

## ... КРІОБІОЛОГІЯ ... CRYOBIOLOGY ...

УДК: 612.11:577.352.57.086.13

### **Локализация проникающего криопротектора диметилсульфоксида в мембране эритроцитов: исследование методом флуоресцентных зондов** **Е.М.Корниенко, Е.А.Посохов**

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*  
*geniakor@rambler.ru*

С помощью набора флуоресцентных зондов (орто-гидроксипроизводных оксазола и оксадиазола) исследована локализация проникающего криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) в мембране эритроцитов. Показано, что ДМСО локализуется в мембранах эритроцитов в области глицериновых остатков фосфолипидов, в области карбонильных групп фосфолипидов и в области метиленовых групп фосфолипидов (метиленовых групп, прилегающих к области карбонильных групп). Установлено, что увеличение концентрации ДМСО приводит к нарушению упаковки фосфолипидов и, следовательно, приводит к увеличению гидратации мембран.

**Ключевые слова:** эритроциты, биомембрана, криопротектор, ДМСО, флуоресцентные зонды.

### **Локалізація проникаючого кріопротектора диметилсульфоксиду у мембрані еритроцитів: дослідження методом флуоресцентних зондів** **Є.М.Корнієнко, Є.А.Посохов**

З допомогою набору флуоресцентних зондів (орто-гідроксипохідних оксазолу і оксадіазолу) досліджено локалізацію проникаючого кріопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) в мембранах еритроцитів. Показано, що ДМСО локалізується в мембранах еритроцитів в області глицеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових груп фосфоліпідів (метиленових груп, прилеглих до області карбонільних груп). Встановлено, що збільшення концентрації ДМСО призводить до порушення упаковки фосфоліпідів і, таким чином, призводить до збільшення гідратації мембран.

**Ключові слова:** еритроцити, біомембрана, кріопротектор, ДМСО, флуоресцентні зонди.

### **Localization of penetrating cryoprotectant dimethylsulfoxide in red cell membranes: a study by fluorescent probes** **Ye.M.Korniyenko, Ye.O.Posokhov**

Using a set of fluorescent probes (ortho-hydroxy derivatives of oxazole and oxadiazole), location of penetrating cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO) in membrane of red blood cells has been investigated. It has been shown that DMSO in erythrocyte membranes locates in the area of glycerol residues of phospholipids, in the area of the carbonyl groups of phospholipids and in the area of methylene groups of phospholipides (i.e. the methylene groups in the vicinity of the carbonyl groups). It has been found that increase in DMSO concentration increases perturbation of phospholipids packing and thus leads to an increase in hydration of the membranes.

**Key words:** erythrocytes, biomembrane, cryoprotectant, DMSO, fluorescent probes.

#### **Введение**

Диметилсульфоксид (ДМСО) относится к проникающим криопротекторам и за последние 50 лет получил широкое распространение при криоконсервировании биологических объектов разного уровня организации (Коваленко и др., 2009).

Для криоконсервации эритроцитов разработаны различные методы, основанные на использовании ДМСО, однако все они имеют определенные недостатки. Основной причиной этого является цитотоксичность ДМСО. Криопротекторы способны модифицировать липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, изменять поверхностный потенциал (Линник и др., 2010).

Несмотря на значительное количество публикаций о воздействии ДМСО на липидные мембраны (Коваленко и др., 2009; Линник и др., 2010; Dyubko et al., 2006), сведения о локализации

встраивания ДМСО в мембраны эритроцита в литературе отсутствуют. Это и обусловило проведение настоящего исследования локализации встраивания ДМСО в мембраны эритроцита.

Одним из подходов, позволяющих производить оценку степени влияния ДМСО на состояние липидного бислоя и определять топологию распределения в нем ДМСО, является использование флуоресцентных зондов, молекулы которых нековалентно связываются с мембранами и достаточно быстро реагируют на микроокружение (Линник и др., 2010; Dyubko et al., 2006).

Целью исследования явилось изучение локализации ДМСО в липидном бислое мембраны эритроцита и выяснение возможных структурных изменений в мембранах эритроцитов при воздействии ДМСО методом флуоресцентных зондов. В качестве флуоресцентных зондов использовались орто-гидроксипроизводные оксазола и оксадиазола.

### Материалы и методы

Эритроциты мужчин II группы Rh (+), получаемые из эритроцитарной массы, приготовленной Харьковской областной станцией переливания крови, непосредственно перед экспериментом четырёхкратно центрифугировали 3 мин при 3000 об/мин (тип центрифуги ОПн – ЗУХЛ4.2) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl) при комнатной температуре 20–22°C. Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли методом аспирации. Модификацию клеток осуществляли 40-минутной экспозицией эритроцитов с ДМСО (0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 15%) путем смешивания с соответствующей криоконсервирующей средой 1:1 (гематокрит 40–45 %). Контрольным образцом были клетки, не подвергавшиеся воздействию ДМСО.

Непосредственно для флуориметрических измерений суспензию модифицированных эритроцитов 0,001 мл переносили в 2 мл соответствующей концентрации криопротектора, при этом средняя концентрация эритроцитов составляла  $1 \cdot 10^6$  кл/мл. Концентрация клеток определялась при помощи световой микроскопии в камере Горяева. Светорассеяние суспензии клеток, качественно оцениваемое по поглощению на длине волны 545 нм ( $D_{545}$ ), находилось в пределах 0,02.

Для настоящего исследования были отобраны соединения, различающиеся своей липофильностью (Посохов и др., 1999, 2001). Области локализации отобранных зондов в мембране различны и соответствуют липофильности зондов (Посохов и др., 1999, 2001; Добрецов, 1989). Нами использовались флуоресцентные зонды D7, D1, O10, O60, PH7. Выбор набора флуоресцентных зондов орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола для исследования влияния ДМСО на физико-химические свойства биомембран эритроцитов обусловлен тем фактом, что флуоресцентные характеристики этих зондов зависят от физико-химических свойств их микроокружения: от протонноакцепторной способности, полярности и вязкости микроокружения (Посохов и др., 2001; Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002). В мембранах орто-гидроксипроизводные 2,5-диарил-1,3,4-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксазола локализуются соответственно липофильности зондов (Добрецов, 1989): 2-(2'-ОН-фенил)-5-(4'-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-фенил)-1,3,4-оксадиазол – зонд D7 – в области полярных головок фосфолипидов и в области глицериновых остатков фосфолипидов; 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазол – зонд D1 – в области глицериновых остатков фосфолипидов; 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол – зонд O10 – в области глицериновых остатков фосфолипидов (ближе к центру бислоя), в области карбонильных групп фосфолипидов и в области метиленовых цепочек фосфолипидов (прилегающих к области карбонильных групп фосфолипидов); 2-(2'-ОН-фенил)-5-(4'-фенил-фенил)-1,3-оксазол – зонд O60 – в области карбонильных групп фосфолипидов и в области метиленовых цепочек фосфолипидов; 2-(2'-ОН-фенил)-фенантр-1,3-оксазол – зонд PH7 – в области метиленовых цепочек возле центра бислоя фосфолипидов и в центре бислоя.

В возбужденном состоянии для орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола характерно протекание реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП): гидроксильная группа в орто-положении бокового бензольного кольца является протонодонором, а атом азота оксазольного (оксадиазольного) цикла – протонноакцептором (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002). Результатом реакции ВМФПП является образование фототаутомерной формы ( $I_{T^+}$ ), флуоресцирующей в существенно более длинноволновой области по сравнению с исходной формой ( $I_{N^+}$ ) (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002).

Наличие двухполосной флуоресценции позволяет проводить ратиометрические измерения, т.е. использовать отношение интенсивностей флуоресценции фототаутомерной формы ( $I_{T^+}$ ) и исходной формы ( $I_{N^+}$ ) в качестве параметра для оценки физико-химических свойств среды. Использование ратиометрических флуоресцентных проб позволяет исключить как погрешности

измерений, связанные с девиацией концентрации флуоресцентной пробы, так и погрешности измерений, связанные с девиацией настроек флуоресцентной техники (Shapiro, 1995).

Флуоресцентные зонды растворяли в ацетонитриле до начальной концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  М. 10 мкл ацетонитрильного раствора зонда добавляли к 2 мл суспензии эритроцитов до конечной концентрации каждого из зондов в суспензии исследуемых мембран –  $1 \cdot 10^{-6}$  М. Таким образом, молярное отношение липид/зонд составляло 1000:1. Измерение спектров флуоресценции производилось на спектрофлуориметре «Hitachi 850» через 1 час после прибавления зондов к суспензии клеток. Спектры флуоресценции зондов измеряли в области 340–600 нм при ширине щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции 5 и 5 нм соответственно и длине волны возбуждения 330 нм.

Для выяснения влияния ацетонитрила на мембрану эритроцита мы измеряли процент гемолиза эритроцитов, обработанных ДМСО, в сравнении с контрольными эритроцитами. Также был оценен процент гемолиза нативных эритроцитов, обработанных ацетонитрилом в конечной концентрации 0,5% v, 1% v, 1,5% v. Согласно экспериментальным данным, применение ацетонитрила не оказывало заметного влияния (% гемолиза соответствовал 0% во всем концентрационном диапазоне ДМСО и ацетонитриле; данные не показаны).

### Результаты исследований

Было установлено, что в случае зондов D1 и D7 в суспензии эритроцитов не происходит возрастания флуоресценции этих зондов за 1 час инкубации (не показано). Принимая во внимание, что флуоресцентные зонды D1 и D7 практически не флуоресцируют в водной среде, однако имеют заметную флуоресценцию при их встраивании в мембраны (интенсивность флуоресценции зондов D1 и D7 возрастает в сотни раз при попадании зондов в гидрофобную среду (Дорошенко и др., 1997)), можно предположить, что зонды D1 и D7 либо не встраиваются в мембраны эритроцитов за 1 час инкубации (т.е. остаются в буфере), либо встраиваются в мембраны эритроцитов, но, вследствие значительной гидратации мембран эритроцитов в области локализации зондов D1 и D7 (полярная область мембраны) возрастания их флуоресценции не происходит.

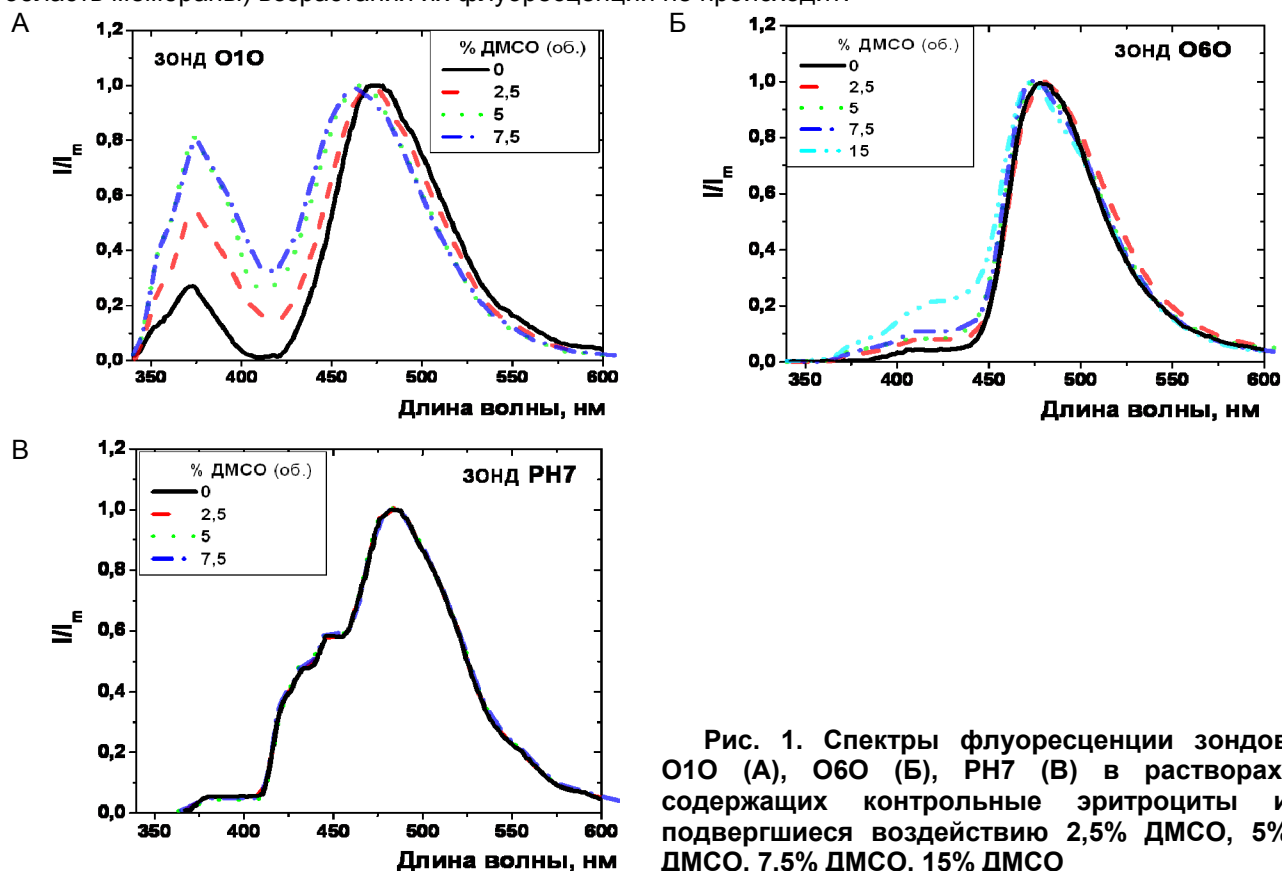
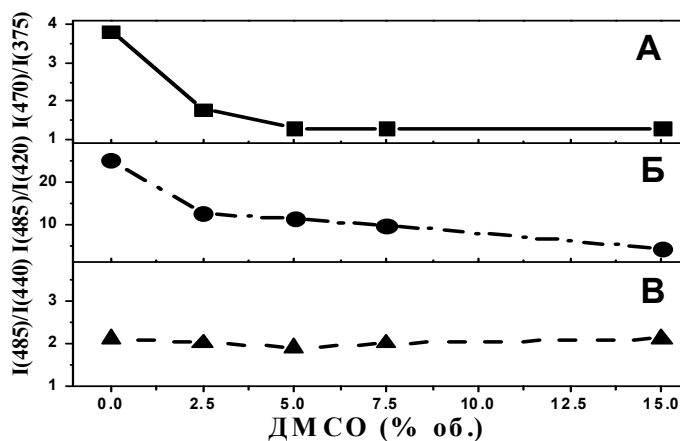


Рис. 1. Спектры флуоресценции зондов O10 (А), O6O (Б), RH7 (В) в растворах, содержащих контрольные эритроциты и подвергшиеся воздействию 2,5% ДМСО, 5% ДМСО, 7,5% ДМСО, 15% ДМСО

Таким образом, зонды D1 и D7 не позволяют производить мониторинг изменений в мембранах эритроцитов под действием ДМСО и, следовательно, исследование локализации ДМСО проводилось при помощи остальных зондов набора (O10, O60, RH7) рис.1А, 1Б, 1В.

На рис. 1А, 1Б наблюдается заметное увеличение интенсивности коротковолновой полосы флуоресценции нормальной формы ( $I_{N^*}$ ) и гипсохромный сдвиг полосы флуоресценции фототаутомера ( $T^*$ ) для зондов O10, O60 с увеличением концентрации ДМСО. В то же время, в случае зонда RH7 (рис.1В) не наблюдалось заметных изменений его спектра флуоресценции при воздействии ДМСО на эритроциты. Увеличение интенсивности коротковолновой полосы флуоресценции нормальной формы ( $I_{N^*}$ ) и гипсохромный сдвиг полосы флуоресценции фототаутомера ( $T^*$ ) зондов O10, O60 свидетельствует об увеличении полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения этих зондов в мембранах эритроцитов, подвергнувшихся действию ДМСО. Обсуждаемое увеличение полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения зондов O10, O60 может быть вызвано как накоплением полярного растворителя ДМСО в области локализации этих зондов, так и увеличением гидратированности микроокружения зондов O10, O60 в результате нарушения упаковки мембран эритроцитов под действием ДМСО.



**Рис. 2. Влияние воздействия криопротектора ДМСО на соотношение интенсивностей таутомерной и исходной формы  $I_{T^*}/I_{N^*}$  для зондов O10 (А), O60 (Б), RH7 (В)**

На рис. 2 продемонстрировано влияние воздействия криопротектора ДМСО на соотношение интенсивностей таутомерной и исходной формы  $I_{T^*}/I_{N^*}$  для зондов O10 (А), O60 (Б), RH7 (В). Из соотношения интенсивностей таутомерной и исходной формы  $I_{T^*}/I_{N^*}$  для зондов O10, O60, RH7, в зависимости от концентрации ДМСО (рис. 2), видно, что наиболее значительное уменьшение соотношения  $I_{T^*}/I_{N^*}$  наблюдалось для зонда O10 в интервале концентрации ДМСО 0–5 %, (рис. 2А) и для O60 – в интервале концентрации ДМСО 0–2,5 % (рис. 2Б). Соотношение  $I_{T^*}/I_{N^*}$  для зонда RH7 не изменялось при воздействии ДМСО (рис. 2В).

Таким образом, при воздействии ДМСО изменения в мембранах эритроцитов происходят в областях локализации зондов O10 и O60, т.е. в области глицериновых остатков фосфолипидов, в области карбонильных групп фосфолипидов и в области метиленовых групп фосфолипидов (метиленовых групп, прилегающих к области карбонильных групп). В то же время, воздействие ДМСО не приводит к изменениям в области локализации зонда RH7 (т.е. в более гидрофобных областях мембран эритроцитов): в области метиленовых цепочек фосфолипидов вблизи центра и непосредственно в центре бислоя.

### Выводы

Установлено, что увеличение концентрации ДМСО приводит к нарушению упаковки фосфолипидов, и, следовательно, приводит к увеличению гидратации мембран. Показано, что ДМСО локализуется в мембранах эритроцитов в области глицериновых остатков фосфолипидов, в области

карбонильних груп фосфолипидів і в області метиленових груп фосфолипидів (метиленових груп, прилегаючих к області карбонильних груп).

#### Список литературы

- Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277с. /Dobretsov G.Ye. Fluorestsentnyye zondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteinov. – M.: Nauka, 1989. – 277s./
- Дорошенко А.О., Посохов Е.А. Реакция фотопереноса протона в ряду орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола в полистирольных пленках // Теоретическая и экспериментальная химия. – 1999. – Т.35, №6. – С. 357–361. /Doroshenko A.O., Posokhov Ye.A. Reaktsiya fotoperenosa protona v ryadu orto-gidroksiproizvodnykh 2,5-diaril-1,3-oksazola i 2,5-diaril-1,3,4-oksadiazola v polistirol'nykh plenkakh // Teoreticheskaya i eksperimental'naya khimiya. – 1999. – T.35, №6. – S. 357–361./
- Дорошенко А.О., Посохов Е.А., Шершуков В.М. и др. Реакция внутримолекулярного переноса протона в возбужденном состоянии в ряду орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-оксазола // Химия высоких энергий. – 1997. – Т.31, №6. – С. 395–402. /Doroshenko A.O., Posokhov Ye.A., Shershukov V.M. i dr. Reaktsiya vnutrimolekulyarnogo perenosa protona v vzbuzhdennom sostoyanii v ryadu orto-gidroksiproizvodnykh 2,5-diarilokksazola // Khimiya vysokikh energiy. – 1997. – T.31, №6. – S. 395–402./
- Коваленко Г.В., Коваленко И.Ф., Линник Т.П. Механизм транспорта ДМСО, глицерина и этиленгликоля через мембраны эритроцитов крысы и кролика // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Біологія. – 2009. – Вип.10, №878. – С. 109–116. /Kovalenko G.V., Kovalenko I.F., Linnik T.P. Mekhanizm transporta DMSO, glihtserina i etilenglikolya cherez membrany eritrotsitov krysy i krolika // Visnyk Kharkivskogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Biologiya. – 2009. – Vyp.10, №878. – S. 109–116./
- Линник Т.П., Дюбко Т.С., Мартынюк И.Н., Терещенко А.В. Взаимодействие криопротекторов с липосомами из суммарных липидов спермиев петуха // Пробл. криобиологии. – 2010. – Т.20, №1. – С. 34–46. /Linnik T.P., Dyubko T.S., Martynuk I.N., Tereshchenko A.V. Vzaimodeystviye krioprotektorov s liposomami iz summarnykh lipidov spermiyev petukha // Probl. kriobiologii. – 2010. – T.20, №1. – S. 34–46./
- Посохов Е.А., Абманова Н.А., Бойко Т.П., Дорошенко А.О. Орто-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для медико-биологических исследований // Вестник Харьковского университета. Химия. – 1999. – Вып.4 (27), №454. – С. 188–189. /Posokhov Ye.A., Abmanova N.A., Boyko T.P., Doroshenko A.O. Orto-gidroksiproizvodnyye 2,5-difenil-1,3-oksazola i 2,5-difenil-1,3,4-oksadiazola v kachestve fluorestsentnykh zondov dlya mediko-biologicheskikh issledovaniy // Vestnik Khar'kovskogo universiteta. Khimiya. – 1999. – Vyp.4 (27), №454. – S.188–189./
- Посохов Е.А., Бойко Т.П., Бевзюк Д.А. Орто-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований модельных биомембран // Вестник Харьковского университета. Химия. – 2001. – Вып.7 (30), №532. – С. 192–194. /Posokhov Ye.A., Boyko T.P., Bevzyuk D.A. Orto-gidroksiproizvodnyye 2,5-difenil-1,3-oksazola i 2,5-difenil-1,3,4-oksadiazola v kachestve fluorestsentnykh zondov dlya toksikologicheskikh issledovaniy model'nykh biomembran // Vestnik Khar'kovskogo universiteta. Khimiya. – 2001. – Vyp.7 (30), №532. – S. 192–194./
- Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A. et al. Radiationless deactivation of the excited phototautomer form and molecular structure of ESIPT-compounds // Photochemical and Photobiological Sciences. – 2002. – Vol.1. – P. 92–99.
- Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A., Ptyagina L.M. Excited state intramolecular proton transfer reaction and luminescent properties of the ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole // Journal of Physical Organic Chemistry. – 2000. – Vol.13. – P. 253–265.
- Dyubko T.S., Onishchenko E.V., Pivovarenko V.G. Influence of freezing and low molecular weight cryoprotectants on microsomal membrane structure: a study by multiparametric fluorescent probe // J. Fluoresc. – 2006. – Vol.16. – P. 817–823.
- Shapiro H.M. Flow cytometry. – NY: Science, 1995. – 542p.

Представлено: В.І.Жуков / Presented by: V.I.Zhukov

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 03.11.2011