



УДК 577.115.7

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ ФОСФАТИДИЛХОЛИН–ХОЛЕСТЕРИЛОВЫЙ ЭФИР

© 1999 г. Н. В. Медведева[#], А. Ф. Киселева, А. Ю. Мишарин

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А

Поступила в редакцию 15.04.98 г. Принята к печати 02.06.98 г.

Впрыскивание изопропанольного раствора смеси пальмитоиллеоилфосфатидилхолина и холестерилового эфира (холестериллеата, 3 β -(9,10-*цис*-октадеценилокси)холест-5-ена или 3 β -[9-(7-нитробенз-2-окса-1,3-дiazол-4-ил)аминоноилокси]холест-5-ена, при мольном соотношении 3 : 1) в 100-кратный избыток водного буфера приводит к дисперсиям, стабильным в водной среде (при концентрации холестерилового производного 10^{-4} М). Полученные дисперсии имеют высокую степень гомогенности, частицы со средним диаметром 100–140 нм обладают характерной регулярной структурой (данные электронной микроскопии и гранулометрии). Холестериллеат дисперсий эффективно интернализуется клетками гепатомы Нер G2. Дисперсии могут быть использованы в биохимических и микроскопических исследованиях внутриклеточного метаболизма и транспорта неполярных липидов в живых культивируемых клетках.

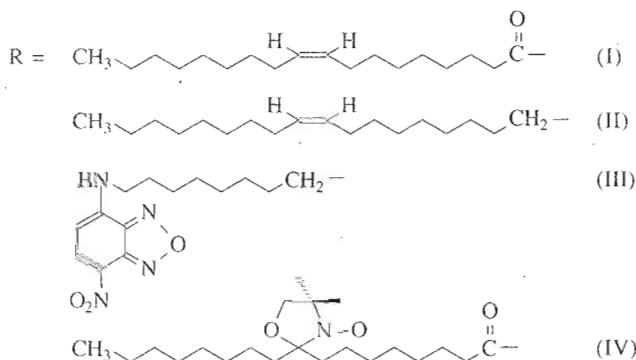
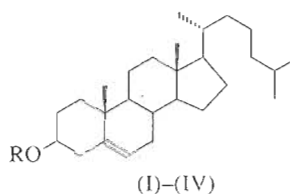
Ключевые слова: липидные дисперсии; холестерилевоы эфиры.

В организме млекопитающих холестерин транспортируется в основном в форме жирнокислотных эфиров в составе липопротеинов. Взаимодействию клеток в культуре с природными или модельными липопротеинами посвящено огромное число исследований. Одним из основных вопросов для изучения являются клеточные механизмы, ответственные за поступление, внутриклеточный транспорт и метаболизм холестерилевоы эфиров.

Исследования внутриклеточного метаболизма и транспорта неполярных липидов обычно проводят с использованием липопротеинов или искусственных липидных дисперсий, солюбилизованных в водной среде. Как правило, получение водных дисперсий, в состав которых входят холестерилевоы эфиры, включает ультразвуковую обработку, фракционирование и последующее изучение состава и стабильности относительно гетерогенных фракций [1–4].

В данной работе предложен простой способ получения стабильных водных дисперсий фосфатидилхолин–холестерилевоый эфир, обладающих относительно однородной структурой и пригодных для биохимических и морфологических исследований в живых культивируемых клетках.

Хорошо известно [5], что при инъекции спиртового раствора фосфатидилхолина в водный буфер образуются везикулярные структуры. Мы использовали тот же прием, впрыскивая в 100-кратный объем фосфатного буфера раствор смеси пальмитоиллеоилфосфатидилхолина (РОРС) и производных холестерина (I)–(III) в изопропанол (при разных мольных соотношениях РОРС и производного холестерина). После 48-часового диализа, проводимого для удаления следов изопропанола, полученные дисперсии, содержащие 10^{-4} М раствор производного холестерина, анализировали методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС).



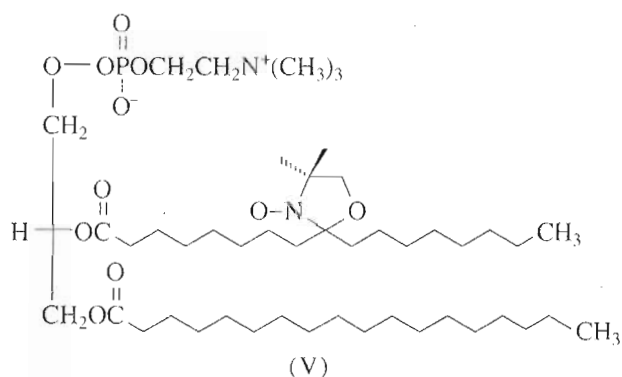
Сокращения: ЛПДС – липопротеиндефицитная сыворотка; ФКС – фотонная корреляционная спектроскопия (гранулометрия); РОРС – пальмитоиллеоилфосфатидилхолин; NBD – 7-нитробенз-2-окса-1,3-дiazол-4-ил; доксил – 4,4-диметил-3-оксазол-1-оксил; PBS – фосфатсодержащий физиологический раствор.

[#] Автор для переписки.

Размер (нм) частиц дисперсий по данным электронной микроскопии (А) и по данным ФКС (Б)*

Дисперсия	А	Б
РОРС-(I)	120 (±25)	110 (±10)
РОРС-(II)	120 (±35)	110 (±20)
РОРС-(III)	110 (±20)	130 (±10)

* Средний размер частиц, полученный из 200 измерений для каждой дисперсии; размер частиц, рассчитанный по методу ФКС [6] при 8, 22 и 37°C для каждой из дисперсий при концентрациях РОРС 10^{-5} и 10^{-6} М, не показывал достоверных различий.



Было обнаружено, что водные дисперсии соединений (I)–(III) и РОРС, полученные при начальном мольном отношении 1 : 3 (производное холестерина–РОРС) имели высокую степень гомогенности по данным ФКС. Расчет среднего диаметра частиц, проведенный по методу [6], дал значения в интервале 100–140 нм для всех производных холестерина (I)–(III) (таблица). Полученные дисперсии были устойчивы по крайней мере в течение 3 недель при комнатной температуре – данные ФКС не показывали изменений во времени. Стехиометрический состав полученных дис-

персий (см. “Эксперимент. часть”) во всех случаях соответствовал мольному отношению 1 : 3.

Электронные микрофотографии (рис. 1а, б) свидетельствовали о наличии характерной регулярной структуры у смешанных дисперсий РОРС с каждым из производных холестерина (I)–(III). Размеры частиц, рассчитанные из данных электронной микроскопии соответствовали размерам, рассчитанным из данных ФКС (таблица). Везикулярных частиц, характерных для водных дисперсий РОРС (рис. 1в), в смешанных дисперсиях соединений (I)–(III) и РОРС не было обнаружено.

На рис. 2 представлены температурные зависимости спектров ЭПР спиновых зондов: парамагнитных производных холестерилового эфира (IV) и фосфатидилхолина (V) в составе дисперсий РОРС-(I), РОРС-(II) и везикул РОРС. Параметр спектров ЭПР A_{min} , характеризующий степень иммобилизации радикала [7], зависел от структуры зонда. Спектры ЭПР указывали на большую подвижность спин-меченого фосфатидилхолина (V) в составе дисперсий и везикул по сравнению с зондом (IV) во всем исследованном диапазоне температур. Структура холестерилового производного в составе дисперсий не оказывала влияния на подвижность зондов: спектры ЭПР зондов (IV) и (V) в составе дисперсий РОРС-(I), РОРС-(II) и везикул РОРС практически не различались, т.е. разумно предположить, что в смешанных дисперсиях при выбранном соотношении РОРС–холестерилового эфира разделения фаз не наблюдается. Различия в температурном поведении спектров ЭПР при температуре $>40^\circ\text{C}$ могут быть вызваны относительным снижением вязкости липидной матрицы в дисперсии РОРС-(II).

Таким образом, данные гранулометрии, электронной микроскопии и спектров ЭПР дисперсий не показали существенных различий, обусловленных структурой холестерилового производного.

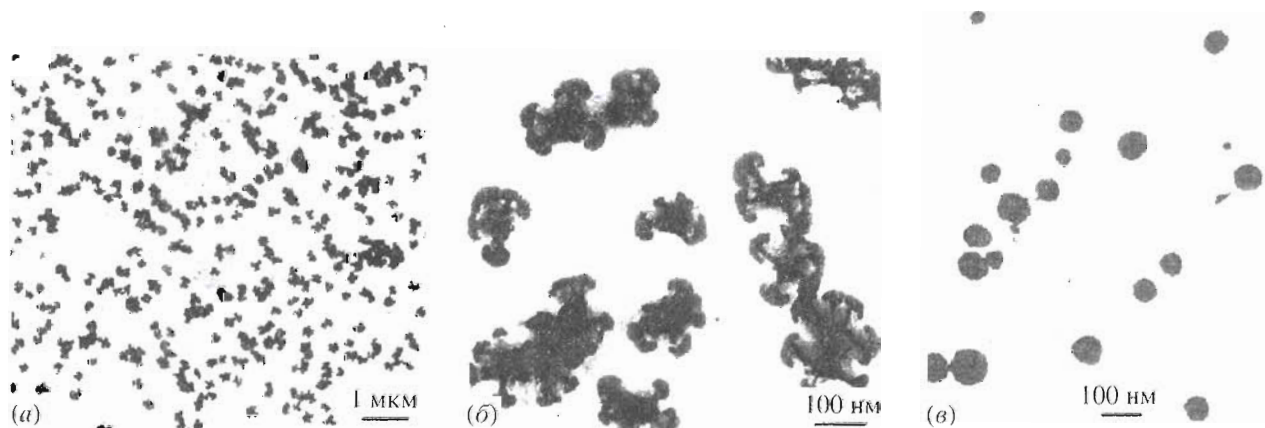


Рис. 1. Электронные микрофотографии (негативное контрастирование) дисперсий РОРС-(I) при 8000-кратном увеличении (а), РОРС-(III) при 20000-кратном увеличении (б) и везикул РОРС при 16000-кратном увеличении (в).

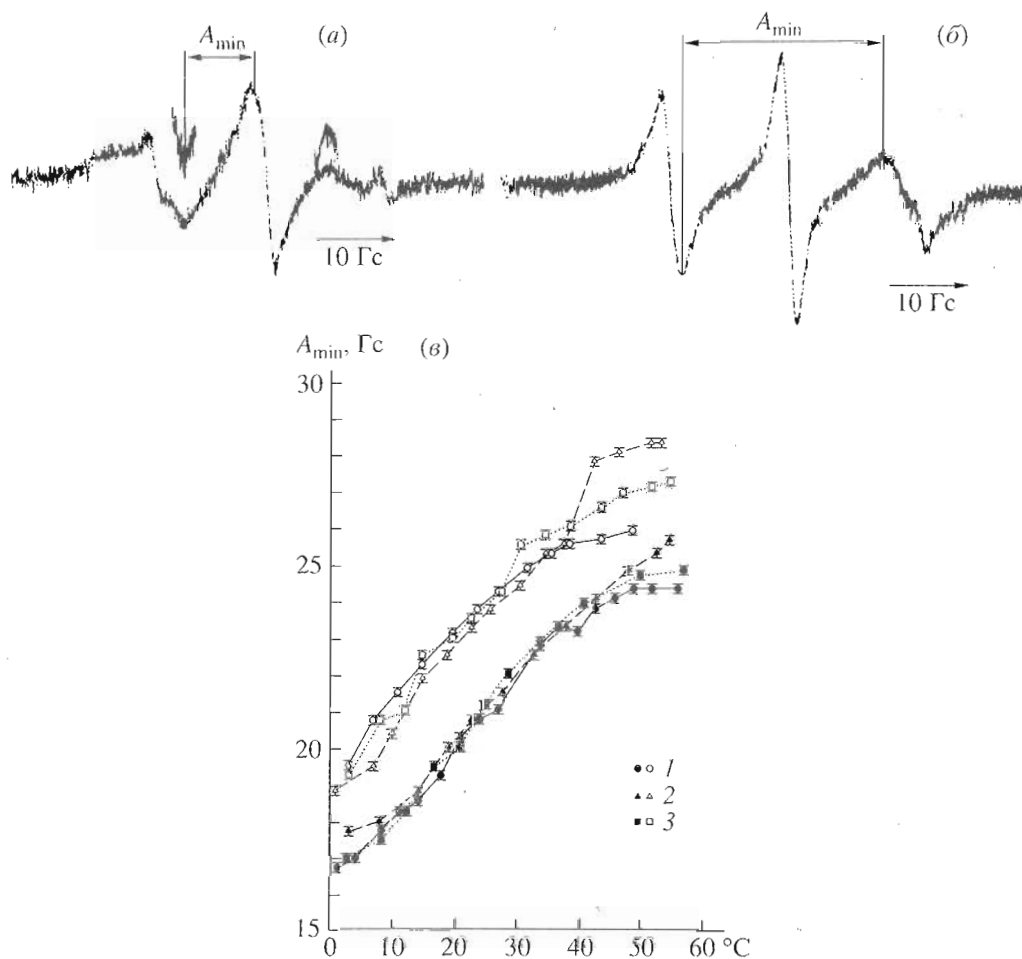


Рис. 2. Влияние температуры на спектры ЭПР синевых зондов (IV) и (V) в липидных дисперсиях: (а) и (б) – экспериментальные спектры зонда (V) в составе везикул РОРСР при 3 и 30°C соответственно. (в) – температурные зависимости A_{min} для зонда (IV) (темные символы) и (V) (светлые символы) в составе везикул РОРС (1), в составе липидных дисперсий РОРС–(II) (2) и РОРС–(III) (3).

О возможности применения полученных дисперсий в исследованиях на клетках в культуре свидетельствуют результаты, представленные на рис. 3, 4.

Дисперсию РОРС–(I) (концентрация РОРС 3×10^{-4} М, концентрация холестерилолеата 10^{-4} М), содержащую $[4-^{14}\text{C}]$ холестерилолеат, инкубировали с клетками гепатомы человека Нер G2 в среде, содержащей 10% ЛПДС. На рис. 3 представлена зависимость связывания холестерилолеата с клетками от времени инкубации (кривая 1). Доказательством интернализации холестерилолеата служит накопление в клетке $[^{14}\text{C}]$ холестерина (кривая 2). В клеточных экстрактах было найдено 2 радиоактивных продукта – холестерилолеат и свободный холестерин, в экстрактах из культуральной среды – только исходный $[4-^{14}\text{C}]$ холестерилолеат. На основании расчета по радиоактивности захват холестерилолеата составил за 24 ч

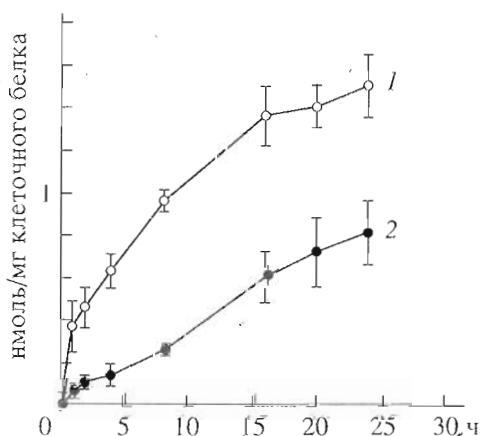


Рис. 3. Интернализация холестерилолеата (1) клетками Нер G2 в составе дисперсии РОРС–(I): 1 – количество холестерилолеата (1), связанного с клеткой; 2 – количество холестерина, образовавшегося в результате внутриклеточного расщепления холестерилолеата (1). Концентрация (1) в среде 10^{-4} М.

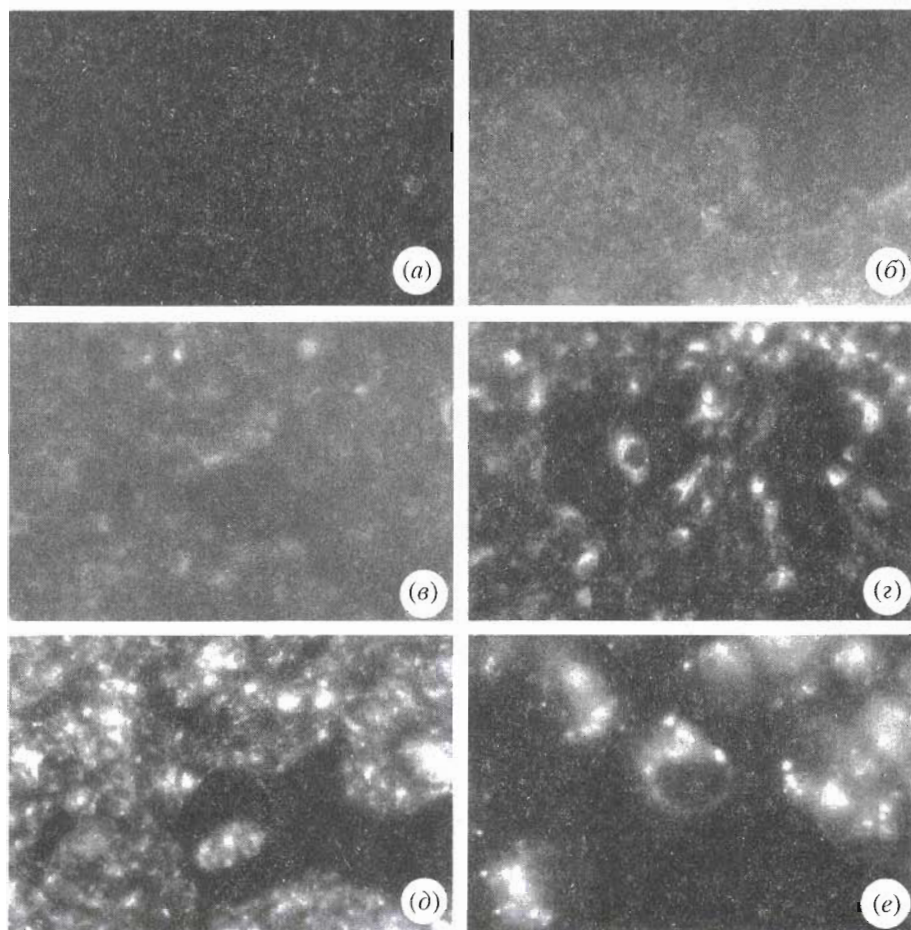


Рис. 4. Флуоресцентные микрофотографии клеток Нер G2, инкубированных с дисперсией РОРС–(III), полученных при временах инкубации 0 (а); 3 (б); 6 (в); 12 (г); 24 (д); 48 ч (е). Концентрация (III) в среде 2×10^{-5} М.

инкубации 1.5 нмоль/1 мг клеточного белка, а гидролиз – 0.8 нмоль/1 мг клеточного белка.

Взаимодействие клеток Нер G2 с дисперсией РОРС–(III) позволяет использовать флуоресцентную микроскопию для визуализации отдельных этапов интернализации неполярных липидов (рис. 4). Сразу после добавления РОРС–(III) поле обзора темное, что свидетельствует об отсутствии собственной флуоресценции клеток и/или связывания флуорофора с пластиком. После 3 ч инкубации флуоресценция наблюдается только на поверхности клеток. Через 6 ч характер флуоресценции изменяется: значительная флуоресценция поверхности еще наблюдается, но видно образование ярких флуоресцирующих внутриклеточных точек диаметром 100–200 нм, что указывает на интернализацию [8]. Через 12 ч число и интенсивность внутриклеточных флуоресцирующих точек возрастает. Более продолжительная инкубация приводит к слиянию флуоресцирующих точек и образованию флуоресцирующих областей (возможно, локализованных в аппарате Гольджи, поскольку распределение флуорофора

в клетках Нер G2 зависело от присутствия брэфельдина А [9]).

Таким образом показано, что смешанные дисперсии РОРС–холестерилловый эфир могут быть использованы в исследованиях внутриклеточного метаболизма и транспорта неполярных липидов. Обычно считается, что захват и интернализация холестерилловых эфиров клеткой в составе липопротеинов определяется белковым компонентом липопротеина [10–13]. Приведенные выше данные указывают, однако, что холестерилловые эфиры эффективно захватываются и интернализуются клетками Нер G2 путем рецепторнезависимого эндоцитоза в составе липидных дисперсий. Возможное участие неполярных липидов, захваченных клетками печени путем рецепторнезависимого эндоцитоза, в регуляции внутриклеточных процессов изучается в настоящее время.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Холестерилолеат (I), холестерин, РОРС, какодиловая кислота, глутаровый альдегид, *n*-фенилен-

диамин и PBS получены от фирмы "Sigma", изопропанол – от "Carlo Erba", [4- ^{14}C]холестерилолеат и 3β -(9,10-*цис*-октадеценилокси)-[1,2- ^3H]холест-5-ен – от "Amersham". 3β -(9,10-*цис*-Октадеценилокси)холест-5-ен (II) и 3β -[9-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил)аминонилокси]холест-5-ен (III) синтезированы по методу [14], спин-меченые липиды: 3β -(9-доксилгептадеканоилокси)холест-5-ен (IV) и 1-стеароил-2-(9-доксил)гептадеканоил-*sn*-фосфатидилхолин (V) – по методу [15]. ЛПДС выделена из свежей плазмы крови здорового донора по методу [16]. Эмбриональная сыворотка теленка и культуральная среда "Opti MEM" получены от Gibco, культуральная среда F 12 – от Eurobio. В работе использован культуральный пластик фирмы TPP (Plastic Products AG, Швейцария). ТСХ липидных экстрактов проводили на пластинках Kieselgel 60 фирмы "Merck".

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Yanaco-2000", спектры ЯМР на приборе "Bruker WM 500" в дейтерохлороформе.

Получение дисперсий. Изопропанольные растворы РОРС и соединений (I), (II) или (III) смешивали в рассчитанных соотношениях, упаривали, растворяли в изопропанол, нагретом до 40°C, получая изопропанольный раствор с концентрацией производного холестерина 10^{-2} М. Аликвоту раствора (100 мкл) вводили шприцем в 10 мл PBS, нагретого до 37°C, при постоянном встряхивании. Перед анализом полученный прозрачный раствор диализовали 48 ч против PBS. При мольном отношении производное холестерина-РОРС, 1 : 3, получены прозрачные дисперсии, гомогенные по данным ФКС.

Гранулометрия. Измерение размеров липидных частиц методом ФКС проводили на гранулометре "SEMATEch", снабженным фотогониометром "SEM 633" и коррелятором RTG. В качестве источника света использовали He-Ne-лазер с длиной волны 632.8 нм. Интенсивность рассеяния измеряли с помощью фотоумножителя "Hamamatsu R928" при различных углах рассеяния и контролируемой температуре. Диаметр частиц рассчитывали по методу [6].

Стехиометрический состав дисперсий. Концентрацию РОРС определяли по липидному фосфору [17]. Концентрацию холестерилолеата (I) измеряли ферментативным методом с использованием стандартного набора "Cholesterin monotest" фирмы "Boehringer" (Mannheim) или рассчитывали, измеряя радиоактивность образца, к которому было добавлено соответствующее меченое соединение в следовых количествах. Для определения концентрации флуоресцентного производного (III) аликвоту упаривали досуха, остаток растворяли в ацетоне и измеряли оптическое поглощение ацетонового раствора при 465 нм, принимая значение $\epsilon = 23\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [14]. Для определения концент-

рации олеилхолестерилового (простого) эфира (II) аликвоту дисперсии упаривали досуха, остаток растворяли в дейтерохлороформе и регистрировали спектр ^1H -ЯМР. Стехиометрический состав дисперсии определяли из отношения интегральной интенсивности сигналов, соответствующих метильным протонам холиновой группы РОРС и 18- CH_3 -группе соединения (II).

Электронные микрофотографии получали на приборах "JEOL JEM 100" и "Phillips". Образцы (10 мкл) в 0.1 М растворе NH_4HCO_3 наносили на медные сетки 400 меш, покрытые карбонизированным коллодием, выдерживали 30 с, затем добавляли 2–3 капли воды и 2–3 капли 2% водного раствора фосфорновольфрамовой кислоты.

Спектры ЭПР. Парамагнитные зонды (IV) и (V) прибавляли к изопропанольному раствору смеси липидов до молярного соотношения 1 : 20 (зонд-РОРС) и получали дисперсии, как описано выше. Спин-меченые препараты дисперсий получали также прибавлением 10^{-2} М раствора зонда (IV) или (V) в этаноле к дисперсиям РОРС-(I), РОРС-(II) или везикулам РОРС (с концентрацией РОРС 3×10^{-4} М) до конечной концентрации зонда 10^{-5} М. Концентрация этанола не превышала 1%, встраивание зонда в частицы дисперсий быстро проходило при смешивании, что было проверено спектрами ЭПР. Спин-меченый препарат помещали в плоскую кварцевую кювету с рабочим объемом 50 мкл. Спектры ЭПР регистрировали на приборе Varian E-109, оснащенный термопроставкой, используя микроволновую частоту 9.15 МГц при уровне СВЧ-мощности 20 мВт и амплитуде модуляции 2 Гс.

Клетки гепатомы человека линии Hep G2, полученные из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC, Salisbury), культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2 , в среде "Opti MEM" с добавкой среды F 12 и 10% эмбриональной сыворотки теленка. Перед экспериментом клетки, посаженные в 80 мм чашки, выдерживали 24 ч в той же среде в присутствии 10% ЛПДС (вместо эмбриональной сыворотки).

Флуоресцентная микроскопия клеток, преинкубированных с флуорофорами, проводилась после отмычки клеток PBS, фиксации 2.5% раствором глутарового диальдегида в 0.1 М какодильном буфере (pH 7.4) в течение 15 мин, промывки PBS и обработки 4% раствором *n*-фенилендиамина в глицерине, на флуоресцентном микроскопе "Leitz Dialux 20".

Авторы благодарны др. К. Алки, др. М. Шарбонье и др. П. Лешен де ла Порте (INSERM U-476, Марсель, Франция) за помощь в проведении микроскопических исследований, а также г-ну Н.А. Шаталову (РКНПК) за регистрацию спектров ЯМР. Работа выполнена при финансовой

поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 98-04-48870) и Национального института здравоохранения и медицинских исследований Франции (INSERM проект № 94-EO-04). А.Ф. Киселева глубоко признательна французскому правительству за присуждение аспирантской стипендии в рамках российско-французского соглашения о совместной аспирантуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Emulsion Science / Ed. P. Sherman. London: Academic Press, 1968.
2. Redgrave T.G., Maranhao R.C. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 835. P. 104–112.
3. Oliveira H.C.F., Hirata M.H., Redgrave T.G., Maranhao R.C. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 958. P. 211–217.
4. Via D.P., Smith L.C. // Methods Enzymol. 1986. V. 128. P. 848–857.
5. Batzri S., Korn D.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 298. P. 1015–1018.
6. Charbonier M., Lechene de la Porte P., Veessler S., Pike R.E., Woodley W.A., Patin P. // Intern. Labmate. 1993. V. 18. P. 37–39.
7. Гриффит О., Джост П. // Метод спиновых меток. Теория и применение / Ред. Р. Берлинер. М.: Мир, 1979. С. 489–569.
8. Wall D.A., Maack T. // Am. J. Physiol. 1985. V. 248. P. 12–20.
9. Klausner R.D., Donaldson J.G., Lippincott-Schwartz J. // J. Cell Biol. 1992. V. 116. P. 1071–1080.
10. Dashti N., Wolfbauer G., Koren E., Knowles B., Alapovic P. // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 794. P. 373–384.
11. Ranganathan S., Kottke B.A. // Hepatology. 1989. V. 9. P. 547–551.
12. Brissette L., Falstraut L. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1165. P. 84–92.
13. Rinninger F., Brundert M., Jackle S., Kaiser T., Greten H. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1255. P. 141–153.
14. Мишарин А.Ю. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. С. 281–283.
15. Мишарин А.Ю., Чернов Б.К. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 675–679.
16. Lindgren F.T. // Analysis of Lipids and Lipoproteins / Ed. E.G. Perkins. Amer. Oil Chemists' Soc., Amsterdam, 1975. P. 202–224.
17. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.V., Vasendin I.M. // J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 269–274.

Preparation and Properties of Aqueous Dispersions of Phosphatidylcholine–Cholesteryl Ester or Ether Mixtures

N. V. Medvedeva[#], A. F. Kiseleva, and A. Yu. Misharin

Russian Scientific–Technological Cardiological Complex, Ministry of Public Health of Russia,
Tret'ya Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121552 Russia

The injection of a mixture of 2-oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine and cholesterol ester or ether (cholesteryl oleate, 3 β -(9,10-*cis*-octadecenoxy)-5-cholestene, or 3 β -[9-(7-nitrophenyl-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminonyloxy]-5-cholestene at a molar ratio of 3 : 1 in isopropanol) into a 100-fold excess of an aqueous buffer gives dispersions stable in aqueous media at concentrations of the cholesterol derivative below 10⁻⁴ M. The dispersions are highly homogeneous, and, according to the data of electron microscopy and granulometry, particles with a mean diameter of 100–140 nm have a typical regular structure. Cholesteryl oleate of the dispersions is efficiently internalized by the Hep G2 hepatoma cells. The dispersions can be used in biochemical and microscopic studies of intracellular metabolism and transport of nonpolar lipids in living cultured cells.

Key words: lipid dispersions, cholesteryl esters, cholesteryl ethers

[#] To whom correspondence should be addressed.