886 (2010).
9. M. L. Wratten, G. Vangincel, A. A. Vantveld, et al., *Biochemistry* **31**, 10901 (1992).
10. M. Duda, K. Kawula, A. Pawlak, et al., *Cell. Biochem. Biophys.* **75**, 433 (2017).
11. W.-Yu Tai, Yi-C. Yang, H.-J. Lin, et al., *J. Phys. Chem.* **114**, 15642 (2010).
12. F. M. Megli, L. Russo, and K. Sabatini, *FEBS Lett.* **579**, 4577 (2005).
13. P. Jurkeviwicz, A. Olzynska, L. Cwiklik, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 2388 (2012).
14. M. G. Semenova, D. V. Zelikina, A. S. Antipova, et al., *Food Hydrocoll.* **52**, 144 (2016).
15. M. G. Semenova, A. S. Antipova, T. A. Misharina, et al., in *Gums and Stabilisers for the Food Industry* (Royal Soc. of Chem., Cambridge, 2016), V. 18, pp. 182–189.
16. Н. Н. Сажина, А. С. Антипова, М. Г. Семенова и Н. П. Пальмина, *Биоорган. химия* **45**, 193 (2019).
17. А. Н. Кузнецов, *Метод спинового зонда* (Наука, М., 1976).
18. В. И. Бинюков, О. М. Алексеева, Е. М. Миль и др., *Докл. РАН* **441**, 114 (2011).
19. R. Pecora, *J. Nanopart. Res.* **2**, 123 (2000).
20. Н. Бейли, *Математика в биологии и медицине* (Наука, М., 1970).
21. Н. П. Пальмина, Е. Л. Мальцева, В. И. Бинюков и др., *Биофизика* **63**, 78 (2018).
22. M. A. Soto-Arriaza, C. P. Sotomayor, and E. A. Lissi, *J. Coll. Interface Sci.* **323**, 70 (2008).
23. T. M. Tsubone, H. C. Junqueira, M. S. Baptista, and R. Itri, *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 660 (2019).
24. R. De Rosa, F. Spinozzi, and R. Itri, *Biochim. Biophys. Acta* **1860**, 2299 (2018).

The Relationship Between Lipid Peroxide Oxidation and Microviscosity in Liposomes from Phosphatidylcholine. Effects of Plant Antioxidant and Protein

N.P. Palma, N.G. Bogdanova, N.N. Sazhina, V.V. Kasparov, V.I. Binyukov, I.G. Plashchina, A.S. Antipova, and M.G. Semenova

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

The effect of lipid peroxidation on the structure of biological membranes and liposomes has been studied for a long time, but there are still a number of unexplained issues that require additional study. In particular, there are inconsistencies in the assessment of the state of the structure of deep-lying membrane lipids during the development of lipid peroxidation. In this work we have studied the change in the microviscosity of the lipid component by the electron spin resonance method using a spin probe (16-doxy-stearic acid) in the process of lipid peroxidation initiated by the water-soluble azo-initiator AAPH. The liposomes from phosphatidylcholine and phosphatidylcholine with the addition of a plant antioxidant and liposomes incorporated in protein were used; lipid peroxidation was carried out at two temperatures: normal body (37°C) and increasing (60°C) temperatures. It was found that the development of lipid peroxidation in all experiments is accompanied by an increase in microviscosity of deep-lying layers of lipids, which is directly proportional to the lipid peroxidation level. This effect is mainly due to an increase in the relative content of saturated fatty acids in lipids of liposomes, although new structural forms of oxidized lipids also may play a role in the development of this effect. Using dynamic light scattering and atomic force microscopy, it has been shown that lipid peroxidation induces an increase in the average diameter of individual liposomes, a change in the absolute ζ -potential value from negative to positive value. The plant antioxidant and protein inhibit this process.

Keywords: liposomes, lipid peroxidation, lipid microviscosity, diameter and volume of liposomes, ζ -potential