

KRZYSZTOF DWIECKI, PAWEŁ GÓRNAŚ,
MAŁGORZATA NOGAŁA-KAŁUCKA, STANISŁAW WITKOWSKI,
KRZYSZTOF POLEWSKI

WPLYW IZOMERÓW OPTYCZNYCH α -TOKOFEROLU NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ MEMBRANY LIPIDOWEJ

Streszczenie

Celem badań było określenie w jaki sposób obecność różnych izomerów optycznych α -tokoferolu wpływa na przepuszczalność membrany lipidowej, stanowiącej prosty model błony komórkowej. Ze względu na swą hydrofobowość α -tokoferol łatwo rozpuszcza się w lipidowym rdzeniu błony komórkowej, wpływając tym samym na jej strukturę, stabilność i inne właściwości. D- α -tokoferol jest naturalną formą witaminy E, występującą m. in. w olejach roślinnych czy warzywach. Natomiast DL- α -tokoferol jest syntetyczną formą tej witaminy, która może być stosowana jako dodatek do żywności. Niektórzy autorzy uważają, że mimo takiej samej budowy chemicznej syntetyczna forma α -tokoferolu może wykazywać odmienne działanie *in vivo* w porównaniu z formą naturalną, dlatego też ważne jest poznanie mechanizmów oddziaływania tokoferolu z innymi cząsteczkami o dużym znaczeniu biologicznym i strukturami komórkowymi na poziomie molekularnym.

W badaniach zastosowano D- α -tokoferol oraz mieszaninę izomerów D i L α -tokoferolu (α -T). Do przygotowania liposomów (membran lipidowych) użyto dipalmitynianu fosfatydylocholino (DPPC) oraz L- α -fosfatydylocholino (lecytyny) z żółtka jaja (PC). Do monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w membranie lipidowej zastosowano metodę fluorescencyjną z użyciem sondy (barwnika) – kwasu 1-anilinonaftaleno-8-sulfonowego (ANS).

Proces wnikania sondy ANS do membrany DPPC w fazie żelowej zachodził na drodze natychmiastowej absorpcji (w czasie od jednej do kilku sekund) z pominięciem fazy adsorpcji. Dodatek α -tokoferolu do membrany nie zmieniał szybkości wnikania sondy. Jedynie w przypadku D- α -tokoferolu ilość zaabsorbowanej sondy wynosiła 25% wartości odpowiadającej samej membranie DPPC i DPPC z DL- α -tokoferolem.

W membranie DPPC zaobserwowano wyraźny wzrost jej przepuszczalności związany z głównym przejściem krystalicznym. W przypadku membrany DPPC z D- α -tokoferolem i DL- α -tokoferolem stwierdzono, że maksymalny wzrost przepuszczalności błony w wyniku zmiany fazy membrany był o około 60% mniejszy niż ma to miejsce w samym DPPC, a zmiany przepuszczalności obserwowane w temperaturze głównego przejścia krystalicznego charakteryzowały się łagodniejszym przebiegiem. α -Tokoferol hamował wnikanie sondy ANS do membrany w fazie ciekłokrystalicznej. Nie zaobserwowano istotnych różnic w przepuszczalności membrany w obecności D i DL- α -tokoferolu.

Mgr inż. K. Dwiecki, mgr inż. P. Górnaś, dr hab. K. Polewski prof. AR, Katedra Fizyki, ul. Wojska Polskiego 38/42, 60-637 Poznań; dr hab. M. Nogala-Kałucka prof. AR, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań; dr hab. Stanisław Witkowski, Wydz. Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet Białostocki, 15-433 Białystok

Słowa kluczowe: membrana lipidowa, przepuszczalność membrany, α -tokoferol, fluorescencja, ANS

Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie przeciwutleniaczami w aspekcie ich zdolności do wiązania wolnych rodników, a tym samym zapobiegania wielu schorzeniom cywilizacyjnym, takim jak choroby układu krążenia czy nowotwory. Pamiętać jednak należy że substancje te mogą wykazywać inne od przeciwutleniających właściwości, wpływając jednocześnie na wiele funkcji życiowych organizmu człowieka. Przykładem takiego związku jest α -tokoferol, powszechnie występujący w naszej diecie przeciwutleniacz rozpuszczalny w tłuszczach. Ze względu na swą hydrofobowość α -tokoferol łatwo rozpuszcza się w lipidowym rdzeniu błony komórkowej, wpływając tym samym na jej strukturę, stabilność i inne właściwości [8]. D- α -tokoferol jest naturalną formą witaminy E, występującą m. in. W olejach roślinnych czy warzywach. Natomiast DL- α -tokoferol jest syntetyczną formą tej witaminy, która może być stosowana jako dodatek do żywności. Istnieją sprzeczne doniesienia co do wpływu obu form tokoferolu na organizm człowieka [1, 7]. Niektórzy autorzy uważają, że mimo takiej samej budowy chemicznej syntetyczny tokoferol może wykazywać odmienne działanie *in vivo* w porównaniu z witaminą E pochodzenia naturalnego, dlatego też ważne jest poznanie mechanizmów oddziaływania tokoferolu z innymi cząsteczkami o dużym znaczeniu biologicznym i strukturami komórkowymi na poziomie molekularnym. Układem przydatnym w tego rodzaju badaniach mogą być membrany lipidowe (liposomy), które są prostym modelem błony komórkowej [3].

Celem podjętych badań było określenie w jaki sposób obecność różnych izomerów optycznych α -tokoferolu wpływa na przepuszczalność membrany lipidowej.

Materiał i metody badań

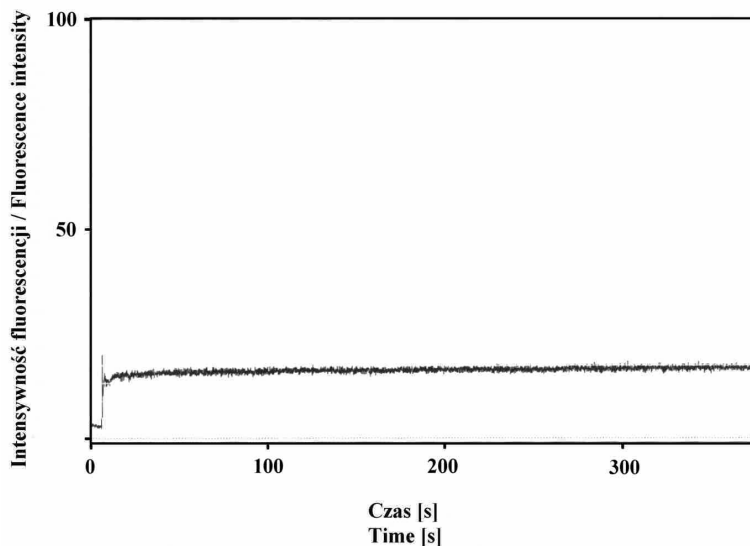
W badaniach zastosowano D- α -tokoferol oraz mieszaninę izomerów D i L α -tokoferolu (w stosunku ilościowym 1:1) – (α -T), o czystości chromatograficznej. Preparaty przygotowano na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu Białostockiego. Do przygotowania liposomów (membran lipidowych) użyto dipalmitynianu fosfatydylocholiny (DPPC) oraz L- α -fosfatydylocholiny (lecytyny) z żółtka jaja (PC), firmy Sigma Aldrich (Niemcy) o czystości 99%. Wodne zawiesiny membran przygotowano w sposób następujący: do 2 cm³ chloroformowego roztworu DPPC o stężeniu 0,2 mg/cm³ dodano 2 cm³ odpowiedniego izomeru α -tokoferolu (α -T), uzyskując w ten sposób mieszaninę, w której stężenie α -T wynosiło 75 μ M. Stężenie α -T dobrano w taki sposób, by membrana znajdowała się w fazie lamelarnej [2]. Otrzymane mieszaniny odparowano w celu wytworzenia cienkiej warstwy filmu lipidowego. Powstałe filmy uwodniono poprzez intensywne ich mieszanie w wodzie bidestylowanej (10 cm³), w temperaturze powyżej głównego przejścia krystalicznego

membrany DPPC (51°C), przez 20 min. Do monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w membranie lipidowej zastosowano metodę fluorescencyjną z wykorzystaniem sondy (barwnika) – kwasu 1-anilinonaftaleno-8-sulfonowego (ANS) firmy Sigma Aldrich (Niemcy). Substancja ta jest często stosowana do badania zmian przepuszczalności i struktury membran lipidowych i komórkowych [4, 5]. Metodyka została zmodyfikowana na potrzeby wykonywanych pomiarów. Sonda została wprowadzona do układu wodnej zawiesiny membrany. W celu szybkiego zmieszania składników zastosowano mieszadło magnetyczne. Pomiarów intensywności emisji fluorescencji w czasie i w zależności od temperatury dokonano za pomocą spektrofluorymetru RF 5001 PC firmy Shimadzu, przy długości fali wzbudzenia równej 380 nm i emisji 485 nm. Pomiarów w czasie wykonano w temp. 20°C, a więc w fazie żelowej membrany lipidowej. Pomiarów temperaturowe wykonywano w zakresie temp. 20–62°C. Wszystkie pomiary wykonano bezpośrednio po przygotowaniu próbek.

Wyniki i dyskusja

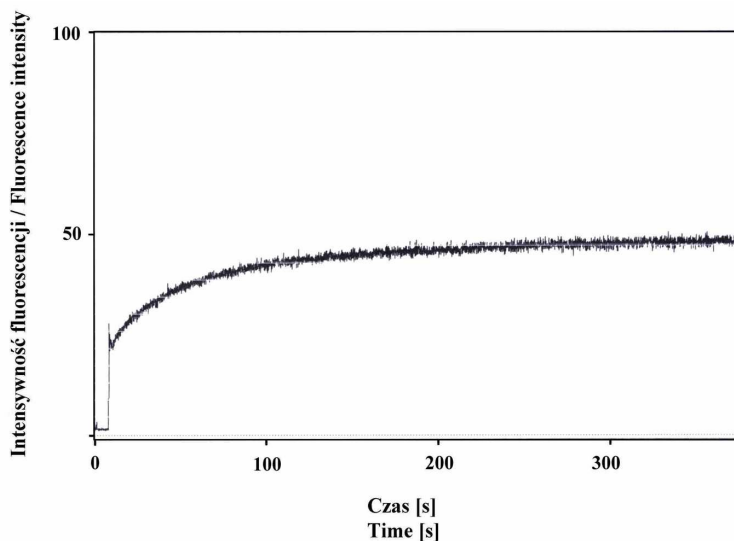
Pomiary w czasie

Pomiary dynamiki wnikania sondy ANS do membrany lipidowej przeprowadzone w temp. pokojowej (20°C) wykazały, że dodanie ANS do samej membrany DPPC prowadziło do wzrostu intensywności emisji fluorescencji ANS, co świadczy o zaabsorbowaniu sondy przez membranę (rys. 1a). Absorpcja zachodziła natychmiast po dodaniu ANS do układu (w ciągu od jednej do kilku sekund), dalsza inkubacja liposomów z sondą (do 375 s) nie prowadziła do wzrostu intensywności fluorescencji. Można więc powiedzieć, że w przypadku DPPC wnikanie ANS do wnętrza membrany zachodziło z pominięciem fazy adsorpcji sondy na powierzchni błony, co zaobserwowano w przypadku analogicznego doświadczenia wykonanego z użyciem membrany lecytynowej (PC) (rys. 1b). Zjawisko to wynika prawdopodobnie z różnicy w budowie morfologicznej membran DPPC i PC. Membrana DPPC składa się z fosfolipidów mających w swojej budowie reszty nasyconego kwasu tłuszczowego (palmitynowego) w konformacji trans, natomiast PC zawiera reszty kwasów tłuszczowych o różnym stopniu nienasycenia (reszty kwasu oleinowego, linolowego) i reszty kwasów nasyconych (palmitynowego i stearynowego). Taka budowa zapewnia większą płynność membrany oraz zwiększa odległości pomiędzy cząsteczkami w monowarstwie [6].



Rys. 1a. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC w temp. 20°C.

Fig. 1a. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane at a room temperature (20°C).

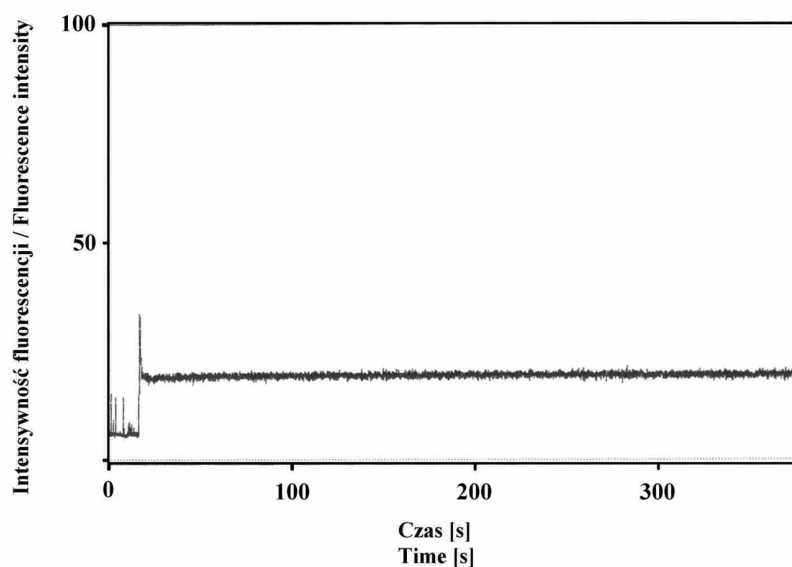


Rys. 1b. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie PC w temp. 20°C.

Fig. 1b. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the PC membrane at a room temperature (20°C).

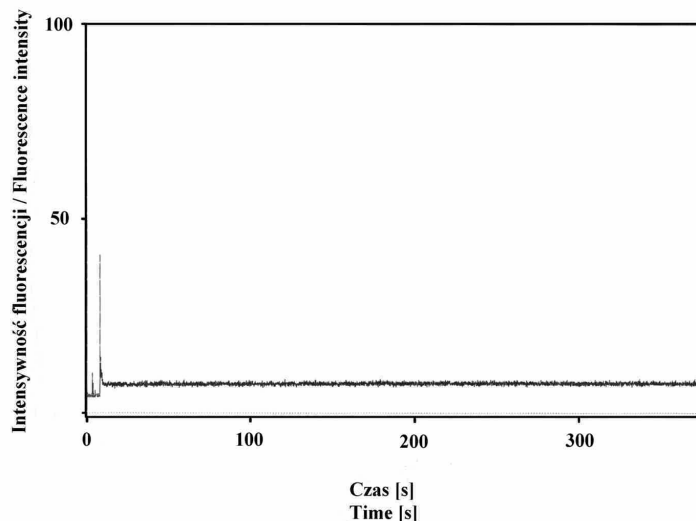
W membranie PC ANS zaadsorbowany na powierzchni membrany lub w jej części hydrofilowej powoli dyfunduje do jej hydrofobowego obszaru, czego nie obserwuje się w przypadku DPPC. Również mniejsze uporządkowanie łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych w membranie PC, która w temp. pokojowej znajduje się w fazie ciekłokrystalicznej (w przeciwieństwie do membrany DPPC, będącej w bardziej uporządkowanej fazie żelowej), może powodować powolną dyfuzję zaadsorbowanej sondy do wnętrza membrany. Dodanie do membrany DPPC racemicznej mieszaniny

izomerów D i L α -tokoferolu (rys. 2) nie spowodowało zmian w szybkości absorpcji sondy i końcowej intensywności fluorescencji (a więc ilości zaabsorbowanego barwnika). W przypadku membrany DPPC z wbudowanym D- α -tokoferolem (rys. 3) stwierdzono, że końcowa wartość fluorescencji ANS (a więc ilość zaabsorbowanego barwnika) wynosiła około 25% intensywności fluorescencji zanotowanej w przypadku samego DPPC i DPPC z DL- α -tokoferolem. Nie stwierdzono natomiast różnic szybkości dyfuzji barwnika do membrany, pomiędzy samym DPPC i membraną zawierającą obie formy tokoferolu. Można więc powiedzieć, że tylko obecność naturalnego izomeru tokoferolu (D- α -tokoferolu) zmienia strukturę membrany w fazie żelu.



Rys. 2. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC z dodatkiem DL- α -tokoferolu w temp. 20°C.

Fig. 2. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the PC membrane with DL- α -tocopherol at a room temperature (20°C).

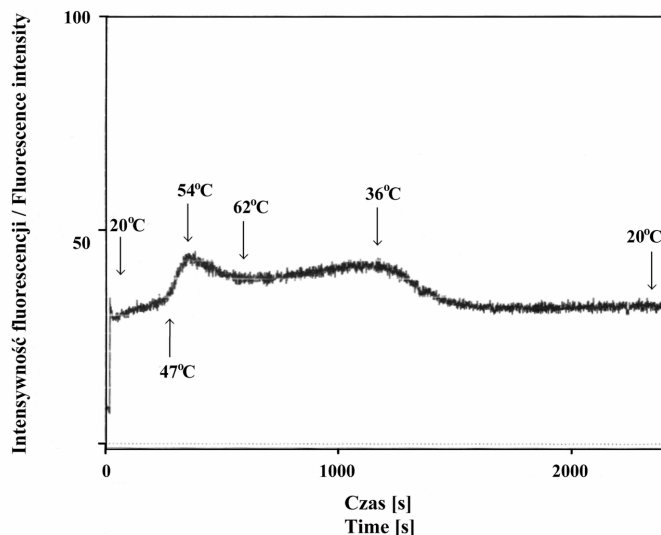


Rys. 3. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC z dodatkiem D- α -tokoferolu w temp. 20°C.

Fig. 3. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane with the added D- α -tocopherol at a room temperature (20°C).

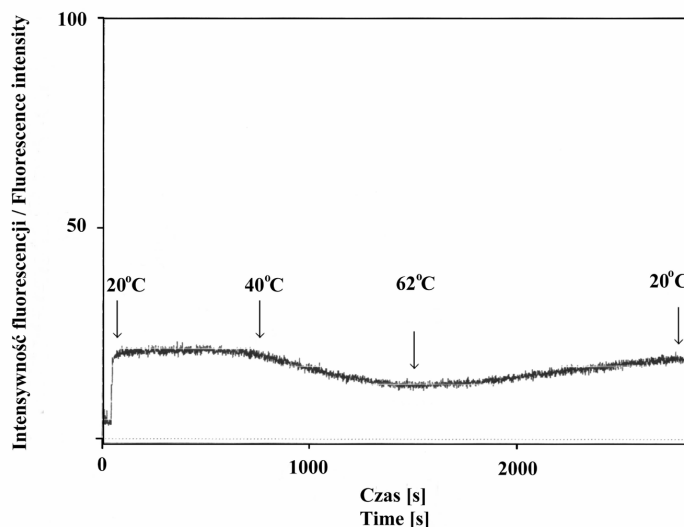
Pomiary temperaturowe

Na podstawie pomiarów szybkości dyfuzji ANS do membrany lipidowej w zależności od temperatury stwierdzono istotne różnice przepuszczalności pomiędzy membraną DPPC i zawierającą α -tokoferol. Na rys. 4a przedstawiono zmiany intensywności emisji fluorescencji sondy ANS podczas procesu ogrzewania i ochładzania membrany lipidowej. W zakresie temp. od 20 do 47°C następował powolny wzrost intensywności fluorescencji, wynikający ze wzrostu przepuszczalności membrany. Przepuszczalność membrany DPPC gwałtownie rosła powyżej temp. 47°C i osiągała maksimum w temp. 54°C. Zjawisko to jest prawdopodobnie związane z głównym przejściem krystalicznym membrany, które występuje w temp. 41°C. Membrana przechodzi wtedy z uporządkowanego stanu sztywnego (fazy żelowej) do stanu płynnego (fazy ciekłokrystalicznej), charakteryzującego się mniejszym uporządkowaniem łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych w cząsteczce fosfolipidu. Część łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych przechodzi z konformacji trans do gauche [6]. W omawianym przypadku zmiana ta mogła doprowadzić do wnikięcia większej ilości ANS na skutek „rozluźnienia” cząsteczek fosfolipidów w dwuwarstwie. Dalsze ogrzewanie, w zakresie temp. 54–62°C spowodowało obniżenie intensywności fluorescencji o około 25% w stosunku do fluorescencji maksymalnej, co związane jest z obniżaniem się intensywności fluorescencji układu na skutek utraty energii w wyższych temperaturach. W analogicznym doświadczeniu wykonanym na membranie lecytynowej (PC), (rys. 4b) w fazie ciekłokrystalicznej zaobserwowano spadek intensywności emisji układu powyżej temp. 40°C, z minimum w temp. 62°C oraz wzrost intensywności przy ochładzaniu układu.



Rys. 4a. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC w zróżnicowanej temperaturze. (Strzałki wskazują temperaturę pomiaru).

Fig. 4a. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane at different temperatures (the arrows indicate the temperature of the measurement).



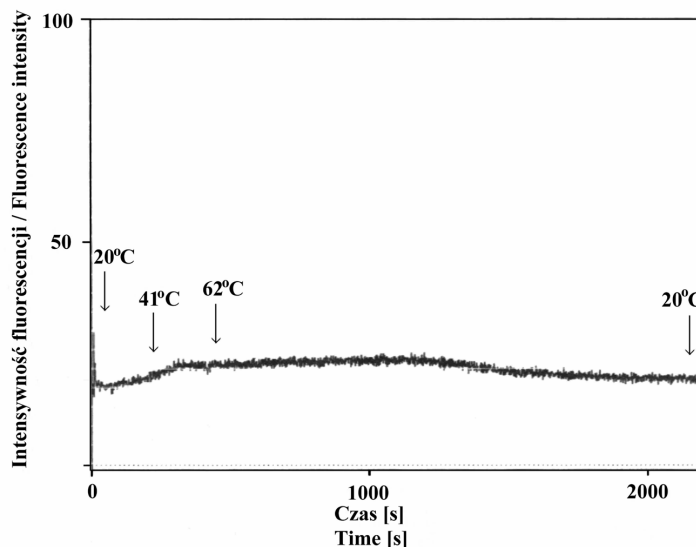
Rys. 4b. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie PC w zróżnicowanej temperaturze. (Strzałki wskazują temperaturę pomiaru).

Fig. 4b. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the PC membrane at different temperatures. (Arrows indicate the temperature of measurement).

Ochładzanie roztworu zawierającego liposomy DPPC powodowało z kolei wzrost intensywności fluorescencji z maksimum w temp. około 36°C. Zmniejszenie intensywności fluorescencji poniżej tej temperatury następowało w wyniku ewakuacji ANS z wnętrza membrany, na skutek głównego przejścia krystalicznego. Wolniejsze tempo spadku intensywności fluorescencji przy ochładzaniu układu (w porównaniu z ogrzewaniem) spowodowane było dłuższym okresem trwania procesu ochładzania. Natężenie fluorescencji w temp. 20°C po ochłodzeniu układu było o około 9% większe

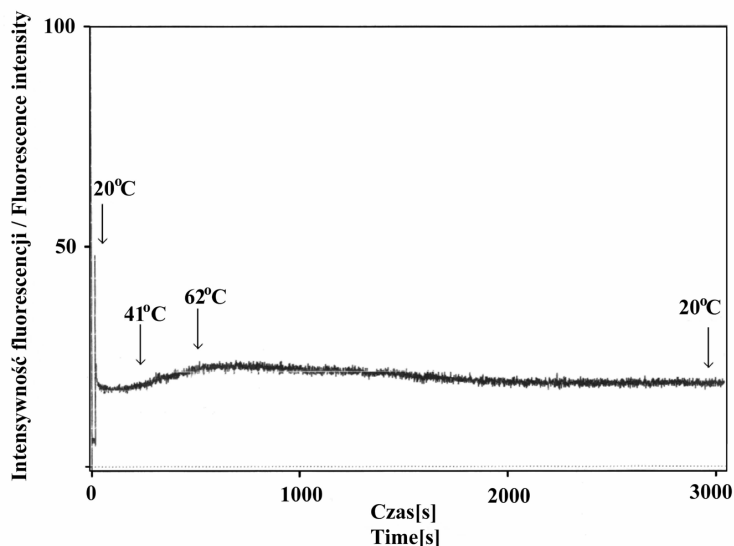
od natężenie początkowego w tej samej temperaturze (przed rozpoczęciem ogrzewania układu), co świadczy o tym, że część sondy ANS, która dostała się do membrany na skutek wzrostu temperatury, nie opuściła jej wnętrza.

Pomiary szybkości dyfuzji barwnika do membrany DPPC zawierającej D i DL- α -tokoferol w zależności od temperatury (rys. 5, 6) wykazały, że maksymalny wzrost fluorescencji, związany ze wzrostem przepuszczalności błony na skutek zmiany temperatury układu, był o około 60% mniejszy niż ma to miejsce w przypadku samego DPPC. W obu przypadkach nie zanotowano charakterystycznego dla samego DPPC wyraźnego wzrostu przepuszczalności związanego z głównym przejściem krystalicznym. Zmiany przepuszczalności charakteryzowały się łagodniejszym przebiegiem niż w przypadku samej membrany DPPC, obserwowano jednak wzrost intensywności emisji fluorescencji dodatnio skorelowany ze wzrostem temperatury układu, również spadek temperatury obniżał fluorescencję ANS.



Rys. 5. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC z dodatkiem D- α -tokoferolu w zróżnicowanej temperaturze. (Strzałki wskazują temperaturę pomiaru).

Fig. 5. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane with D- α -tocopherol at different temperatures (the arrows indicate the temperature of measurement).



Rys. 6. Zmiany intensywności emisji fluorescencji ANS w membranie DPPC z dodatkiem DL- α -tokoferolu w zróżnicowanej temperaturze. (Strzałki wskazują temperaturę pomiaru).

Fig. 6. Changes in the emission intensity of ANS fluorescence in the DPPC membrane with DL- α -tocopherol at different temperatures. (The arrows indicate the temperature of measurement).

Wzrost intensywności fluorescencji w temp. 54–62°C, a więc w zakresie temperatur, w którym obserwowano spadek intensywności emisji fluorescencji układu ANS – DPPC oraz brak wyraźnego maksimum emisji może świadczyć o tym, że α -tokoferol nie tyle uniemożliwia zmianę konformacji reszt kwasów tłuszczowych fosfolipidu, co raczej przez swoją obecność w membranie hamuje wnikanie sondy. Końcowa intensywność fluorescencji w temp. 20°C była równa intensywności fluorescencji układu w tej samej temperaturze przed rozpoczęciem ogrzewania, co świadczy o tym, że cały barwnik, który wniknął do membrany, w wyniku głównego przejścia krystalicznego został usunięty z jej wnętrza. Obecność α -tokoferolu zmniejsza przepuszczalność membrany w fazie ciekłokrystalicznej.

Wnioski

1. Proces wnikania sondy ANS do membrany DPPC w fazie żelowej zachodzi na drodze natychmiastowej absorpcji (w ciągu od jednej do kilku sekund) z pominięciem fazy adsorpcji. Dodatek α -tokoferolu do membrany nie zmienia szybkości wnikania sondy, jedynie w przypadku D- α -tokoferolu ilość zaabsorbowanej sondy wynosi 25% wartości zanotowanej w przypadku samego DPPC i DPPC z DL- α -tokoferolem.
2. W membranie DPPC zaobserwowano wyraźny wzrost jej przepuszczalności związany z głównym przejściem krystalicznym. W przypadku membrany DPPC z D i DL- α -tokoferolem stwierdzono, że maksymalny wzrost przepuszczalności błony w wyniku zmiany fazy membrany jest o około 60% mniejszy niż ma to

miejsce w samym DPPC, a zmiany przepuszczalności obserwowane w temperaturze głównego przejścia krystalicznego charakteryzują się łagodniejszym przebiegiem. α -Tokoferol hamuje wnikanie sondy ANS do membrany w fazie ciekłokrystalicznej. Nie zaobserwowano istotnych różnic w przepuszczalności membrany w obecności D i DL- α -tokoferolu.

Praca została wykonana w ramach grantu KBN 2 P06T 01627.

Literatura

- [1] Devaraj S., Adams-Huet B., Fuller C.J., Jialal I.: Dose-response comparison of RRR-alpha-tocopherol and all-racemic alpha tocopherol on LDL oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1997, **17**, 2273-2279.
- [2] Dwiecki K., Sieger A., Górnaś P., Nogala-Kałużka M., Polewski K.: Oddziaływania membrany lipidowej z D- α -tokoferolem w zależności od jego stężenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (40), Supl. 37-44.
- [3] Lasic D.D.: Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**, 307-321.
- [4] Maddaiah V.T., Kumbar U.: Membrane permeability transition promoted by phosphate enhances 1-anilino-8-naphthalene sulfonate fluorescence in calcium-loaded liver mitochondria. *J. Bioenerg Biomembr.*, 1993, **25** (4), 419-27.
- [5] Ohyashiki T., Mohri T.: Fluorescence probe studies on the interaction of phlorizin with rabbit intestinal brush border membranes. *J. Biochem.*, 1983, **93** (4), 1167-1173.
- [6] Stryer L.: *Biochemia*. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa 1999.
- [7] Thiel R.J.: Natural vitamins may be superior to synthetic ones. *Medical Hypotheses*, 2000, **55** (6), 461-469.
- [8] Wang X., Quinn P.: Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 1999, **38**, 309-336.

THE IMPACT OF OPTICAL ISOMERS OF α -TOCOPHEROL ON THE PERMEABILITY OF LIPID MEMBRANE

S u m m a r y

The objective of the investigations performed was to determine the way various optical isomers of α -tocopherol affect the permeability of lipid membrane - a simple model of the cell membrane. Owing to its hydrophobic properties, α -tocopherol is easily soluble in the lipid core of cell membrane, and this phenomenon impacts the structure, stability, and other properties of the cell membrane. D- α -tocopherol is a natural form of vitamin E, which is also present in plant oils and vegetables. And the DL- α -tocopherol is a synthetic vitamin E commonly used as a food additive. Some authors claim that, despite the same chemical structure of the two forms of vitamin E, the synthetic vitamin E may have a different effect *in vivo* compared with the natural form of this vitamin. Thus, it is important to identify mechanisms of interactions ensuing among α -tocopherol, other biologically significant molecules, and cell structures on a molecular level.

In the investigations carried out, the D- α -tocopherol and mixture of D and L- α -tocopherol (α -T) were applied. The liposomes (lipid membranes) were made from the phosphatidyl choline dipalmitate (DPPC) and the L- α -phosphatidyl choline (PC) of egg yolk. A fluorescence probe method with an 8-anilino-1-

naphthalene-sulfonic acid (ANS) as a colouring dye was applied to monitor structural changes occurring in the lipid membrane.

The process of ANS probe penetrating the DPPC membrane being in a gel phase occurred by immediate absorption (it lasted between one to several seconds), with no adsorption phase present. When α -tocopherol was added to the membrane, the penetration rate of the probe did not change. The D- α -tocopherol was the only case when the amount of absorbed ANS was 25% of the value corresponding with the pure DPPC membrane and with DPPC with DL- α -tocopherol.

In the DPPC membrane, a significant increase in the membrane permeability was stated. It was attributed to the crystalline transition. In the case of DPPC with D- α - and DL- α -tocopherol added, it was noted that the maximal increase in the membrane permeability due to the change in the membrane phase was about 60% lower than in the case of DPPC alone, and the changes in the membrane permeability as observed in the temperature of the main crystalline transition, were characterized by a milder course. α -tocopherol inhibited the process of the ANS probe penetrating the membrane in a liquid crystalline phase. No significant differences were found in the membrane permeability in the presence of D and DL- α -tocopherol.

Key words: lipid membrane, membrane permeability, α -tocopherol, fluorescence, ANS 