УДК 577.352

Архіпов С.О.[1] , асп.,
Булавін Л.А.[1], академік НАН України, д.ф.-м.н., проф.,
Маркес К.М.[2], проф.

Методика виготовлення гігантських везикул з поверхневим розподілом електростатичного заряду

Ця робота присвячена методам виготовлення везикул – сфероподібних утворень з подвійного фосфоліпідного шару. Його також називають мембранним шаром, оскільки він виконує функцію основи для клітинної мембрани.

В роботі розглянуто роль подвійного фосфоліпідного шару в функціонуванні живих організмів, механізм утворення везикул, різні способи штучного виготовлення везикул. Авторами роботи удосконалено та застосовано метод вирощування везикул на полімерній підкладці шляхом застосування ультразвукового збудження з метою відриву везикул від підкладки та активізації їх дифузії. В статті приділено увагу мікроскопічному аналізу виготовлених везикул.

Ключові слова: *клітинна мембрана, гігантські везикули, фосфоліпідний шар.*

[1] Київський національний університет імені Тараса Шевченка,03680, м. Київ, пр-т. Глушкова 4д, e-mail: sarkhip@gmail.com
[2] Інститут імені Шарля Садрона, Страсбург, Франція

Arkhipov S.O.[1], PhD student,
Bulavin L.A.[1], Dr. Sci., Prof,
Marques K.M.[2], Prof.

Methods of preparation of giant vesicles with the charge distribution on the surface

This work deals with methods of preparation of vesicles – spherical structures, formed with double phospholipid layer. It is named the membrane layer also, because it is the base structure for the cell membrane.

The role of phospholipid bilayer, playing in the functions of living cells, mechanisms of vesicles appearing, different methods of vesicles preparation are observed in the text. The method of vesicle growing on the polymer substrate was improved and used for the vesicle preparation. Ultrasonic exciting was applied for activation of the diffusion in the solution and removing vesicles from the substrate. Also, attention is paid to the microscopy of the prepared vesicles.

Key Words: *cell membrane, giant vesicles, pholpholipid layer.*

[1] Taras Shevchenko National University of Kyiv, 03680, Kyiv, Glushkova st., 4d, e-mail: sarkhip@gmail.com
[2] Charles Sadron Institute, Strasbourg, France.

Статтю представив академік НАН України, д.ф.-м.н., проф. Булавін Л.А

Вступ

Актуальність дослідження будови, функцій, законів життєдіяльності живої природи насьогодні не підлягає сумнівам. Знання про такий базовий структурний елемент організму як клітина по-перше, є необхідними з фундаментальної точки зору, а, по-друге, можуть бути застосованими у таких галузях сучасного життя як медицина, біоінженерія, екологічні проблеми, тощо.

Клітина — це деяка замкнута система, що складається з органел, розміщених у клітинній рідині, цитоплазмі і відділена від оточуючого середовища спеціальною стінкою. Ця стінка носить назву клітинна мембрана та має специфічні властивості, такі як вибіркова проникність, еластичність та інше. Основою клітинної мембрани є подвійний фосфоліпідний шар. Існування такого шару є можливим завдяки амфіфільності фосфоліпідних молекул. Амфіфільність — це одночасна гідрофільність одного кінця молекули та гідрофобність іншого. Внаслідок цього у воді спостерігається активна самоорганізація фосфоліпідних молекул.

© Архіпов С.О., Булавін Л.А., Маркес К.М., 2013

Схематичне зображення молекули фосфоліпіду представлене на рис. 1.

В результаті самоорганізації фосфоліпідних

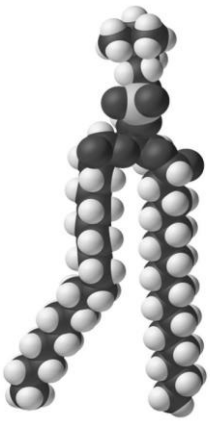

Рис. 1. Схематичне зображення молекули фосфоліпіда. Гідрофільна голова, що складається з багатоатомного спирту, залишку фосфорної кислоти (негативно заряджена) та групи атомів (може бути позитивно заряджена). Гідрофобний хвіст — вуглецеві ланцюжки, що є залишками жирних кислот.

молекул можуть утворюватися структури наступного характеру (рис. 2):

Дослідження подвійного фосфоліпідного шару, його самоорганізації та взаємодії з іншими об'єктами, в тому числі біологічного характеру, бере початок з сімдесятих років минулого століття [1, 2], причому дослідження проводяться

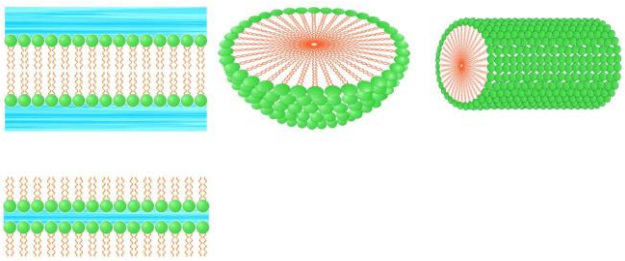

Рис. 2. Амфіфільним молекулам фосфоліпідів при взаємодії з водою властиво самоорганізовуватись у наступні структури:

а – подвійний фосфоліпідний шар

б – сферична міцела

в – циліндрична міцела

г – інвертований фосфоліпідний шар

як з електронейтральними об'єктами, так і з зарядженими [3, 4]. Значний науковий інтерес викликають везикули, оскільки це, по суті, є клітинна мембранна оболонка. Дослідження саме заряджених везикул є важливим з точки зору осмислення та розуміння протікання процесів у живих організмах, оскільки реальні клітинні мембрани, як правило, несуть на собі певний розподіл електричного заряду. Везикули – це метастабільні об'єкти з довгим періодом життя, розміром порядку 0.1-100 мкм. Умовно їх поділяють за розміром:

малі — 20-100 нм;

великі — 100-500 нм;

гігантські — більше 500 нм.

Везикули більшого розміру можуть утримувати в собі менші візикули або ліпосоми.

Методи приготування везикул

Проведення експериментальних досліджень вимагає якісних методик з приготування досліджуваних об'єктів — везикул. Для приготування нейтральних одностінних везикул (в тому числі великих та гігантських розмірів) використовують декілька основних методів. Це електроформаційний метод [5, 6], метод дегідратації-регідратації [7], метод об'єднання малих везикул, метод гідратації на полімерній підкладці в розчині цукрози. Суть електроформаційного методу полягає у впливі електричного потенціалу на формування везикул із фосфоліпідного розчину. Задля цього неорганізовані фосфоліпідні молекули поміщаються в розчин цукру (глюкози або сахарози) в робочу камеру з провідними стінками, до контактних клем котрої підключається джерело змінної напруги. Зазвичай використовують такі значення напруги: величина порядку одиниць вольт, частота зміни – порядку десяти герц. Час витримки – близько години. Задля застосування методу дегідратації-регідратації необхідно попередньо приготувати везикули малого розміру. Розчин цих везикул у воді поміщається на гідрофільну підкладку (наприклад, скло або кварц), після чого висушується та повторно гідратується чистою водою або розчином цукру у воді. Метод об'єднання малих везикул є досить зручним, оскільки не вимагає виконання жодних додаткових процедур: малі везикули схильні об'єднуватись у більші з плином часу. Однак цей

метод має такі недоліки, як необхідність значної затрати часу, порівняно малий вихід гігантських везикул та наявність великої кількості залишкових малих везикул у робочому розчині. Найчастіше використовують електроформаційний метод, оскільки він дає хороший контроль над розмірами везикул, однак, цей метод неприйнятний для приготування везикул, що несуть на собі певний електростатичний заряд через взаємодію електрично заряджених молекул фосфоліпідів з прикладеним електричним полем. Тому було використано метод вирощування везикул на підкладці у розчині цукрози. Основним недоліком цього методу є ускладнений відрив везикул від підкладки, на якій вони сформовані. Однак в ході експериментів цей недолік було усунуто шляхом застосування ультразвукового збудження.

Використані матеріали та методики досліджень

У якості підкладки використовувалась свіженанесена плівка тонкого гомогенного полімерізованого полівінілового спирту (ПВС). Базовим фосфоліпідом для виготовлення везикул було обрано DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) виробництва Sigma-aldrich. Задля отримання розподілу електростатичного заряду по поверхні везикули було використано електропозитивний фосфоліпід DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane). Було

Рис. 3. Фотографія вирощувальної камери. Дном камери є лабораторне скло, стінками слугує пластична маса Vitrex.

приготовано суміш, що складається з 90% нейтрального фосфоліпіду та 10% зарядженого.

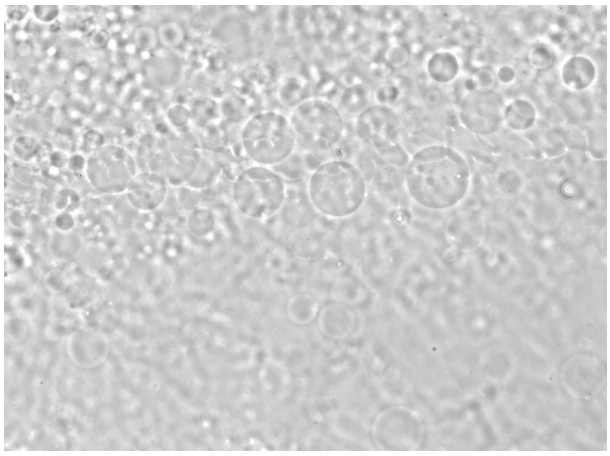

Рис. 4. Фотографія з фазово-контрасного мікроскопа, на котрій зафіксовано зображення везикул у камері вирощування. Знімок зроблено через 4-5 хвилин після заповнення камери водним розчином цукрози

Розчин суміші фосфоліпідів у хлороформі депонувався у відкриту камеру (Рис. 3) на плівку ПВС, після чого хлороформ висушувався в вакуумній камері протягом 90 хвилин. Після цього камера заповнювалась водним розчином цукрози. В камері одразу починається формування везикул.

Для аналізу зразків у вирощувальній та досліджувальній камерах використовуються фазово-контрасна мікроскопія. Ключову роль у цьому методі відіграє зсув фази світла при проходженні через досліджуванний об’єкт. На рис. 4 представлено зображення фрагменту камери для вирощування, отримане за допомогою фазово-контрасної мікроскопії через 4-5 хвилин після початку інкубації. Мікроскоп сфокусовано поблизу поверхні плівки ПВС, тобто везикули залишаються поблизу підкладки.

Як видно з рисунка, у вирощувальній камері утворюється значна кількість везикул. Для подальших досліджень везикули необхідно транспортувати до робочої камери. Транспортування здійснювалось за допомогою мікропіпетки з достатньо великим отвором (отвір піпетки приблизно на порядок перевищує розмір гігантських везикул), щоб уникнути руйнування везикул. Однак мікроскопічний аналіз транспортованої рідини показав, що кількість везикул у ній низька порівняно з кількістю везикул, що були у вирощувальній камері. Це пов’язано з тим, що більша частина

везикул залишається поблизу ПВС-підкладки і не піддається транспортуванню. Щоб активізувати відрив везикул від підкладки та збільшити їх кількість в товщі рідини було вирішено застосувати обробку ультразвуком. Камера поміщалась у скляну посудину та вміщувалось у ванну для ультразвукової обробки. В результаті процедури значно зріс відсоток везикул, котрі піддаються транспортуванню з вирощувальної до робочої камери. Фрагмент зображеня робочої камери з везикулами представлено на рис. 5.

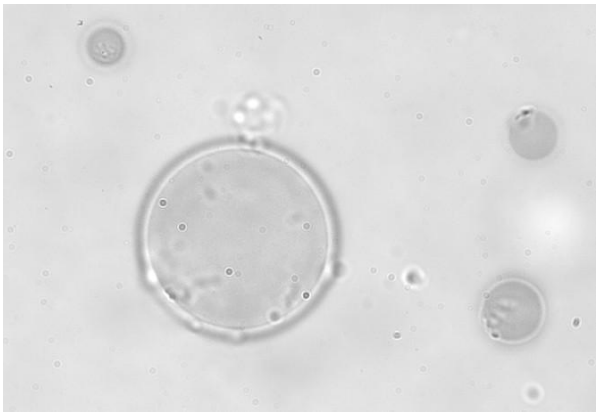

Рис. 5. Гіганстька та три великі везикули, отримані за допомогою методу вирощування на підкладці та ультразвукового збудження.

З плином часу частина з них руйнується, частина об'єднується в везикули більшого розміру. У ході експерименту було встановлено, що оптимальним є час витримки розчину перед трансфером везикул 5-7 хв, а час витримки в ультразвуковій ванні — 5-10 сек. Після приготування робочий розчин з везикулами можна зберігати за умов низьких додатних температур без відчутних втрат везикул внаслідок природного руйнування та негативного впливу бактерій. Розчин містить достатню для досліджень кількість везикул одну-дві доби після приготування. Експериментально було підтверджено, що подібний спосіб приготування везикул підходить також і для приготування електронейтральних везикул.

Висновки

В ході проведення експерименту було успішно застосовано методику приготування нейтральних та електростатично заряджених (з вмістом електростатично заряджених фосфоліпідів) везикул на підкладці з полівінілового спирту. Введення в протокол етапу ультразвукової стимуляції дифузії дозволило досягти значної концентрації везикул в робочій рідині. Отримано гігантські везикули з наперед заданими властивостями, достатньо стабільні у часі. Методика дає відтворюваний результат, тому є зручною для використання в постановці подальших експериментальних досліджень подвійного фосфоліпідного шару.

Список використаних джерел

1. Reiber H. Bilayer vesicles from a mixture of different lipids – phase-diagram and implications for myelin membrane / H. Reiber // Experemental brain research. – 1975. – Т. 23, № 5682 – С. 172.
2. *Bolotov A.A., Gashkov S.B., Frolov A.B., Chasovskich A.A.* Algorithmic backgrounds of elliptic cryptography. – Moscow: Moskow Energetic Inst., 2000. – 100 p. (in Russian).
3. *Skobelev V.V.* Automata over varieties with an algebra // Visn., Ser. Fiz.-Mat. Nayky, Ky\"iv Univ. im. Tarasa Shevchenka. – 2012. – N 2. – P. 234-238. (in Ukrainian).
4. *Cox D., Little J., O'Shea D.* Ideals, varieties, and algorithms. An Introduction to computational algebraic geometry and commutative algebra. – Moscow: Mir, 2000. – 687 p. (in Russian).
5. *Kurosh A.G.* Lectures in general algebra. – Moscow: Nauka, 1973. – 400 p. (in Russian).
6. *Cohn P.M.* Universal algebra. – Moscow: Mir, 1968. – 352 p. (in Russian).
7. *Chen P.P.* Entity-relationship modeling: historical events, future trends, and lessons learned / P.P. Chen // Entity-Relationship Approach to Software Engineering: international conference, November 27-30, 2001, Yokohama, Japan: proceedings. – 2001. – P. 71-77..

Надійшла до редколегії 04.04.2013