

УДК 591.16

## СТАДИЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОВАЯЗКОСТИ МЕМБРАН ЗАРОДЫШЕЙ *Misgurnus fossilis*<sup>1</sup>

© 2009 г. А. Р. Исуев

Дагестанский государственный университет

367001 Махачкала, ул. М. Гаджиева, д. 43а

E-mail: rusna02@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.08 г.

Окончательный вариант получен 04.02.09 г.

С помощью метода флуоресцентной спектроскопии изучено состояние собственной и зондовой флуоресценции, а также микровязкость мембран икры и зародышей вьюна *Misgurnus fossilis*. Обнаружено, что латеральная подвижность зонда (пирена) эмбрионов вьюна увеличивалась от стадии ранней до поздней бластулы, что указывает на уменьшение микровязкости плазматической мембраны. В дальнейшем на стадии средней гастролы микровязкость практически не изменяется. Учитывая, что действие на эмбрионы различных температур сопровождается изменением квантового выхода флуоресценции и степени эксимеризации пирена, можно получить информацию как о температурно-индуцируемых структурных изменениях, так и о изменениях микровязкости мембран эмбрионов. Предлагается использовать собственную и зондовую флуоресценцию мембран эмбрионов для изучения механизмов морфогенеза.

**Ключевые слова:** морфогенез, эмбриогенез, рыбы, флуоресценция, зонд, пирен, микровязкость, мембраны, эксимеризация.

Интерес к биологическому морфогенезу, т.е. к проблеме возникновения новых форм и структур в развитии организмов, в последние годы заметно возрос. В настоящее время стало ясно, что любой сколько-нибудь содержательный морфогенез должен представлять собой многоуровневый процесс, нижний уровень которого представлен динамическими переменными с наименьшими характеристиками времени (Уоддингтон, 1947; Майр, 1974; Светлов, 1978; Николс, Пригожин, 1979; Белоусов, 1980, 1987; Кринский, Жаботинский, 1981; Васильев и др., 1982; Pate, Othmer, 1984). Быстрые клеточные реакции вызываются в основном перестройками компонентов цитоскелета и плазматической мембраны, а также связанного с мембраной внеклеточного матрикса (Белоусов, 1987). Все эти процессы тесно переплетены между собой. Их наличие показывает, что в живых системах на молекулярном уровне понятие “структуры” нельзя противопоставлять понятию “процесса”. Единственно правильным было бы говорить о структурированных процессах, протекающих в молекулярных комплексах различной степени устойчивости (Гурвич, 1944). В настоящее время можно с достаточной уверенностью сказать, что цитоскелетно-мембранные преобразования (ЦСМП) –

универсальные динамические переменные практически всех морфогенезов. Центральное место в ЦСМП занимают процессы так называемой самосборки, т.е. неферментативного образования надмолекулярных белково-липидных и смешанных структур различного порядка сложности. В регуляции различных этапов ЦСМП определенную роль играют физические процессы, в частности изменение микровязкости мембраны.

Исследование физико-химических характеристик мембран с помощью обычных, классических, гистологических методов, сопровождаемое разрушением молекулярных комплексов, клеток и тканей, их фракционированием и другими повреждающими воздействиями, неизбежно ведет к утрате ценной информации и к искажению результата.

В связи с этим значительный теоретический и практический интерес представляет изучение процессов морфогенеза с помощью спектральных методов, позволяющих сохранить интактность клеток. В первую очередь наше внимание привлекли методы флуоресценции непосредственно с поверхностного слоя зародышей, поскольку в этом случае снимаются ограничения, возникающие обычно при флуоресцентном анализе суспензии клеток, обусловленные светорас-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ-Юг-а, проект № 06-05-96609).

сеиванием, поглощением и реабсорбцией (Конев и др., 1970).

В настоящем исследовании мы предприняли попытку исследовать изменение микровязкости плазматической мембраны икры и зародышей вьюна.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

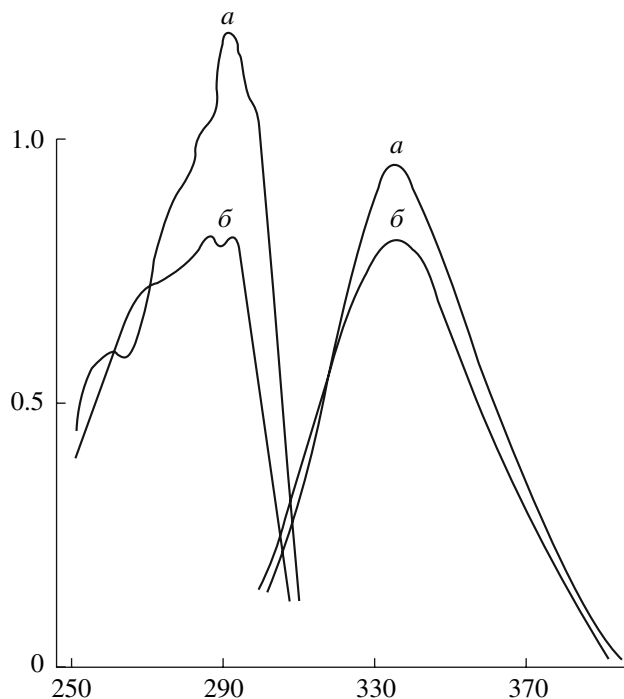
Опыты проводили на зрелой икре и зародышах вьюна на стадиях дробления и гаструляции (Костомарова, 1970).

Оценку относительной микровязкости мембран бластомеров вьюна осуществляли методом латеральной диффузии гидрофобного зонда пирена (Владимиров, Добрецов, 1980; Лакович, 1986).

Анализ латеральной подвижности мембраны для поступательной диффузии зонда, основанной на явлении эксимеризации пирена, проводили, измеряя интенсивность флуоресценции эксимерной формы  $F$  пирена по отношению к интенсивности мономера  $F_m$ . Критерием эксимеризации является линейная зависимость между изменениями интенсивности флуоресценции  $F_m$  и  $F$  пирена при увеличении его концентрации.

Полярность липидной фазы мембран зародыша исследовали на основании анализа тонкой структуры спектра флуоресценции пирена, а также по отношению интенсивностей в максимумах спектра флуоресценции зонда при 445 и 385 нм. Измерение флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Jasco FR-550 ("Jasco", Япония) путем нанесения 20–40 икринок на внутреннюю поверхность треугольной кварцевой кюветы размером  $1.5 \times 3$  см. Давали стечь воде на дно кюветы, после чего ее закрывали, чтобы предотвратить испарение. В течение опыта икра оставалась на внутренней стенке кюветы в виде сплошного слоя. Флуоресценцию измеряли при спектральном разрешении 3 (возбуждение) и 5 нм (испускание). Для измерения флуоресценции пирена предварительно при перемешивании вводили этаноловый раствор зонда в кювету, где находилось необходимое для измерения количество зародышей в 2 мл воды со скоростью не выше 1 мкМ/мин. Конечная концентрация этанола не превышала 0.05%. После встраивания зонда ( $\approx 15$  мин) зародыши отделяли от воды, помещали в кювету и проводили измерения. После снятия соответствующих флуоресцентных показателей в течение 5–10 мин зародыши вьюна оставались жизнеспособными. Концентрация зонда соответствовала приблизительно 3 мкМ на 40 зародышей. Асимметрию спектров рассчитывали по формуле:

$$\rho = \left( v_{+\frac{1}{2}} - v_0 \right) / \left( v_0 - v_{-\frac{1}{2}} \right),$$



**Рис. 1.** Типичные спектры возбуждения (слева) и флуоресценции (справа) яйцеклеток (а) и зародышей (б) вьюна.

Здесь и далее: по оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – интенсивность флуоресценции, отн. ед.

где  $v_{+\frac{1}{2}}$  и  $v_{-\frac{1}{2}}$  – положения точек спектра, когда амплитуда равна половине максимальной (Siano, Metzler, 1969).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента и непараметрического  $T$ -критерия Вилкоксона.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из рис. 1, спектры испускания флуоресценции икры имеют характерный для белков пик, равный 334 нм, а спектры возбуждения сильно структурированы, проявляя четкий пик при 293 нм. На стадии дробления зародыша интенсивность флуоресценции и степень структурирования спектров возбуждения снижаются по сравнению с неоплодотворенной зрелой икрой. Если иметь в виду, что интенсивность собственной, а не зондовой флуоресценции зависит от полярности окружения, например от воды, которая является тушителем флуоресценции (Бурштейн, 1977), то уменьшение квантового выхода флуоресценции после оплодотворения икры, по-видимому, вызвано контактом зародышей с водой.

При этом наблюдается увеличение экспонирования остатков белковых триптофанов в по-

**Таблица 1.** Характеристика спектров флуоресценции белков икры и зародышей вьюна

Вид спектра при температуре, °С	$H$ , нм	$\rho$ , нм <sup>2</sup>	$h$	$\lambda_{\max}$ , нм
Зрелая икра				
Испускание	54	1.00		336
Возбуждение	54	0.30		285
Стадия дробления				
Испускание				
19–20	56	1.31	1.01	334
30	54	1.50	0.69	335
19–20	54	1.50	0.75	334
35	54	1.63	0.50	337
10	59	1.40	1.15	334
Возбуждение				
19–20	54			285
30	47	0.48		284
19–20	49	0.44		284
35	46.5	0.50		286
10	53	0.40		285

Примечания:  $H$  – полуширина,  $\rho$  – степень асимметрии,  $h$  – относительный квантовый выход флуоресценции.

**Таблица 2.** Характеристики спектров флуоресценции пирена, встроенного в липиды зародышей вьюна при дроблении ( $\sigma = 0.03$ )

Температура, °С	$I_{III}$	$I_{2II}$	$I_{EI}$
10–20	0.97	1.04	0.31
35	1.03	1.10	0.44
50	1.05	1.10	0.54

Примечания:  $I_{EI}$  – степень эксимеризации;  $I, I_1, I_2, I_E$  – интенсивность вибронных полос при 373, 385, 393 и 470 нм соответственно.

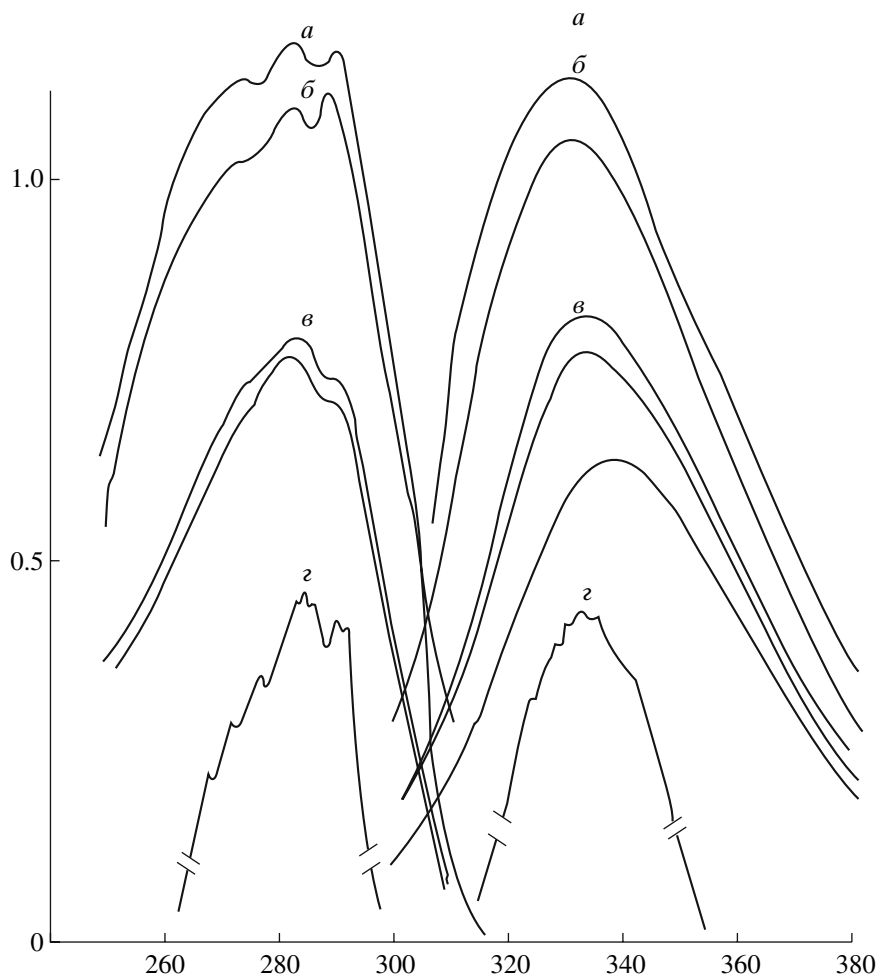
лярную среду при снижении вязкости мембраны зародыша. В свою очередь триптофановые остатки в зрелой икре, по-видимому, в значительно большей степени окружены неполярными аминокислотными остатками, нежели в период дробления. Но не исключено также, что различие в спектрах для всех стадий развития обусловлено единственно влиянием воды при дроблении и отсутствием такого влияния при отделении зародышей от воды, что подтверждается повторным усилением интенсивности квантового выхода флуоресценции и повышением структурированности спектров.

Дело в том, что воздействие воды создает полярное окружение, которое снижает уровень собственной флуоресценции зародышей. В связи с этим создается впечатление, что в мембранах икры и зародышей не происходит изменения их физических характеристик и полученный результат является артефактом. То, что это не так, показывают наши данные по анализу температурно-зависимой и зондовой флуоресценции.

Действие на зародыши различных температур сопровождается изменением квантового выхода флуоресценции и степени эксимеризации пирена, что позволяет получить информацию как о температуроиндуцируемых структурных изменениях в мембранах, так и о важнейших физических свойствах мембран зародыша (табл. 1).

При экспозиции зародышей в течение 10 мин при температуре 35°C происходит снижение относительного квантового выхода флуоресценции, увеличивается степень эксимеризации пирена, встроенного в зародыши, снижается структурированность спектров и происходит длинноволновой сдвиг максимума испускания (рис. 2; табл. 1, 2). Эти же воздействия вызывают удлинение полуширины и увеличение асимметрии спектров испускания и возбуждения флуоресценции. Уменьшение интенсивности флуоресценции с повышением температуры и увеличение степени эксимеризации пирена указывают на динамический характер тушения остатков триптофана, доступных свободному растворителю, а также на температурообусловленное снижение вязкости мембран, что может приводить к увеличению степени экспозиции мембраносвязанных белковых групп, а следовательно, к усилению тушения их флуоресценции (Бурштейн, 1977) и к уменьшению структурированности спектров (Владимиров, Добрецов, 1980). Со снижением температуры в диапазоне 10–25°C изменения интенсивности флуоресценции были необратимыми, а после инкубации зародышей при температуре 30°C в течение 10 мин интенсивность флуоресценции не восстанавливалась до исходного уровня, что указывает на необратимость происходящих при этом изменений.

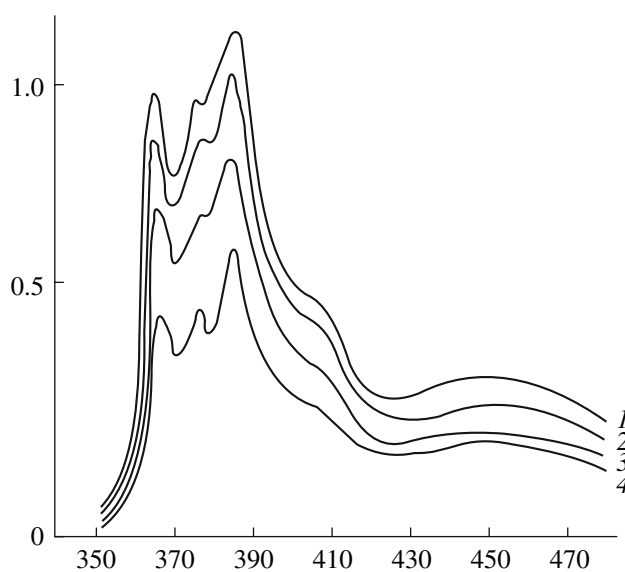
Из приведенных на рис. 3 спектров флуоресценции мономеров пирена в зрелой икре и в мембранах на стадии дробления следует, что происхо-



**Рис. 2.** Изменение спектров возбуждения (слева) и испускания (справа) флуоресценции зародышей вьюна при действии различных температур (*а* – 10, *б* – 20, *в* – 30°C) и при обезвоживании (*г*).

дит уменьшение  $F$ , что в свою очередь свидетельствует об увеличении полярности микроокружения зонда, по-видимому, в результате повышения интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Мелехова, 1976; Чернышов, Исуев, 1978). Измерение полярности в непосредственной близости от белков путем регистрации спектров флуоресценции молекул пирена, возбужденных через остатки триптофана (т.е. при 293 нм), показало такое же увеличение полярности в зрелой икре и мембранах зародышей на стадии гастрюляции, что и в липидной фазе в целом ( $F = 1.31 \pm 0.07$  и  $0.83 \pm 0.9$  соответственно).

Таким образом, коэффициент эксимеризации пирена, характеризующий текучесть липидного слоя (микровязкость мембран), достоверно превышает аналогичные параметры в икре. При этом он имеет тенденцию к повышению в течение стадии дробления, что свидетельствует о снижении микровязкости липидов, образующих микроокружение мембранных белков.



**Рис. 3.** Спектры испускания флуоресценции пирена (4.9 мкМ) в зрелой икре вьюна на стадиях: 1, 2 – дробления, 3 – гастрюляции, 4 – конца гастрюляции.

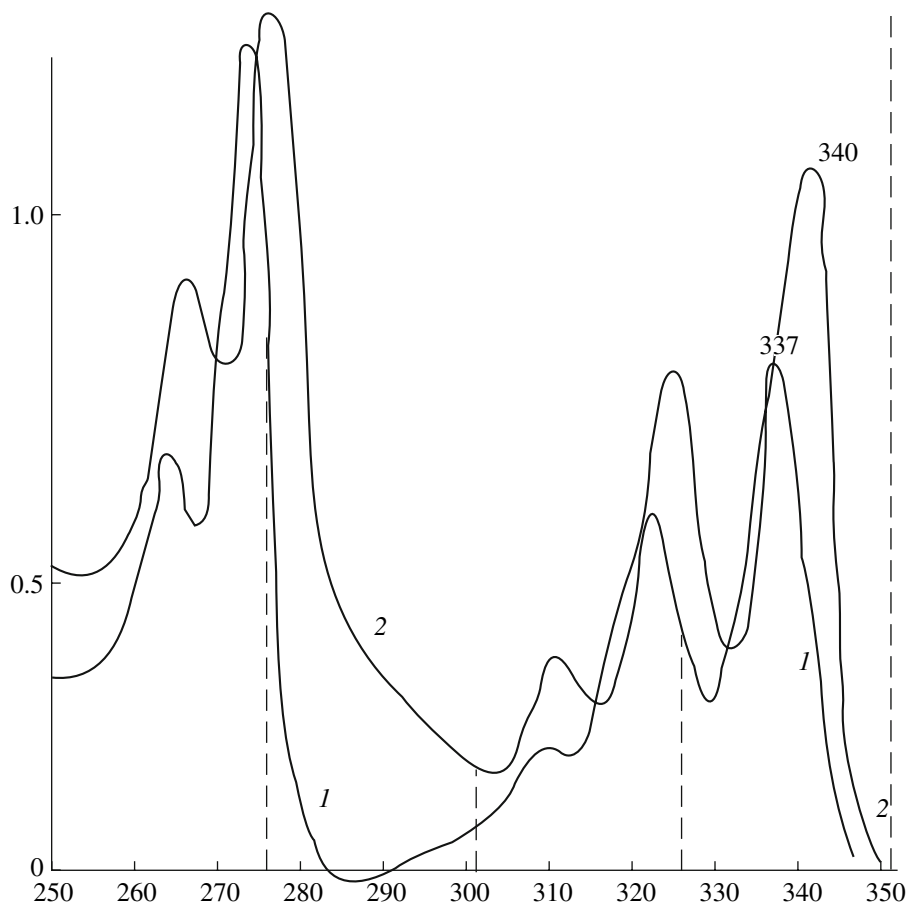


Рис. 4. Спектры возбуждения флуоресценции пирена в воде (1) и зародыше (2).

Зависимость изменения полярности мембран от уровня ПОЛ зародышей была показана экспериментально (Чернышов, Исуев, 1978), а также на модельных мембранах (Деев и др., 1989). При небольших концентрациях малонового диальдегида – конечного продукта ПОЛ, соответствующих окислению 1–2% жирнокислотных ацилов, происходит резкое изменение эксимеризации пирена  $F$ .

Таким образом, изменение температуры при прочих равных условиях уменьшает микровязкость мембранного слоя. Подвижность жирнокислотных цепей в середине бислоя возрастает, увеличивается и вероятность взаимодействия молекул пирена друг с другом. Изменение зависимости эксимеризации пирена в мембранах зародыша от температуры позволяет выяснить, каким образом изменяется их микровязкость и выявить область температур, при которой происходит фазовый переход в мембранах.

Как видно, одним из признаков структурной перестройки мембранных белков зародышей, меняющей полярность окружения остатков триптофана, является смещение спектра флуоресценции

и изменение его ширины. На полярность и микровязкость мембран и, соответственно, на изменение параметров флуоресценции белков значительное влияние оказывает перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот мембран (Мелехова, 1976; Владимиров, Добрецов, 1980; Деев и др., 1989; Болдырев, 2001).

При повышении скорости ПОЛ на стадии дробления зародыша происходит изменение окружения триптофанилов на более полярное, о чем свидетельствует уменьшение интенсивности флуоресценции и коротковолновый сдвиг максимума спектра (рис. 4). Наряду с этим увеличивается полуширина спектра флуоресценции. Такое изменение спектра на стадии дробления указывает на снижение доли триптофанилов, находящихся в более гидрофобном окружении (Бурштейн, 1977).

Полученные ранее результаты (Формаюз, 1982) показали, что в окисленных мембранах менее 20% белка находится в липидной фазе по сравнению с 86% в контрольных мембранах. Предполагается, что причина обнаруженных при ПОЛ изменений белок-липидных взаимодействий, опреде-

ляющих структуру этих комплексов, связана с увеличением гидрофильности поверхностного фосфолипидного слоя частицы вследствие накопления полярных продуктов ПОЛ.

Как было показано, в процессе дробления имеет место изменение конформации белков мембран, возможно, вследствие изменения физических свойств липидов. Согласно данным Деева с соавт. (1989), отношение максимума флуоресценции зонда при 375 и 365 нм уменьшается при увеличении полярности окружения возбужденных молекул пирена и при менее компактной упаковке фосфолипидов в мембране.

На основании проведенных нами исследований и анализа имеющихся литературных источников можно констатировать, что для исследования такого сложного процесса, как биологический морфогенез, а тем более изучения его механизмов недостаточно использования только известных гистологических и цитологических методов.

В связи с этим мы предлагаем при исследовании механизмов морфогенеза, характеризующегося непрерывностью и необратимостью процессов, каждая отдельная составляющая которого, а следовательно, и вся последовательность его временных состояний уникальна, использовать методы флуоресцентной спектроскопии.

В целом на общем фоне значительных усилий в изучении морфогенеза конкретные сведения о его механизмах еще скудны. Однако те фрагментарные данные, которые получены в нашей работе об изменении микровязкости плазматической мембраны икры и бластомеров вьюна, убедительно показывают необходимость дальнейшего расширения исследований в этой области.

О реальных связях морфогенеза с характеристиками флуоресценции пока известно очень мало. Однако очевидно, что речь идет о каких-то влияниях на флуоресцентные характеристики, происходящих от изменения микровязкости плазматической мембраны и передающихся через структуры цитоскелетно-мембранных преобразований. Самый трудный вопрос состоит в том, как общие и малоспецифические мембранные перестройки воздействуют на специфические флуоресцентные характеристики и уровень реакций перекисного окисления мембранных липидов. Данный вопрос – разновидность более общего: могут ли неспецифические свойства целой системы клеточных мембран влиять на высокоспециализированные особенности их поведения? Решение этого вопроса должно стимулировать привлечение методов флуоресцентной спектроскопии для поиска конкретных механизмов участия ЦСМП в морфогенезе тканей животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белоусов Л.В.* Введение в общую эмбриологию. М.: Изд-во МГУ, 1980. 210 с.
- Белоусов Л.В.* Биологический морфогенез. М.: Изд-во МГУ, 1987. 237 с.
- Болдырев А.А.* Матриксная функция мембран // Сорос. образоват. журн. 2001. Т. 7. № 7. С. 2–7.
- Бурштейн Э.А.* Люминесценция белковых хромофоров. М.: ВИНТИ, 1977. 213 с. (Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. Т. 7.)
- Васильев В.А., Романовский Ю.М., Чернавский Д.С.* Элементы теории диссипативных структур: связь с проблемами структурообразования // Математическая биология развития. М.: Наука, 1982. С. 82–101.
- Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
- Гурвич А.Г.* Теория биологического поля. М.: Сов. наука, 1944. 156 с.
- Деев А.И., Осис Ю.Г., Формазюк В.Е. и др.* Увеличение содержания воды в липидной фазе липопротеидов при перекисном окислении // Биофизика. 1989. Т. 28. Вып. 4. С. 629–631.
- Конев С.В., Аксенцев С.А., Черницкий Г.А.* Кооперативные переходы белков в клетке. Минск: Наука и техника, 1970. 202 с.
- Костомарова А.А.* Вьюн (*Misgurnus fossilis*) // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1970. С. 308–323.
- Кринский В.И., Жаботинский А.М.* Автоволновые структуры и перспективы их исследования // Автоволновые процессы в системах с диффузией. Горький: ИПН АН СССР, 1981. С. 6–32.
- Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
- Майр Э.* Популяция, виды и эволюция. М.: Мир, 1974. 184 с.
- Мелехова О.П.* Свободнорадикальные процессы в эмбриогенезе // Онтогенез. 1976. Т. 7. № 2. С. 131–140.
- Николс Г., Пригожин И.* Самоорганизация в неравновесных системах. М.: Мир, 1979. 512 с.
- Светлов П.Г.* Физиология (механика) развития. Т. 2. Л.: Наука, 1978. 264 с.
- Уоддингтон К.Х.* Организаторы и гены. М.: Иностран. лит-ра, 1947. 240 с.
- Формазюк В.Е., Осис Ю.Г., Деев А.И. и др.* Изменение белок-липидных взаимодействий при перекисном окислении липопротеидов сыворотки крови // Докл. АН СССР. 1982. Т. 263. № 2. С. 497–500.
- Чернышов В.И., Исупев А.Р.* О роли свободнорадикальных реакций в процессах эмбрионального развития вьюна // Вопр. ихтиологии. 1978. Т. 18. Вып. 1. С. 117–129.
- Pate E., Othmer H.G.* Application of a model for scale-invariant pattern formation in developing systems // Differentiation. 1984. V. 28. P. 1–8.
- Siano D.B., Metzler D.E.* Bend shapes of the electronic spectra of complex molecules // Chem. Phys. 1969. V. 51. № 5. P. 1856–1861.

## Stage-Specific Changes in Membrane Microviscosity in *Misgurnus fossilis* Embryos

A. R. Isuev

*Dagestan State University, Russian Academy of Sciences, ul. M. Gadzhieva 43a, Makhachkala, 367001, Russia*  
*e-mail: rusna02@mail.ru*

**Abstract**—Natural and probe fluorescence as well as membrane microviscosity was studied in eggs and embryos of *Misgurnus fossilis* by fluorescence microscopy. The lateral mobility of the probe (pyrene) increased in loach embryos from early to late blastula, which indicates a decrease in plasma membrane microviscosity. At the later stage of mid-gastrula, the microviscosity remained largely invariant. Considering that the embryo exposure to different temperatures changes the quantum yield of fluorescence and the degree of pyrene excimerization, one can gain information about both the temperature-induced structural changes and changes in membrane microviscosity in the embryos. Natural and probe fluorescence of embryonic membranes is proposed as a tool to study morphogenetic mechanisms.

*Key words:* morphogenesis, embryogenesis, fish, fluorescence, probe, pyrene, microviscosity, membrane, excimerization.