

KRZYSZTOF DWIECKI, ALEKSANDER SIEGER, PAWEŁ GÓRNAŚ,
MAŁGORZATA NOGALA-KAŁUCKA, KRZYSZTOF POLEWSKI

ODDZIAŁYWANIA MEMBRANY LIPIDOWEJ Z D- α -TOKOFEROLEM W ZALEŻNOŚCI OD JEGO STĘŻENIA

Streszczenie

Celem badań było określenie mechanizmów oddziaływania cząsteczek D- α - tokoferolu pomiędzy sobą w zależności od stężenia w rozpuszczalnikach organicznych oraz w membranie lipidowej, stanowiącej prosty model błony komórkowej. Jednym z aspektów badań była ocena wpływu zwiększonego stężenia tego homologu na strukturę membrany.

Badania polegały na pomiarach właściwości spektroskopowych (absorbancji i emisji fluorescencji) D- α - tokoferolu o różnych stężeniach w membranie lipidowej, n-heksanie i metanolu.

Wyniki pomiarów absorbancji i emisji fluorescencji w rozpuszczalnikach homogenicznych dowiodły, że wzrostowi stężenia D- α - tokoferolu towarzyszyło powstawanie dimerów w wyniku pojawienia się niekowalencyjnych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami tokoferolu, przy stężeniu powyżej 460 μ M w n- heksanie oraz 180 μ M w metanolu. Mechanizm oddziaływania D- α - tokoferolu w membranach i z membranami jest inny niż w rozpuszczalnikach homogenicznych. Stwierdzono, że D- α - tokoferol obecny w membranie lipidowej wywierał wpływ na jej strukturę. Monomery D- α - tokoferolu ulegały wbudowaniu w membranę, a przekroczenie granicznych stężeń tej substancji w błonie lipidowej (140 μ M przy stężeniu membrany 0,2 mg/cm³ oraz 420 μ M w przypadku membrany o stężeniu 2 mg/cm³) powodowało zaburzenie lamelarnej struktury dwuwarstwy oraz pojawienie się konglomeratów wiążących tokoferol i usuwających go z wodnej dyspersji. Wykazano również, że dzięki wygaszaniu fluorescencji za pomocą akrylamidu, D- α - tokoferol łącznie z częścią chromanolową był całkowicie ulokowany w fazie lipidowej.

Słowa kluczowe: membrana lipidowa, D- α - tokoferol, fluorescencja, absorbancja.

Wprowadzenie

D- α - tokoferol (D- α -T) jest jednym z czterech homologów tokoferolu o najwyższej aktywności witaminy E, a także najbardziej znanym naturalnym przeciwutleniaczem. Bogatym źródłem tej rozpuszczalnej w tłuszczach witaminy są oleje roślinne (zwłaszcza tłoczone na zimno) oraz warzywa zielone, np. sałata. Syntetyczny D- α - tokoferol używany jest w przemyśle spożywczym jako

Mgr inż. K. Dwiecki, mgr inż. P. Górnaś, dr hab. K. Polewski, prof. AR, Katedra Fizyki, Akademia Rolnicza, ul. Wojska Polskiego 38/42, 60-627 Poznań, mgr inż. A. Sieger, dr hab. M. Nogala-Kałucka prof. AR, Katedra Biochemii i Analizy Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-627 Poznań

przeciwutleniacz i substancja wzbogacająca takie produkty, jak: bezwodny tłuszcz mleczny, margaryna, smalec, pieczywo cukiernicze, odżywki dla niemowląt i dietetyczne, płatki śniadaniowe i wiele innych. Dodatkowym źródłem D- α - tokoferolu dla organizmu może być suplementacja diety preparatami witaminowymi [6]. W organizmie człowieka D- α - tokoferol, ze względu na swą hydrofobowość, występuje między innymi w błonach komórkowych, pełniąc rolę przeciwutleniacza. W związku z tym pojawia się pytanie, w jaki sposób zwiększona ilość witaminy E oddziałuje ze składnikami membrany i jaki jest jej wpływ na strukturę samej membrany?

Hydrofobowy charakter D- α - tokoferolu ułatwia jego wnikanie w membranę, gdzie może oddziaływać z jej składnikami. Okazało się, że oddziaływania pomiędzy tokoferolem a kwasami tłuszczowymi, będącymi składnikami membrany, zwiększają stabilność membran. Z drugiej strony wiadomo, że D- α - tokoferol zmniejsza płynność membrany i obniża temperaturę głównego przejścia krystalicznego [4, 8]. Powyższe zależności obserwowano przy stężeniach tokoferolu do 10 mmol%. Można więc oczekiwać, że zwiększone ilości D- α - tokoferolu w membranie i jej otoczeniu będą prowadzić do zmian strukturalnych w samej membranie oraz modyfikacji istniejących oddziaływań.

Celem badań było określenie mechanizmów oddziaływania cząsteczek D- α - tokoferolu pomiędzy sobą w zależności od stężenia w rozpuszczalnikach organicznych oraz w membranie lipidowej, stanowiącej prosty model błony komórkowej. Jednym z aspektów badań była ocena wpływu zwiększonego stężenia tego homologu na strukturę membrany.

Materiał i metody badań

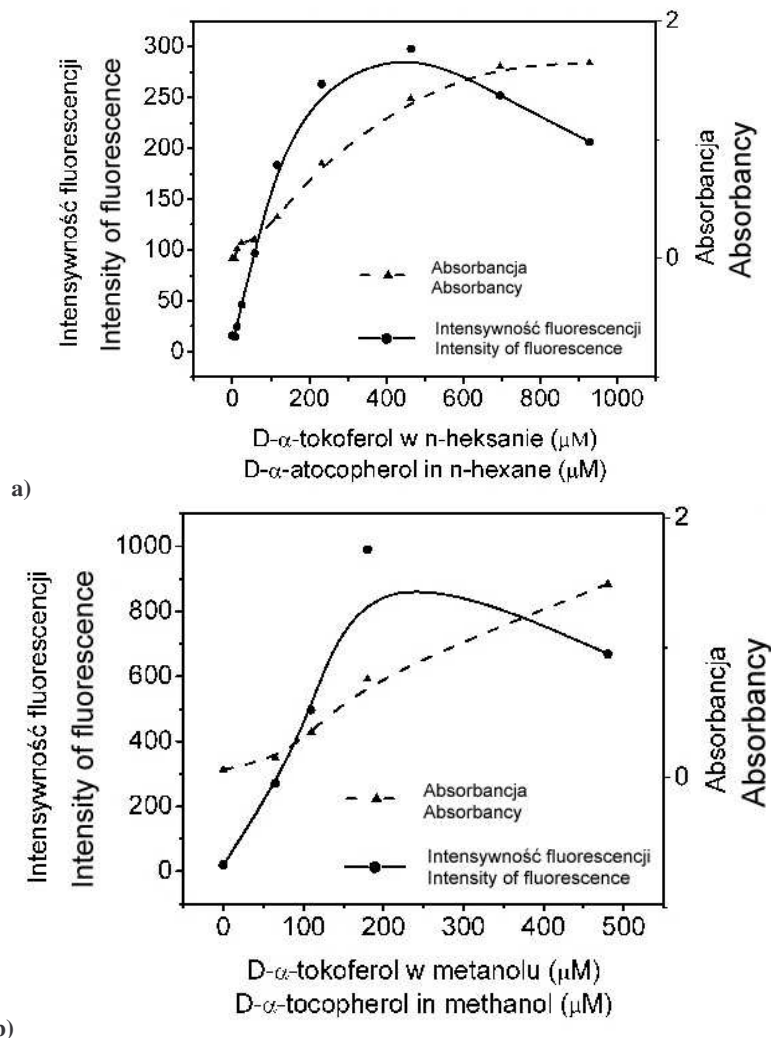
W badaniach zastosowano standard D- α - tokoferolu, firmy Calbiochem (USA) oraz L- α -fosfatydylocholinę (lecytynę) z żółtka jaja, firmy Sigma Aldrich (Niemcy), o czystości 99%. Wodne zawiesiny membran przygotowywano w następujący sposób: do 2 cm³ chloroformowego roztworu L- α -fosfatydylocholiny (PC) o stężeniu 0,2 mg/cm³ dodawano 2 cm³ D- α - tokoferolu (D- α -T), rozpuszczonego w n-heksanie, o stężeniu: 18, 72, 144, 290, 1160 i 2320 μ M, uzyskując w ten sposób mieszaniny w których stężenie D- α -T wynosiło odpowiednio: 9, 36, 72, 145, 580 i 1160 μ M. Przygotowano również zawiesiny membran, w których stężenie PC było 10 razy większe. W tym celu do 2 cm³ chloroformowego roztworu PC o stężeniu 2 mg/cm³ dodano 2 cm³ D- α -T, rozpuszczonego w n-heksanie, o stężeniu: 12, 58, 116, 232, 464, 928 i 1856 μ M, uzyskując mieszaniny w których stężenie D- α -T wynosiło odpowiednio: 6, 29, 58, 116, 232, 464 i 928 μ M. Otrzymane mieszaniny odparowano w celu wytworzenia cienkiej warstwy filmu lipidowego. Powstałe filmy uwodniono poprzez intensywne ich mieszanie w wodzie bidestylowanej (10 cm³), w temp. powyżej głównego przejścia krystalicznego (51°C), przez 20 min.

Pomiarów widm emisji fluorescencji dokonano za pomocą spektrofluorymetru RF 5001 PC firmy Shimadzu, przy długości fali wzbudzenia równej 295 nm. Do pomiarów widm absorpcji użyto spektrofotometru Top Sensor System firmy Ocean Optics (Holandia). Wszystkie pomiary wykonywano w temp. 22°C, a więc w fazie żelowej membrany lipidowej, bezpośrednio po przygotowaniu próbek. W celu zbadania wpływu środowiska dielektrycznego na właściwości D- α - tokoferolu zmierzono jego widma fluorescencji w rozpuszczalnikach organicznych: n-heksanie i metanolu o różnych stałych dielektrycznych. Wykorzystano zjawisko endogennej fluorescencji monomeru tokoferolu z maksimum emisji przy długości fali $\lambda = 325$ nm oraz fakt, że formy dimerów czy też utlenione monomery takiej fluorescencji nie wykazują.

Wyniki i dyskusja

Absorpcja i fluorescencja

Na rys. 1a i 1b przedstawiono zmiany natężenia maksimum emisji oraz maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 295$ nm w n-heksanie oraz metanolu w zależności od stężenia α -tokoferolu. Początkowo wzrost stężenia tokoferolu w n-heksanie i metanolu prowadził do liniowego wzrostu emisji i absorpcji. Dalsze zwiększanie stężenia tokoferolu powodowało, że zależność stawała się nieliniowa, a następnie natężenie emisji zaczęło się zmniejszać. Zakres stężenia tokoferolu, przy którym zależność ta była liniowa, był różny w zależności od rozpuszczalnika. W n-heksanie wynosił 0–460 μ M, podczas gdy w metanolu było to 0–180 μ M. Krzywe miały podobny kształt bez względu na rodzaj rozpuszczalnika, w którym rozpuszczony był D- α -T, co sugeruje ten sam mechanizm obserwowanego zjawiska. Wzrost absorpcji przy $\lambda = 295$ nm jest liniowy ze wzrostem stężenia tokoferolu oraz jest kolinearny z liniowym wzrostem fluorescencji. Dopiero po osiągnięciu stężenia 460 μ M w n-heksanie oraz 180 μ M w metanolu zależność ta miała charakter nasyceniowy. Obserwowana przy wyższych stężeniach tokoferolu stała wartość absorpcji z jednoczesnym wygaszaniem fluorescencji wskazuje na tworzenie się asocjatów tokoferoli, prawdopodobnie dimerów. Podczas wygaszania fluorescencji nie obserwowano ani zmiany położenia maksimum emisji, ani nie pojawiało się nowe pasmo emisji, można więc powiedzieć, że zjawisko to było związane z pojawieniem się niekowalencyjnych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami tokoferolu. Emisja obserwowana przy $\lambda = 325$ nm pochodziła z monomeru tokoferolu i po przekroczeniu określonego stężenia następowało jej wygaszanie, co powinno powodować zmniejszanie się absorpcji monomeru. Sugeruje się więc, że stała wartość



Rys. 1. Zmiany maksimum widm absorpcji i fluorescencji D- α -tokoferolu w: a) n-heksanie; b) metanolu.

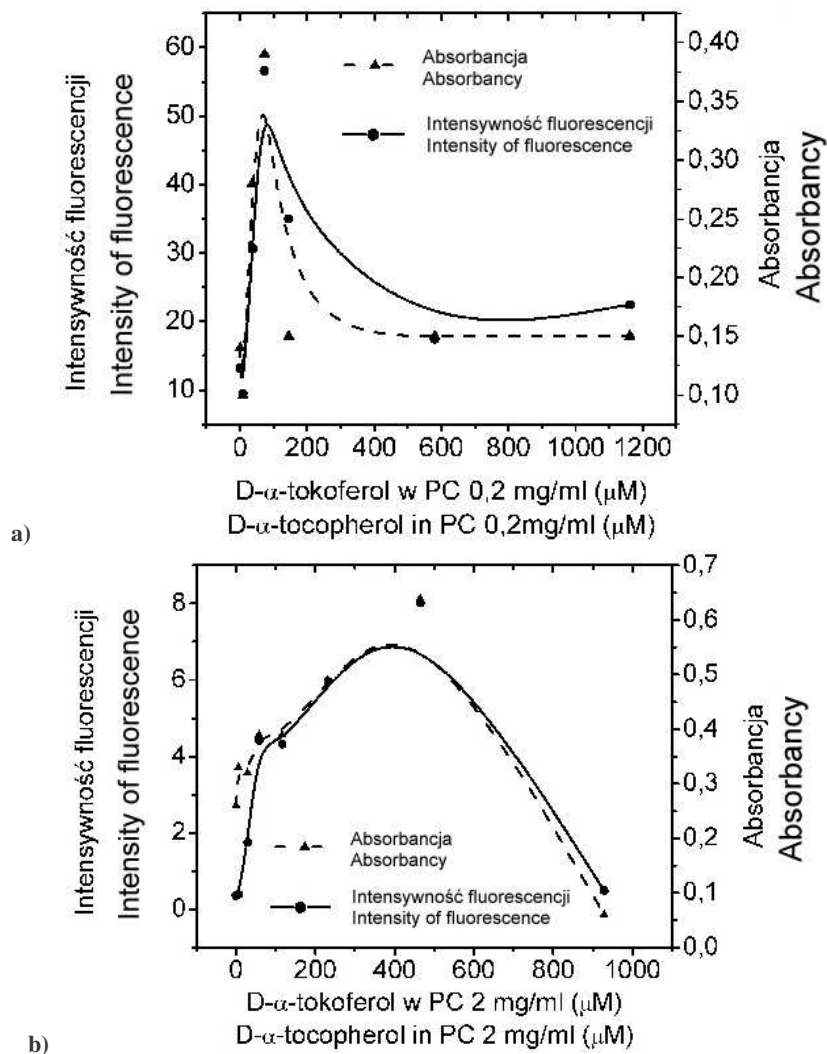
Fig. 1. Changes in the maximum values of absorbance and fluorescence spectra of D- α -tocopherol in: a) n-hexane; b) methanol.

absorbancji wynikała z faktu, że powstające asocjaty miały widma absorpcji w tym samym zakresie spektralnym. To powodowało, że zmierzona absorbancja była sumą pochodzącą od formy monomeru i dimeru. Wiadomo, że hydrofobowe molekuly w rozpuszczalnikach o niskiej stałej dielektrycznej mają tendencję do tworzenia dimerów lub asocjatów, co z kolei może zmieniać ich właściwości spektralne, np. fluorescencję. W n-heksanie w miarę wzrostu stężenia tokoferolu oddziaływania pomiędzy jego

cząsteczkami zwiększają się i po przekroczeniu określonego stężenia stają się silniejsze od oddziaływań pomiędzy tokoferolem a n-heksanem. Prowadzi to do powstawania asocjatów tokoferolu i związane jest z wygaszaniem fluorescencji pochodzącej z monomeru. Metanol, jako rozpuszczalnik protyczny, poprzez wiązania wodorowe tworzy usieciowaną strukturę rozpuszczalnika, co powoduje, że hydrofobowe molekuly są zmuszane do tworzenia asocjatów już przy mniejszych stężeniach niż w n-heksanie. Prowadzi to również do wygaszania fluorescencji pochodzącej z monomeru tokoferolu.

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że zarówno otoczenie dielektryczne, jak i forma tokoferolu miały wpływ na jego właściwości spektralne. Dokładna struktura powstających asocjatów nie jest jeszcze znana.

Podobne pomiary zależności zmian natężenia maksimum fluorescencji i absorbancji od stężenia tokoferolu przeprowadzono w membranie lipidowej PC o stężeniach 0,2 i 2 mg/cm³. Wyniki przedstawiono na rys. 2a i 2b. W przypadku obydwu stężeń membrany wzrost natężenia fluorescencji oraz absorbancji był dodatnio skorelowany ze wzrostem stężenia tokoferolu w membranie PC, co świadczy o wbudowywaniu się monomerów tokoferolu w błonę lipidową. Przy mniejszym stężeniu membrany wynoszącym 0,2 mg/cm³ liniowy wzrost fluorescencji i absorbancji osiągnął maksimum przy stężeniu 140 μ M tokoferolu. Dalsze zwiększanie stężenia D- α -T prowadziło do gwałtownego spadku fluorescencji i absorbancji do poziomu 20% ich wartości maksymalnych i dalej pozostawało na tym poziomie. Przy stężeniu membrany 2 mg/cm³ stwierdzono, że wzrost fluorescencji w zależności od stężenia składał się z dwóch prostoliniowych odcinków. Jeden o nachyleniu podobnym jak w przypadku membrany 0,2 mg/cm³ i kończył się przy stężeniu ok. 150 μ M. Od tego stężenia rozpoczynała się druga prosta o mniejszym nachyleniu, która osiągała maksimum przy stężeniu tokoferolu 420 μ M. Dalsze zwiększanie stężenia tokoferolu prowadziło do zmniejszania fluorescencji i absorbancji. Takie zachowanie sugeruje, że mechanizm oddziaływania tokoferolu w membranach i z membranami jest inny niż obserwowany w rozpuszczalnikach homogenicznych. Równoczesny spadek fluorescencji i absorbancji wskazuje, że w membranie w obecności określonego stężenia tokoferolu zachodziły przemiany fazowe prowadzące do powstania nowych form. Mogła to być zmiana fazy z lamelarnej na heksagonalną II [1]. Powstające konglomeraty typu: odwrotne micelle wiązały dostępny tokoferol i usuwały go z wodnej dyspersji. Obserwowana w przypadku większego stężenia membrany liniowa zależność natężenia fluorescencji o mniejszym nachyleniu mogła wskazywać na to, że tokoferol wbudowany był w wewnętrzne warstwy wielowarstwowego liposomu, przez co natężenie jego fluorescencji było częściowo ekranowane, na co wskazywały mniejsze zmiany natężenia emisji ze wzrostem stężenia [2, 3, 5, 7].



Rys. 2. Zmiany maksimum widm absorbancji i fluorescencji D- α -tokoferolu w wodnej zawieszynie membrany lipidowej o stężeniu: a) 0,2 mg/cm³ b) 2 mg/cm³.

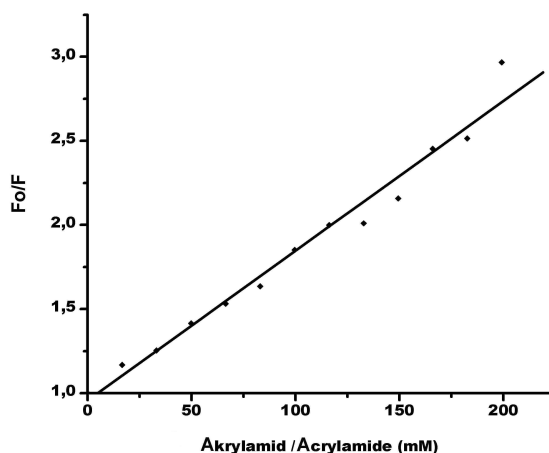
Fig. 2. Changes in the maximum values of absorbance and fluorescence spectra of D- α -tocopherol in aqueous lipid dispersion at concentration: a) 0.2 mg/cm³; b) 2 mg/cm³.

Wygaszanie fluorescencji

W celu określenia lokalizacji tokoferolu dodanego do membrany lipidowej przeprowadzono pomiary wygaszania jego fluorescencji. Użyto jodku potasu jako wygaszacza fluorescencji w fazie wodnej oraz akrylamidu jako wygaszacza fluorescencji w fazie lipidowej. Wyniki pomiarów wygaszania fluorescencji tokoferolu przez akrylamid, przedstawiono na rys. 3. Jodek potasu nie wpływał na natężenie fluorescencji. Świadczy to o tym, że tokoferol był całkowicie ulokowany w fazie

lipidowej łącznie z częścią chromanolową, a oddziaływanie pomiędzy tokoferolem a akrylamidem prowadziło do zmniejszenia fluorescencji tokoferolu [3].

Duże dawki przeciwutleniaczy dodawane do żywności nie muszą oznaczać jednoznacznie ich korzystnego wpływu na organizm człowieka. Badania na układach modelowych pozwalają poznać mechanizmy oddziaływania pomiędzy tokoferolem a membrana lecytynową, dzięki czemu możemy przewidzieć wpływ tej substancji na lipidowy rdzeń błony komórkowej, a tym samym przewidzieć efekty uboczne związane z nadmiarem przeciwutleniaczy stosowanych w żywności.



Rys. 3. Wygaszanie fluorescencji D- α -tokoferolu w membranie PC, o stężeniu 0,2 mg/cm³, za pomocą akrylamidu.

Fig. 3. Quenching the fluorescence of D- α -tocopherol in 0.2 mg/cm³ PC membrane with acrylamide.

Wnioski

Ilość D- α -tokoferolu, który może być wbudowany w membranę bez zmiany jej fazy jest ograniczona. Przekroczenie granicznego stężenia D- α -tokoferolu –140 μ M przy stężeniu membrany 0,2 mg/cm³ oraz 420 μ M w przypadku membrany o stężeniu 2 mg/cm³ – powoduje przejście fazowe membrany i powstanie konglomeratów, w których tokoferol nie wykazuje fluorescencji.

Praca została wykonana częściowo w ramach grantu KBN 2 P06T 016 27

Literatura

- [1] Asai Y., Nomura T., Watanabe S.: Interaction of α -tocopherol and soybean oil with phosphatidylcholine and their formation of small dispersed particles. *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, **214**, 79-84.
- [2] Dave P.C.: Investigating structural changes in the lipid bilayer upon insertion of the transmembrane domain of the membrane-bound protein phospholamban utilizing 31P and 2H solid-state NMR spectroscopy. *Biophys. J.*, 2004, **86** (3), 1564-1573.

- [3] Gaede H.C., Gawrisch K.: Lateral diffusion rates of lipid, water, and a hydrophobic drug in a multilamellar liposome. *Biophys. J.*, 2003, **85** (3), 1734-1740.
- [4] Gutierrez M.E., Garcia A.F., Africa de Madariaga M., Sagrista M.L., Casada F.J., Mora M.: Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Science*, 2003, **72**, 2337-2360.
- [5] Mukhopadhyay P., Vogel H.J., Tieleman D.P.: Distribution of pentachlorophenol in phospholipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophys. J.*, 2004, **86** (1), 337-345.
- [6] Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K.: *Substancje dodatkowe i składniki funkcjonalne żywności*, Agro Food Technology, Czeladź 1997.
- [7] Vogel A., Scheidt H.A., Huster D.: The distribution of lipid attached spin probes in bilayers: Application to membrane protein topology. *Biophys. J.*, 2003, **85** (3), 1691-1701.
- [8] Wang X., Quinn P.: Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, 1999, **38**, 309-336.

INTERACTIONS BETWEEN THE LIPID MEMBRANE AND D- α -TOCOPHEROL DEPENDING ON ITS CONCENTRATION

S u m m a r y

The objective of the investigations performed was to determine the mechanism of interactions between particles of D- α -tocopherol in relation to its concentration in organic solvents and in a lipid membrane. The latter one is the simple model of a cellular membrane. One of the aspects investigated was to assess the impact of increased concentration of this homologue on the membrane structure.

The investigations in question comprised measurements of spectroscopic properties (absorbance and emission of fluorescence) of D- α -tocopherol showing different concentration levels in the lipid membrane, methanol, and n-hexane.

Results of the measured values of absorbance and emission of fluorescence showed that dimers were formed while the concentration value of D- α -tocopherol increased. The formation of dimers resulted from the fact that particles of D- α -tocopherol began to non-covalently interact among each other as soon as the concentration level was over 460 μM in n-hexane, and 180 μM in methanol. The mechanism of D- α -tocopherol interacting in membranes and with membranes differs from the mechanism of such an interaction in homogeneous solvents. It was stated that when D- α -tocopherol was present in the lipid membrane, then, it impacted the structure of this membrane. The monomers of D- α -tocopherol were built into the membrane, and when the concentration of D- α -tocopherol exceeded the limiting concentration levels in the lipid membrane (140 μM at a concentration level of the membrane of 0.2 mg/cm³, and 420 μM – at 2 mg/cm³), the lamellar structure of bilayer was disordered, and conglomerates appeared, which bonded the D- α -tocopherol and removed it from the aqueous dispersion. It was also evidenced that owing to quenching the fluorescence with acrylamide, the D- α -tocopherol including the chromanol ring were entirely located in the lipid phase.

Key words: lipid membrane, D- α -tocopherol, fluorescence, absorbance ☒