

Е. И. Венская, А. С. Скоробогатова, Л. М. Лукьяненко

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИПИДОВ В МЕМБРАНАХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ *IN VITRO*

С помощью липофильных флуоресцентных зондов изучено влияние амилоидных фибрилл на состояние липидного бислоя мембран лимфоцитов человека. Полученные результаты позволяют заключить, что амилоидные фибриллы из лизоцима, взаимодействуя с лимфоцитами *in vitro*, вызывают изменение микровязкости липидного бислоя клеток.

Ключевые слова: амилоидозы, амилоидные фибриллы, лизоцим, микровязкость липидного бислоя, лимфоциты человека.

E. I. Venskaya, A. S. Skorobogatova, L. M. Lukyanenko

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

THE EFFECT OF AMYLOID FIBRILS ON THE CHANGES OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF MEMBRANE LIPIDS OF LYMPHOCYTES *IN VITRO*

In this work we study the effect of amyloid fibrils on lipid bilayer of human lymphocyte membranes using lipophilic fluorescent probes. The results suggest that amyloid fibrils of lysozyme could interact with lymphocytes *in vitro* and cause changes in the microviscosity of cells lipid bilayer.

Keywords: amyloidosis, amyloid, lysozyme, human lymphocytes, lipid bilayer.

Введение. Амилоидозы – это группа заболеваний различных органов и систем организма (нервная система, сердце, почки, печень, желудочно-кишечный тракт). Общим характерным признаком этих заболеваний является формирование и накопление фибриллярных структур с определенными свойствами (амилоидов) [1, 2]. Известно более 20 белков, способных образовывать амилоидные структуры *in vivo* [1, 2]. Среди них легкие цепи иммуноглобулина, фибриноген, инсулин, лизоцим и др. Обычно отложения белков связывают с определенным типом патологии какого-либо органа. Например, при сахарном диабете второго типа в поджелудочной железе обнаруживаются отложения амилина, а в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера происходит отложение β -амилоидного белка. Существуют и амилоидогенные белки, которые вызывают развитие системных амилоидозов. Часто амилоидозы являются вторичной патологией, осложняя течение каких-либо заболеваний, например хронических инфекций [1]. В настоящее время в связи с распространением болезни Альцгеймера актуальными являются исследования, посвященные патологической роли β -амилоидного белка. Установлено, что этот белок и его фрагменты являются цитотоксичными, что приводит к нарушению проницаемости мембран клеток, вызывая их гибель [3].

Амилоиды, образованные из различных белков, имеют ряд общих свойств: они представляют собой высокоупорядоченные фибриллярные структуры, характеризующиеся наличием большого числа β -слоев, расположенных перпендикулярно к главной оси фибриллы; взаимодействуют со специфическим флуоресцентным зондом тиофлавином Т; окрашиваются красителем конго красным и обладают свойством двойного лучепреломления в поляризованном свете [4]. На основании этого можно предположить, что, несмотря на различие белков-предшественников, сами амилоидные фибриллы, полученные из различных белков, являются сходными по структуре и физико-химическим показателям, и это позволяет использовать один из амилоидогенных белков для получения модельных амилоидных фибрилл при изучении их свойств и механизмов действия.

Часто в качестве модельного предшественника амилоидов используют лизоцим, который *in vitro* образует амилоидные фибриллы при определенных условиях [5]. Нами сделано предположение, что при амилоидозах фибриллы оказывают влияние не только на клетки органа, в котором происходит их накопление, но и на клетки крови, воздействуя, таким образом, на весь организм. Из литературы известно, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима куриного яйца, вызывают агрегацию эритроцитов [6]. Причиной этого, как считают авторы, является взаимодействие амилоидных фибрилл с липидами, входящими в состав мембран клеток [6]. При этом не установлено, каким образом амилоидные фибриллы взаимодействуют непосредственно с основными компонентами мембраны клеток крови человека.

Цель нашей работы – оценка влияния амилоидных фибрилл из лизоцима *in vitro* на вязкость липидного бислоя мембран лимфоцитов человека.

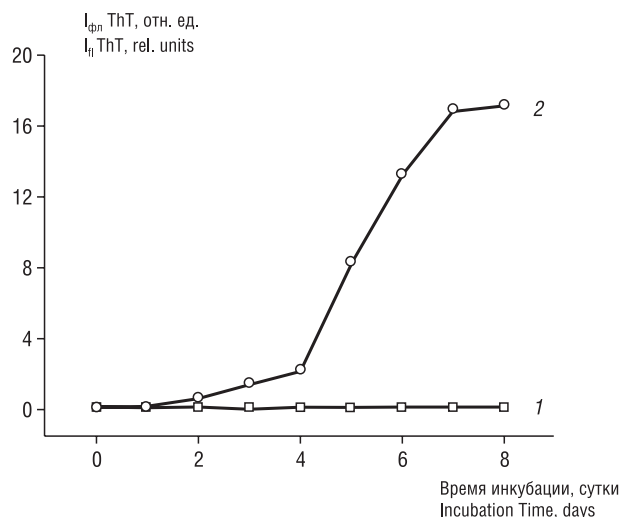
Материалы и методы исследования. Для получения амилоидных фибрилл лизоцим куриного яйца (Fluka) в концентрации 20 мг/мл инкубировали при 65 °С и непрерывном перемешивании [6] в течение 8 сут в растворе соляной кислоты (рН 2,0) с добавлением азида натрия в качестве антибактериального компонента. Контрольный образец лизоцима, растворенный в соляной кислоте, инкубировали при комнатной температуре не перемешивая. Контроль за образованием фибрилл осуществляли спектрофлуориметрическим методом с использованием зонда тиофлавина Т (Sigma) [7].

Лимфоциты выделяли из периферической крови практически здоровых доноров в градиенте плотности гистопака (Sigma). Донорскую кровь получали в РНПЦ «Трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ. Выделенные из периферической крови лимфоциты инкубировали с лизоцимом и амилоидными фибриллами (конечная концентрация белка составляла 10 мкг/мл) в течение 2 ч при 37 °С. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя трипанового синего, количество живых клеток составляло не менее 95 %. Изменение состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов исследовали с помощью липофильных флуоресцентных зондов: 1-(4-триметиламмоний)-6-фенил-1,3,5-гексатриена (ТМА-ДФГ), 2-диметиламино-6-лауроилнафталена (лаурдан) и пирена [8–10]. Для статистического анализа данные делили на три группы: контрольные образцы лимфоцитов, не подвергающиеся воздействию белковых структур; лимфоциты, подвергающиеся воздействию лизоцима; лимфоциты, подвергающиеся воздействию амилоидных структур. Достоверность различий между группами оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) [11].

Результаты и их обсуждение. Известно, что *in vitro* лизоцим образует фибриллы при низких значениях рН и повышенной температуре [5, 12]. Образование фибрилл из лизоцима оценивали с помощью зонда тиофлавина Т, позволяющего определить наличие поперечных сшивок β-слоя в процессе формирования амилоидных фибрилл [7, 12]. В наших экспериментах интенсивность флуоресценции тиофлавина Т увеличивалась в течение первых 5–6 сут инкубации с выходом на плато к 7-м суткам, что позволяло сделать вывод об образовании зрелых амилоидных фибрилл. Интенсивность флуоресценции зонда в контрольном образце не изменялась (рис. 1).

Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т ($\lambda_{\text{возб}} = 440$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 482$ нм) в зависимости от времени инкубации лизоцима: 1 – контроль (лизоцим растворен в 10 мМ HCl (рН 2,0), хранится при 20 ± 2 °С); 2 – лизоцим растворен в 10 мМ HCl (рН 2,0), температура инкубации 65 °С

Fig. 1. Changes in the intensity of fluorescence of Thioflavin T ($\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm, $\lambda_{\text{reg}} = 482$ nm) in defense on the lysozyme incubation time: 1 – control (lysozyme into 10 mM HCl (pH 2.0), storage at 20 ± 2 °C); 2 – lysozyme into 10 mM HCl (pH 2.0), incubate at 65 °C



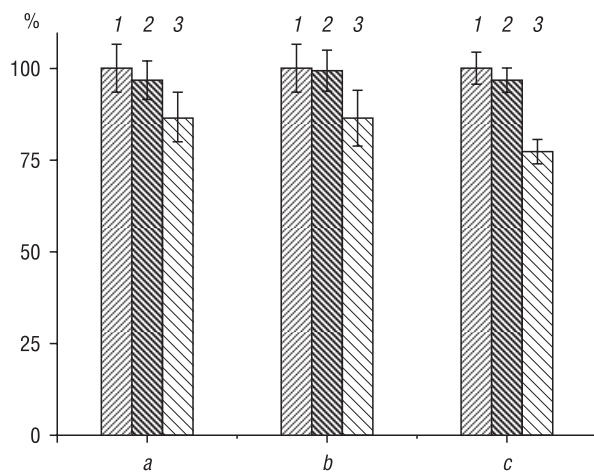


Рис. 2. Параметры флуоресценции липофильных зондов, встроенных в мембраны лимфоцитов (среднее значение параметра флуоресценции определенного зонда в контрольных клетках принято за 100 %):

a – генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана; *b* – коэффициент эксимеризации пирена; *c* – поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ; 1 – контроль (нативные лимфоциты, проинкубированные в среде, не содержащей белков); 2 – лимфоциты, проинкубированные в среде, содержащей лизоцим (10 мкг/мл); 3 – лимфоциты, проинкубированные в среде, содержащей амилоидные фибриллы из лизоцима (10 мкг/мл)

Fig. 2. Fluorescence parameters of lipophilic probes incorporated into lymphocyte membranes (mean fluorescence value in control cells taken as 100 %): *a* – generalized polarization of fluorescence of laurdan; *b* – coefficient of excimerization of pyrene; *c* – polarization of fluorescence TMA-DPH; 1 – control (native cells, incubated without proteins); 2 – lymphocytes incubated with lysozyme (10 µg/ml); 3 – lymphocytes incubated with lysozyme amyloid fibrils (10 µg/ml)

Заключение. Ранее нами показано, что амилоидные фибриллы, полученные из лизоцима, оказывают влияние на показатели флуоресценции липофильных зондов, встроенных в различные области мембран эритроцитов человека [13]. Кроме того, в данной работе аналогичные эффекты амилоидов, полученных из лизоцима, обнаружены и на лимфоцитах, выделенных из периферической крови человека. Это позволяет сделать вывод о том, что амилоидные фибриллы из лизоцима, взаимодействуя с клетками крови человека *in vitro*, вызывают изменение микровязкости гидрофобной и наружной области липидного бислоя мембран клеток, а также изменяют упорядоченность фосфолипидов мембраны. Выяснение причин этих эффектов планируется в дальнейших исследованиях.

Список использованных источников

1. Шавловский, М. М. Молекулярные и генетические основы этиопатогенеза амилоидозов / М. М. Шавловский // Мед. акад. журн. – 2010. – Т. 10, № 4. – С. 63–81.
2. Рамеев, В. В. Амилоидоз: вопросы диагностики и лечения / В. В. Рамеев, Л. В. Козловская, И. А. Саркисова // Клинист. – 2006. – № 4. – С. 35–41.
3. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking / B. Huang [et al.] // Biochemistry. – 2009. – N 48 (25). – P. 5794–5800.
4. Chiti, F. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease / F. Chiti, C. Dobson // Annu. Rev. Biochem. – 2006. – Vol. 75. – P. 333–366.
5. New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach / Y. Zou [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2014. – Vol. 118. – P. 9834–9843.
6. Chaudhary, N. Hen lysozyme amyloid fibrils induce aggregation of erythrocytes and lipid vesicles / N. Chaudhary, R. Nagaraj // Mol. Cell. Biochem. – 2009. – Vol. 328. – P. 209–215.
7. LeVine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution / H. LeVine // Protein Sci. – 1993. – Vol. 2 (3). – P. 404–410.

Полученные в течение 5–6 сут инкубации зрелые амилоидные структуры из лизоцима использовали для проведения экспериментов.

В настоящей работе исследовали изменение состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов с помощью флуоресцентных зондов ТМА-ДФГ, лаурдана и пирена, встраивающихся в мембраны клеток на различной глубине липидного бислоя.

При проведении экспериментов наблюдалось снижение генерализованной поляризации лаурдана, встроенного в мембраны лимфоцитов, проинкубированных в среде с нативным лизоцимом и с амилоидными фибриллами на 3,41–8,45 и 6,93–20,57 % соответственно по сравнению с контрольными значениями (контрольные клетки инкубировали в тех же условиях в среде, не содержащей белков) (рис. 2, *a*).

Обнаружено, что двухчасовая инкубация лимфоцитов в среде, содержащей лизоцим, приводит к снижению коэффициента эксимеризации пирена на 1,2–6,69 %, а после инкубации клеток в среде, содержащей амилоидные фибриллы, среднее значение данного коэффициента снижается на 6,58–21,54 % по сравнению с контрольными значениями (рис. 2, *b*).

Поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны клеток, подвергшихся воздействию нативного лизоцима и амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима, снижалась по сравнению с контрольными клетками на 3,2–7,2 и 20,79–24,81 % соответственно (рис. 2, *c*).

8. Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene / J. Kuhry [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1985. – Vol. 845. – P. 60–67.
9. Galla, H. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes / H. Galla, E. Sackmann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1974. – Vol. 339. – P. 103–115.
10. Harris, F. M. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order / F. M. Harris, K. B. Best, J. D. Bell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – Vol. 1565. – P. 123–128.
11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
12. Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants / L. Morozova-Roche L. [et al.] // *J. of Structural Biol.* – 2000. – Vol. 130. – P. 339–350.
13. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов / Л. М. Лукьяненко [и др.] // *Новости мед.-биол. наук.* – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 9–13.

References

1. Shavlovskii, M. (2010) "Etiology and pathogenesis of amyloidoses: the molecular and genetic basis", *Meditinskii akademicheskii zhurnal* [Medical Academic Journal], vol. 10, no. 4, pp. 63–81.
2. Rameev, V., Kozlovskaya, L. and Sarkisova, I. (2006) "Amyloidosis: problems of its diagnosis and treatment", *Klinitsist* [The clinician], vol. 4, pp. 35–41.
3. Huang, B., He, J., Ren, J., Yan, X. and Zeng, C. (2009) "Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved inter-molecular disulfide cross-linking", *Biochemistry*, vol. 48 (25), pp. 5794–5800.
4. Chiti, F. and Dobson, C. (2006) "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 75, pp. 333–366.
5. Zou, Y., Hao, W., Li, H., Gao, Y., Sun, Y. and Ma, G. (2014) "New insight into amyloid fibril formation of hen egg white lysozyme using a two-step temperature-dependent FTIR approach", *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, pp. 9834–9843.
6. Chaudhary, N. and Nagaraj, R. (2009) "Hen lysozyme amyloid fibrils induce aggregation of erythrocytes and lipid vesicles", *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 328, pp. 209–215.
7. LeVine, H. (1993) "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution", *Protein Science*, vol. 2 (3), pp. 404–410.
8. Kuhry, J., Duportail, G., Bronner, C. and Laustriat, G. (1985) "Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 845, pp. 60–67.
9. Galla, H. and Sackmann, E. (1974) "Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 339, pp. 103–115.
10. Harris, F., Best, K. and Bell, J. (2002) "Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1565, pp. 123–128.
11. Glants, S. (1998) *Biomedical Statistics*, translated by Danilov, Yu. A., Praktika, Moscow, RU.
12. Morozova-Roche, L., Zurdo, J., Spencer, A., Noppe, W., Receveur, V., Archer, D., Joniau, M. and Dobson, C. (2000) "Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants", *Journal of Structural Biology*, vol. 130, pp. 339–350.
13. Luk'yanenko, L., Zubritskaya, G., Venskaya, E., Skorobogatova, A., Kut'ko, A. and Slobozhanina, E. (2013) "Effect of amyloids on the physico-chemical state of the lipid bilayer of human erythrocytes", *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of biomedical sciences], vol. 7 (1), pp. 9–13.

Информация об авторах

Венская Елена Игоревна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.i.rusina@mail.ru

Александра Сергеевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sas.alesya@gmail.com

Лукьяненко Людмила Михайловна – канд. биол. наук, зам. директора по научной работе. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lukyanenko@gmail.com

Information about the authors

Venskaya Elena Igorevna – Junior Scientific Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: e.i.rusina@mail.ru

Skorobogatova Alexandra Sergeevna – Ph. D. (Biol.), Scientific Researcher Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: sas.alesya@gmail.com

Lukyanenko Ludmila Mikhaylovna – Ph. D. (Biol.), Senior Scientific Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (Akademicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus). E-mail: lukyanenko@gmail.com

Для цитирования

Венская, Е. И. Изменение физико-химических свойств липидов в мембранах лимфоцитов при действии амилоидных фибрилл *in vitro* / Е. И. Венская, А. С. Скоробогатова, Л. М. Лукьяненко // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук.* – 2016. – № 4. – С. 62–65.

For citation

Venskaya E. I., Skorobogatova A. S., Lukyanenko L. M. The effect of amyloid fibrils on the changes of physical and chemical properties of membrane lipids of lymphocytes *in vitro*. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus, biological series*, 2016, no. 4, pp. 62–65.