



УДК 547.993.04+577.31

## СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОДЕЛЬНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ЦИТОТОКСИНОМ ИЗ ЯДА СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КОБРЫ

*Салахутдинов Б. А., Аринов Т. Ф., Асламов Х. А.,  
Садыков А. С., Бабаев М. У.*

*Институт биоорганической химии Академии наук УзССР, Ташкент*

Методом спинного зонда исследовали взаимодействие цитотоксина яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* с синаптическими мембранами и липосомами, приготовленными из фосфатидилхолила, фосфатидовой кислоты и их смеси в весовом соотношении 1:1. С ростом концентрации цитотоксина увеличивается значение параметра упорядоченности зонда *S*. Этот эффект цитотоксина проявляется тем сильнее, чем выше плотность отрицательного заряда поверхности липидной мембраны. Полученные данные приводят к предположению, что механизм действия цитотоксина включает две стадии: взаимодействие цитотоксина с поверхностью мембран, которое в значительной степени зависит от ее заряда, и погружение цитотоксина в гидрофобную область мембраны, которое сопровождается ее уплотнением.

Цитотоксин из яда среднеазиатской кобры относится к классу мембраноактивных полипептидов, которые нарушают функции биологических мембран, вызывая увеличение их проницаемости [1]. Известны исследования изменений свойств мембран, вызываемых цитотоксинами [2], однако молекулярный механизм этих явлений и характер структурных перестроек в мембранах при действии на них цитотоксинов пока неясны.

Анализ первичной структуры цитотоксина [3] указывает на сочетание в его молекуле гидрофильных участков, несущих положительный заряд, и сильнолипофильных областей: это позволило авторам работы [2] предположить, что механизм действия цитотоксина включает его электростатическое взаимодействие с мембранной поверхностью и погружение липофильных участков токсина в гидрофобную область мембран, приводящее к лабильности их структуры.

Одним из чувствительных методов, позволяющих регистрировать структурные изменения мембран, является метод спинных зондов. Использование в качестве таких зондов жирных кислот, несущих спинную метку в разных точках углеводородной цепи, позволяет избирательно исследовать определенные участки мембран. Ранее эти зонды уже использовали при исследовании взаимодействия некоторых мембраноактивных полипептидов с мембранами [4, 5].

Настоящая работа посвящена исследованию вызванных цитотоксином структурных изменений фосфолипидных и биологических мембран. Для качественной оценки вклада электростатического взаимодействия в меха-

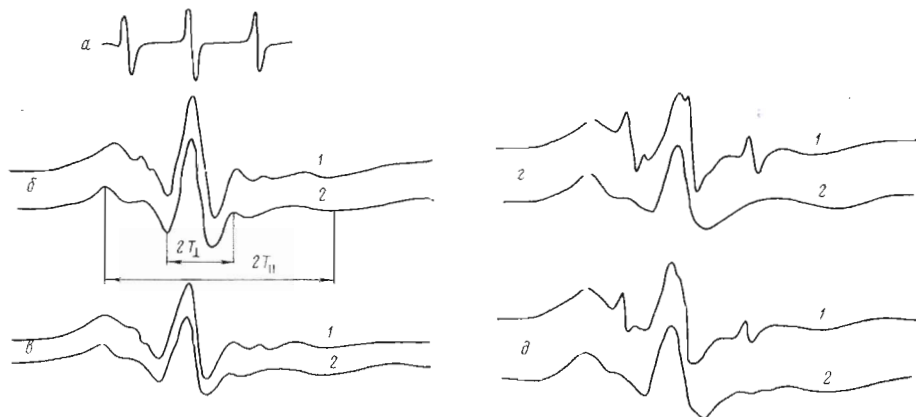


Рис. 1. Спектры ЭПР октадекан-14-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилгексазолидин)овой кислоты в спиртовом растворе (а) и в мембранных суспензиях в отсутствие (1) и в присутствии (2) цитотоксина. б, в, г — липосомы соответственно из фосфатидилхолина, его смеси (1:1 по весу) с фосфатидовой кислотой и из фосфатидовой кислоты, д — синаптосомы

низм действия цитотоксина использовали липосомы с различным поверхностным зарядом, приготовленные из фосфатидилхолина и его смеси с фосфатидовой кислотой (1:1 по весу). Наряду с этим применяли также озвученные водные дисперсии фосфатидовой кислоты, которые кроме липосом содержали ламелярные структуры.

Спектр ЭПР раствора спинового зонда — октадекан-14-спиро-2'-(N-оксил-4',4'-диметилгексазолидин)овой кислоты в этиловом спирте — представлен на рис. 1а. При добавлении этого зонда к суспензии липосом подвижность его молекул уменьшается, что приводит к изменению спектра зонда по сравнению с его спектром в спиртовом растворе [6]. Аналогичные изменения сигналов в спектре ЭПР, свидетельствующие о внедрении зонда в липидные бислои липосом, наблюдались и в наших экспериментах (рис. 1б—г). Узкие составляющие сигналов ЭПР отвечают молекулам зонда, локализованным в водной фазе.

Добавление цитотоксина к липосомам приводит к дальнейшему уменьшению подвижности зонда (рис. 1б—г). Для количественной оценки изменений подвижности нами был использован параметр порядка спинового зонда  $S$ , характеризующий ориентацию зонда относительно поверхности липосом [6]. При  $S$ , равном 1, молекулы зонда ориентированы строго перпендикулярно поверхности, а при  $S$ , равном 0, они находятся в быстром изотропном движении. Анализируя изменения параметра  $S$  с увеличением концентрации цитотоксина, можно получить информацию о вызываемых им структурных перестройках в мембранах липосом.

У липосом, приготовленных из фосфатидилхолина, при этом наблюдается рост  $S$  до предельного значения, близкого к 0,7. В случае липосом из смеси фосфатидилхолина и фосфатидовой кислоты предельное значение  $S$  составляет 0,73, а у образцов из фосфатидовой кислоты — 0,96 (рис. 2). Таким образом, при увеличении концентрации цитотоксина происходит уплотнение мембран, приводящее к более жесткой ориентации спинового зонда. Вместе с тем при одном и том же соотношении концентраций цитотоксина и фосфолипидов  $c_{\text{цт}}/c_{\text{лип}}$  значения  $S$  зависят от природы липида. Действие цитотоксина особенно сильно на образцах со значительным отрицательным зарядом поверхности, приготовленных из фосфатидовой кислоты, и значительно слабее в случае фосфатидилхолиновых липосом. Ясно, что этот эффект вызван присутствием в молекуле цитотоксина положительно заряженных групп [3], что позволяет ей образовывать комплексы с отрицательно заряженными липидами [7, 8].

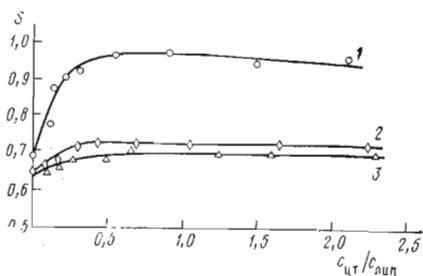


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость параметра  $S$  от относительной концентрации цитотоксина в суспензии липосом из фосфатидовой кислоты (1), его смеси с фосфатидовой кислотой (1 : 1 по весу) (2) и фосфатидилхолина (3)

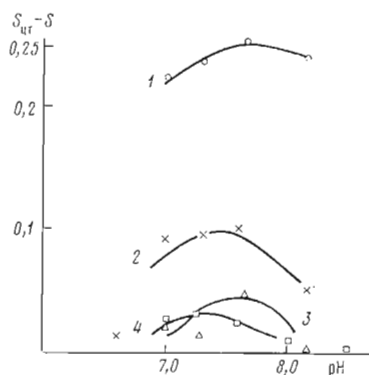


Рис. 3

Рис. 3. pH-Зависимость величины  $S_{цт} - S$ , где индекс «цт» относится к препаратам, содержащим цитотоксин. Ниже указан состав мембран и относительная концентрация цитотоксина: 1 — фосфатидовая кислота, 0,13; 2 — его смесь с фосфатидовой кислотой, 0,33; 3 — фосфатидилхолин, 0,60; 4 — синапсосомы, 2,5

В работе [2] показано, что цитотоксин наиболее эффективно взаимодействует с биологическими мембранами при  $pH \approx 7,5$ . Если существует сходство в характере действия цитотоксина на биологические и модельные липидные мембраны, то можно предположить, что у липосом в присутствии цитотоксина параметр  $S$  будет максимален также при  $pH \approx 7,5$ . Это предположение подтвердилось (рис. 3). Отсюда следует, что изменение параметра  $S$  в образцах может быть показателем эффективности токсина.

При изучении действия цитотоксина наряду с липосомами нами использовались также синапсосомы из мозга крысы. При добавлении зонда в суспензии синапсосом он также внедряется в гидрофобную область их мембран (рис. 1б). С ростом концентрации цитотоксина параметр  $S$  возрастает, достигая предельного значения при соотношении  $c_{цт}/c_{бел} = 1$ , где  $c_{бел}$  — концентрация белка синапсосом в суспензии (рис. 4). Для синапсосом, так же как и для липосом, действие цитотоксина на величину  $S$  наиболее сильно проявляется при  $pH \approx 7,5$ .

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что механизм действия цитотоксина состоит из двух стадий (ср. [2, 9]), а именно взаимодействия цитотоксина с поверхностью мембран, в значительной степени зависящего от величины поверхностного заряда, и погружения цитотоксина в гидрофобную область мембраны, которое сопровождается ее уплотнением.

### Экспериментальная часть

В работе использовали фосфатидилхолин и фосфатидовую кислоту, полученные согласно работам [10, 11].

Для приготовления липосом из фосфатидилхолина и фосфатидовой кислоты их растворы в хлороформе отдельно или в смеси упаривали досуха, а к остатку добавляли раствор 10 мМ трис-HCl (1 мл на 5 мг липида). Суспензию липидов далее озвучивали при  $0^\circ C$  на диспергаторе УЗДН-1 при частоте 22 кГц в течение 25 мин, а затем центрифугировали при 8000 об/мин.

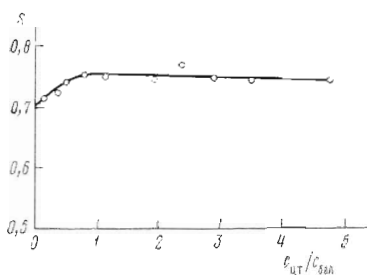


Рис. 4. Зависимость параметра  $S$  от относительной концентрации цитотоксина в сусспензии синапсомом

Синапсомомы из мозга крысы (концентрация белка 2 мг/мл) выделяли по модифицированной методике, описанной в работе [12].

Цитотоксин  $V_c^5$ , выделенный из яда среднеазиатской кобры методом, который описан в работе [13], использовали в виде раствора (60 мг/мл) в 10 мМ трис-НСI-буфере (рН $\approx$ 7,5).

В работе использовали спиртовой раствор октадекан-14-спиро-2'-(N-оксил-4', 4'-диметилноксазолидин)овой кислоты (Сува, США), который добавляли к суспензии липосом так, чтобы концентрация зонда в ней достигла  $10^{-4}$  М.

Спектры ЭПР снимали на радиоспектрометре «Varian E-4» при амплитуде модуляции не более 1 Гс и поступающей в резонатор мощности не более 20 мВт.

Параметр  $S$  вычисляли по формуле

$$S = \frac{T_{\parallel} - T_{\perp}}{T_{zz} - \frac{1}{2}(T_{xx} + T_{yy})} \frac{a}{a'}$$

где  $T_{\parallel}$  и  $T_{\perp}$  — значения тензоров сверхтонкой структуры соответственно при параллельном и перпендикулярном направлениях приложенного магнитного поля. Значения  $T_{\parallel}$  и  $T_{\perp}$  определяли из спектров, как это показано на рис. 1. Значение  $a$  вычисляли по уравнению

$$a = \frac{1}{3}(T_{zz} + T_{xx} + T_{yy}),$$

а значение  $a'$  определяли из соотношения

$$a' = \frac{1}{3}(T_{\parallel} + 2T_{\perp}).$$

Значения  $T_{zz}$ ,  $T_{xx}$ ,  $T_{yy}$  взяты из работы [6].

Авторы выражают благодарность Э. К. Рууге (МГУ) за обсуждение полученных результатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Condrea E.* Membrane-active polipeptides from snake venom: cardiotoxins and haemocytotoxins.— *Experientia*, 1974, v. 30, p. 121–129.
2. Юкельсон Л. Я., Красильников О. В., Ташмухамедов Б. А. Действие гемоцитотоксина из яда среднеазиатской кобры на искусственные фосфолипидные мембраны различного состава.— *Химия природы*, 1976, № 5, с. 128–129.
3. *Grishin E. V., Sukhikh A. P., Adamovich T. B., Ovchinnikov Yu. A., Yukelson L. Ya.* The isolation and sequence determination of a cytotoxin from the venom of the Middle-Asian cobra *Naja naja oxiana*.— *FEBS Lett.*, 1974, v. 48, № 2, p. 179–183.
4. *Julian C., Bell W. M., Bell R. M.* Membrane matrix disruption by melittin.— *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 288, p. 255–262.
5. *Hegner D., Summer U., Schnepel G. H.* The interaction of a lytic peptide, melittin, with spin-labeled membranes.— *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 291, p. 15–22.
6. Метод спиновых меток. М.: Мир, 1979.
7. *Dufourcq F., Faucon J.-F.* Specific binding of a cardiotoxin from *Naja mossaibika mossaibika* to charged phospholipids detected by intrinsic fluorescence.— *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 7, p. 1170–1176.
8. *Dufourcq J., Faucon J.-F.* Intrinsic fluorescence study of lipid-protein interactions in membrane models.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 467, p. 1–11.
9. Ксенжек О. С., Гевод В. С., Омельченко А. М., Семенов С. Н., Согличенко А. И., Мирошников А. И. Взаимодействие кардиотоксина из яда кобры *Naja naja oxiana*

- с модельными фосфолипидными мембранами.— Молекулярн. биология, 1978, т. 12, вып. 5, с. 1057—1064.
10. Singleton W. S., Gray M. S., Brown M. L., White J. L. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids.— J. Amer. Oil Chem., 1965, v. 42, № 1, p. 53.
  11. Рахимов М. М., Мадьяров Ш. Р., Бабаев М. У. Ферментативный синтез фосфолипидов на границе раздела фаз.— Узб. биол. ж., 1979, № 3, с. 6—9.
  12. Юкельсон Л. Я., Садыков Э., Сорокин В. М. Выделение и характеристика «прямого» гемолитического фактора яда среднеазиатской кобры.— Биохимия, 1974, т. 39, вып. 4, с. 816—821.
  13. Sen I., Gantham F. A., Cooper J. R. Mechanism action of  $\beta$ -bungarotoxin on synaptosomal preparations.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 8, p. 2664—2668.

Поступила в редакцию  
28.V.1980  
После доработки  
22.IX.1980

## STRUCTURAL CHANGES IN MODEL AND BIOLOGICAL MEMBRANES INDUCED BY A CYTOTOXIN FROM THE MIDDLE ASIAN COBRA VENOM

SALAKHUTDINOV B. A., ARIPOV T. F., ASLANOV Kh. A.,  
SADYKOV A. S., BABAJEV M. U.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the Uzbek SSR, Tashkent*

A method of spin probes was applied to study the interaction of cytotoxin from the venom of Middle Asian cobra *Naja naja oxiana* either with synaptic membranes, or liposomes made of phosphatidylcholine, phosphatidic acid and their 1:1 (w/w) mixture. Increase in cytotoxin concentration leads to a concomitant rise in the parameter  $S$  for a spin probe. The higher negative charge density of the lipid surface, the more pronounced is this effect. The data lend support to a hypothetical mechanism of the cytotoxin action: its first stage involves cytotoxin interaction with the membrane surface and depends on the charge of the latter, the second stage is the cytotoxin immersion into a hydrophobic region of membrane followed by its thickening.