

## Влияние холестерина и ионов кальция на взаимодействие криопротекторов с моделью биологической мембраны

В.Ю. Свечникова<sup>1,2,\*</sup>, О.В. Мишукова<sup>1,3</sup>, А.Г. Миронова<sup>4</sup>, Г.Б. Хомутов<sup>2</sup>, М.А. Марченкова<sup>1</sup>, С.А. Яковенко<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»  
Россия, 123182, Москва, Площадь Академика Курчатова, д. 1

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет  
Россия, Москва, 119992, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

<sup>3</sup>Российский университет дружбы народов, институт биохимической технологии и нанотехнологии  
Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

<sup>4</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН  
Россия, Москва, 119334, ул. Косыгина, д. 4

<sup>5</sup>«ЭКО центр», клиника «АльтраВита». Россия, Москва, 119186, ул. Нагорная, д. 4А  
(Поступила в редакцию 10.06.2024; подписана в печать 19.11.2024)

В данной работе изучается воздействие трех криопротекторов — этиленгликоля, диметилсульфоксида, сахарозы — на изотермы сжатия монослоев Ленгмюра яичного желтка в присутствии холестерина в монослое и без него, а также воздействие ионов кальция из субфазы, которые влияют на эффективность криозащиты. Кроме того, в работе исследуются упругие свойства полученных монослоев путем расчета и сравнения модуля сжатия монослоя. Мы рассматриваем сложную биоподобную систему — монослой яичного желтка, холестерина и их смеси на поверхности водного раствора питательной смеси, и получаем информацию о специфическом взаимодействии разных криопротекторов с липидными мембранами, в чем состоит научная новизна работы. Мы получили, что при одновременном добавлении ионов кальция и криопротекторов в субфазу они блокируют влияние друг друга на липидный монослой и снижают эффективность криопротекции. Холестерин в монослое желтка в соотношении 1:50 m/m изменяет свойства монослоя, что приводит к усилению действия криопротекторов. Также впервые обнаружен эффект существенного увеличения поверхностного давления (на  $\sim 20$  мН/м) при добавлении криопротекторов в рассматриваемую систему, который может служить индикатором эффективности дегидратации мембран криопротекторами и использоваться для поиска наиболее эффективных и безопасных композиций криопротекторов. Полученные результаты представляют интерес для различных областей биофизики и биомедицины, поскольку изучение механизмов взаимодействия кальция с биологическими мембранными и мембраноподобными системами важно для понимания различных эффектов, вызываемых лекарственными и биологически-активными препаратами на клеточном уровне.

PACS: 82.45.Mr

УДК: 577.352.27

Ключевые слова: криопротекторы, модель биологической мембраны, липидный ленгмюровский монослой, яичный желток, холестерин, ионы кальция.

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема сохранения в криоконсервированном состоянии различных биологических клеток в течение срока, значительно превышающего продолжительность их физиологической жизни вне организма, остается одной из актуальных задач современности [1]. При заморозке структура клетки повреждается вследствие различных факторов, таких как: образования кристаллов льда и их механического воздействия на мембрану, осмотического шока, окислительного стресса, изменения трансмембранного потенциала, дегградации ДНК и белков, электропорации мембран, апоптоза и др. Для снижения такого негативного воздействия на клетки используются специальные вещества — криопротекторы (КП) [2]. В настоящее время продолжается поиск веществ, обладающих криопротекторными свойствами, а также изучение механизма их действия [3].

Криопротекторы — вещества, которые используются для защиты организмов от повреждений при замораживании и оттайке. Механизмы действия КП различны: некоторые КП образуют водородные связи с молекулами воды, что помогает снизить скорость образования льда и предотвратить само образование кристаллов, что позволяет сохранить структуру и функцию организма [4–6]. КП могут изменить свойства воды и снизить ее точку замерзания. Некоторые КП обеспечивают стекловидное (аморфное) состояние содержимого внутри клеток и тканей при их заморозке. Это предотвращает образование кристаллического льда и минимизирует повреждения, связанные с образованием ледяных кристаллов [7, 8]. КП могут обеспечить дополнительную защиту от повреждений, вызванных низкими температурами, белков и нуклеиновых кислот, предотвращая их денатурацию. Другие КП могут улучшать обмен веществ в клетках при пониженных температурах перед заморозкой и после разморозки. КП могут также обладать антиоксидантными свойствами, что помогает предотвратить повреждение клеток при оттаивании, вызванное окислительным

\* [svechnikova.vi21@physics.msu.ru](mailto:svechnikova.vi21@physics.msu.ru)

стрессом. Важно отметить, что разные КП могут обладать комбинацией этих механизмов действия и могут быть эффективными для разных типов организмов и условий замораживания [9].

Для разработки оптимальных методов криоконсервирования биологических структур необходимо решить биофизическую проблему минимизации повреждающего воздействия процессов замораживания и размораживания на биологические мембраны. Поскольку для уменьшения повреждающего воздействия в методах криоконсервирования используются специальные вещества (криопротекторы), необходимо изучение их влияния на структуру и физико-химические свойства липидных биологических мембран. Эффективным инструментом для выяснения базовых физико-химических механизмов взаимодействий КП и компонентов водной фазы (в том числе питательной среды) с липидными мембранами являются модельные биологические амфифильные молекул. Особый интерес представляют монослои биогенных молекул, в частности монослои желтка, в составе которых доминирует природный лецитин.

КП влияют на свойства липидных монослоев, как правило, путем изменения их фазового состояния и структуры, с жидкокристаллической на гель-фазу и наоборот, в зависимости от их концентрации и химической природы. КП могут образовывать гидратные оболочки вокруг липидов и уменьшать тенденцию к образованию липидных агрегатов. Они также могут изменять взаимодействие между липидами и водой, что влияет на их ориентацию и подвижность. Это может быть полезно, например, для сохранения липидных структур при низких температурах или для улучшения устойчивости липидных мембран к холоду [10, 11].

КП могут повысить устойчивость липидных монослоев к образованию льда и кристаллизации, предотвращая разрушение мембран при замораживании. Они могут также снижать поверхностное натяжение липидных монослоев, улучшая их способность к самоорганизации и снижая потерю воды из мембран. Таким образом, КП играют важную роль в сохранении структуры и функции липидных монослоев при низких температурах, а также в обеспечении их устойчивости к холоду и замораживанию [12].

Если КП вызывает сжатие ленгмюровского монослоя фосфолипидов на поверхности водной субфазы с КП, то это можно объяснить тем, что молекулы КП притягивают к себе молекулы воды сильнее, чем молекулы фосфолипидов, то есть КП имеет большую аффинность к воде, чем к фосфолипидам, и чем аффинность липидов к воде. В противоположном случае, если КП вызывает увеличение площади монослоя фосфолипидов, можно говорить о том, что молекулы КП имеют большую аффинность к фосфолипидам, чем к воде, или молекулы КП встраиваются в монослой вместе с молекулами воды в виде гидратной оболочки.

Механизм замещения воды в липидном монослое

молекулами КП во время проявления криопротекторного действия имеет очень важное значение, так как криопротекторный эффект может быть достигнут значительно меньшими концентрациями КП, чем в случае другого общепринятого механизма криопротекторного действия, когда молекулы КП (например, глицерина) в огромной концентрации встраиваются в структуру воды и предотвращают образование кристаллического льда. В последнем случае требуется количество молекул КП, сравнимое по порядку величины с количеством молекулы воды, что вызывает сильный токсический эффект КП [13]. Поиск таких водозамещающих КП может дать хорошие результаты и значительный прогресс в криобиологии. И в таком поиске мы не будем ограничены веществами, молекулы которых обязательно должны иметь в своей структуре ОН-группы или другие уже исследованные полярные группы, что значительно расширит область поиска.

Одним из подходов к изучению свойств биологических мембран, а также изменений этих свойств под действием сторонних веществ, является использование модельных систем, имеющих схожий с мембраной состав [5, 14, 15]. Преимущество модельной мембраны заключается в том, что она хорошо воспроизводима и относительно проста, а ее состав известен, что позволяет сравнительно анализировать и интерпретировать полученные данные. В качестве модельных систем, имитирующих мембрану, могут быть использованы ленгмюровские пленки — монослои, образованные амфифильными веществами, нанесенными на жидкую водную субфазу [16–25]. Исходя из соотношения между поверхностным давлением и площадью, занимаемой монослоем, можно получить данные о его физико-химических свойствах с последующей возможностью экстраполяции полученных результатов на биомембраны, имеющие схожий липидный состав [26, 27].

В связи с тем, что липидный состав клеточных биомембран варьируется в очень широких пределах как среди разных типов клеток, так и среди разных организмов и зависит от возраста организма, нами был выбран куриный яичный желток как универсальная фундаментальная смесь липидов, которая эффективно поддерживает чувствительное и требовательное к липидам эмбриональное развитие. Данные о взаимодействии КП с липидными монослоями из желтка как моделью биомембран могут быть очень полезны для оптимизации процесса заморозки и разморозки клеток, что в свою очередь может повысить эффективность и выживаемость клеток при замораживании и размораживании, так как яичный желток доказал свою криопротекторную активность и входит в состав многих криопротекторных сред [28].

Большинство исследований механизмов действия КП на липидные монослои в основном ограничивались взаимодействием между обычными КП (диметилсульфоксидом (ДМСО), глицерином) и стандартными фосфатидилхолинами [29].

Одним из результатов исследований [5, 6, 10, 30, 32]

является то, что воздействие ДМСО на монослой ДПФХ зависит от концентрации: при низких концентрациях ДМСО вызывает истончение и повышенную текучесть мембран, тогда как при высоких концентрациях он вызывает образование пор [32].

Установлено, что эффект взаимодействия КП с липидными монослоями варьируется в зависимости от вида липидов и КП: разные КП оказывают различное действие. В частности, этиленгликоль (ЭГ) и глицерин вызывают небольшое расширение монослоя, подразумевая проникновение КП в области головной группы, тогда как диметилформамид (ДМФ) уплотняет монослой для всех фосфатидилхолинов, рассмотренных в [33–35].

В работе [29] исследовано воздействие четырех КП (ДМФ, ЭГ, глицерина и ДМСО) на монослой четырех фосфолипидов: ПОФЭ (1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилэтанолламин), ПОФХ (1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилхолин), ДОФХ (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) и ДПФХ (1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин) при высокой концентрации КП (10% v/v), относящейся к криозащите, и проведено сравнение с более низкими концентрациями (5% v/v). Результаты показали, что взаимодействия между КП и липидами являются сложными, со значительными различиями, выявленными в зависимости от КП, концентрации и видов фосфолипидов. Было замечено, что ДМФ и ЭГ вызывают уплотнение монослоя, тогда как глицерин вызывает расширение (проникновение в монослой), хотя у каждого из них наблюдаются незначительные различия с различными фосфолипидами. ДМСО показал значительные различия в зависимости от головной группы и физического состояния монослоя. Также обнаружено, что ДМФ является единственным КП, способным проникать в монослой при физиологически соответствующих латеральных давлениях, что согласуется с тем, что лучшие среды для криоконсервации являются многокомпонентными.

Сахара накапливаются в тканях некоторых организмов, предотвращая повреждение клеток при замораживании и высушивании. В работе [34] исследовались нерастворимые монослои дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ), нанесенные на субфазу, содержащую сахар. Эффект расширения монослоя увеличивается с увеличением концентрации сахара и более выражен, если вместо фруктозы используется сахароза. Проникновение молекул КП в область головной группы увеличивает потребность липидных молекул в площади и приводит к отталкиванию головных групп между собой. При низких поверхностных давлениях молекулы сахара проникают в область полярной головной группы липидного монослоя. При высоком боковом давлении они выдавливаются из монослоя, поскольку слабые водородные связи между сахарами и водой разрываются.

Катионы металлов могут изменять стабильность и структуру фосфолипидных бислоев [36, 37], что оказывает очень важное влияние на нормальные физиоло-

гические функции биопленок.

В работе [38] были изучены монослои, содержащие холестерин и насыщенные фосфатидилэтанолламин и фосфатидилсерин. Обнаружено, что взаимодействия между липидами усиливаются в присутствии  $\text{Na}^+$ . Соответственно, небольшие изменения в ионной среде вызывают значительные изменения в двухслойной структуре.

Ионы кальция играют регулируемую роль во взаимодействии лекарственных средств с фосфолипидными мембранами [39, 40] и занимают важное место в нормальной физиологической активности клеток и липидных доменах мембраны [41]. Они вызывают изменения конформации полярных головных групп фосфолипидов [42]. Площадь, приходящаяся на одну молекулу фосфолипида, уменьшается в присутствии ионов кальция [43]. Ионы кальция, адсорбированные на фосфолипидной мембране, могут снижать поверхностную плотность заряда фосфолипида [44].

В работе [45] продемонстрировано, что присутствие ионов натрия  $\text{Na}^+$  и кальция  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивает конденсацию, стабильность и плотность упаковки молекул монослоя 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламина (ДПФЭ) и пленок, смешанных с холестерином (особенно в случае  $\text{Ca}^{2+}$ ) [46]. Установлено, что наличие холестерина в монослое увеличивает упорядоченность соседних липидов и способствует одновременному повышению эластичности и сжимаемости пленок [47, 48].

В данной работе изучается влияние воздействия КП (ЭГ, ДМСО, сахарозы) на липидный монослой яичного желтка в присутствии холестерина в монослое и без него, а также ионов кальция в субфазе, которые также влияют на эффективность криопротекции. Чтобы приблизить состав монослоев к естественным физиологическим многокомпонентным клеточным мембранам, нами был выбран яичный желток, поскольку он является природной смесью липидов. Научная новизна работы заключается в исследовании сложной биогенной системы — слоя яичного желтка, холестерина и их смеси, и состоит в получении данных о специфическом взаимодействии разных КП с липидами мембранами, что дает нам понимание механизма действия КП и позволяет выработать ценные рекомендации для разработки криопротекторных сред для заморозки клеток.

Несмотря на многочисленные применения КП в биологических и фармацевтических науках, на сегодняшний день до конца неизвестно, как они взаимодействуют с молекулами фосфолипидов. Оказываемые ими эффекты на лэнгмюровские пленки сложных систем практически не изучены. Это может быть связано с довольно ограниченным количеством экспериментальных исследований, которые представлены в литературе, особенно в случае систем, содержащих холестерин и катионы металлов.

Данное исследование представляет интерес для различных областей биофизики и биомедицины, поскольку изучение механизмов взаимодействия кальция, важ-

нейшего сигнального катиона, с биологическими мембранными и мембраноподобными системами важно для понимания различных эффектов, вызываемых лекарственными и биологически-активными препаратами на клеточном уровне.

## 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы/Химия

В работе использовали яичный желток (E0625-100G, Sigma-Aldrich), холестерин (CAS-номер 57-88-5, Sigma), растворенные в хлороформе (Sigma-Aldrich), ДМСО (CAS-номер 67-68-5, Sigma), ЭГ (Sigma-Aldrich), сахарозы (MPBiomedicals), хлорид кальция (131232.1211 Panreac).

В качестве субфазы использовали: 0.2 М натрий-фосфатный буфер (НФБ) (pH = 7.4), представляющий собой растворенные гидрофосфат натрия  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (A0079379 935, Merck) и дигидрофосфат натрия  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (K92915442 922, Merck) в ультрачистой воде (MilliQ, Millipore, 18 МΩ·см); питательную среду (ПС) Quinn's Advantage с HEPES (арт. 4100).

Для навесок использовали аналитические весы METTLER TOLEDO AB265-S Classic.

*Монослои (Получение монослоев и измерение их взаимодействия с КП)*

Формирования лэнгмюровских монослоев производили на установках KSV MiniTrough и KSV 5000 (KSV Instruments, Финляндия). Площадь поверхности 273 см<sup>2</sup> и 870 см<sup>2</sup>, объем вмещаемой субфазы 200 мл и 1200 мл, соответственно. Поверхностное давление ( $\pi$ ) измеряли с помощью платиновых весов Вильгельми с разрешением  $\pm 0.1$  мН/м. Перед каждым экспериментом лэнгмюровскую ванну промывали этанолом и тщательно ополаскивали очищенной водой.

В опытах 43.0 мкг (21.5 мкл, 2.00 мг/мл) яичного желтка или 41.4 мкг (74.0 мкл, 0.56 мг/мл) холестерина, растворенных в хлороформе, наносили на субфазу с помощью микрошприца (Hamilton), а через 10 мин липидную пленку сжимали со скоростью 10 мм/мин.

При использовании в качестве субфазы НФБ были сформированы монослои желтка, холестерина и смеси желтка с холестерином (50:1 m/m) на чистой субфазе, а также на субфазе с добавлением сахарозы (0.5 М). Эксперименты с монослоями проводились при  $T = (20.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ .

При использовании в качестве субфазы ПС эксперименты с монослоями проводились при комнатной  $T = (20.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  и физиологической  $T = (37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  температурах. Результаты и выводы по влиянию температуры на изотермы в данном исследовании не приводятся.

Проводили три серии экспериментов: в первой серии формировали монослой яичного желтка на ПС, во второй серии в субфазу добавляли хлорид кальция до конечной концентрации  $10^{-3}$  М, в третьей — в субфазу добавляли хлорид кальция до конечной концентрации

$10^{-3}$  М, а к раствору яичного желтка добавляли холестерин (соотношение желтка и холестерина 50:1 m/m).

В каждой серии эксперименты проводили в четыре этапа: первый — при начальных условиях, описанных выше, второй — с добавлением под монослой ЭГ до конечной концентрации 5%v; третий — с последовательным добавлением под монослой ДМСО до конечной концентрации 5%v; четвертый — с последовательным добавлением под монослой сахарозы до конечной концентрации 0.5 М. Вещества добавляли под монослой за барьерами и осторожно перемешивали, после чего запускали запись изотермы сжатия.

В работе анализировали не только  $\pi$ -А-изотермы, но и упругие свойства полученных слоев по модулю сжатия (МС) монослоя ( $C^{-1}$ ) — величине, обратной коэффициенту сжимаемости:

$$C = -\frac{1}{A_0} \left( \frac{\partial A_0}{\partial \pi} \right)_T,$$

где  $A_0$  — удельная площадь монослоя, см<sup>2</sup>;  $\pi$  — поверхностное давление, мН/м.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1. Анализ $\pi$ -А-изотерм яичного желтка, холестерина и их смеси на субфазе натрий-фосфатного буфера

Изотермы трех циклов сжатия-расширения были получены для яичного желтка, холестерина и их смеси на субфазе НФБ как с добавлением сахарозы (рис. 1), так и без нее (рис. 2).

Значительный рост поверхностного давления во время сжатия подтверждает способность всех компонент образовывать монослой на поверхности субфазы, что является следствием амфифильной природы компонентов желтка и холестерина. Близкое друг к другу расположение изотерм при сжатии-растяжении и последующем сжатии монослоев желтка, плавный, почти линейный рост поверхностного давления характеризуют «мягкость» (эластичность) и стабильность сформированных монослоев.

Добавление холестерина, содержащегося наряду с липидами в мембране клетки и помогающего поддерживать их структурную целостность и стабилизировать текучесть [49], в раствор яичного желтка изменяет молекулярную упаковку получаемой пленки. Взаимодействие между «головными» группами холестерина и фосфат-ионами буферного раствора приводит к расширению изотропно-жидкого фазового состояния монослоя. Неаддитивность изотерм монослоя желтка с холестерином свидетельствует о том, что молекулы пленки смеси взаимодействуют друг с другом. В литературе описано влияние холестерина и основного белка миеллина (МВР) на липидные монослои, имитирующие цитоплазматическую мембрану миеллина [50],



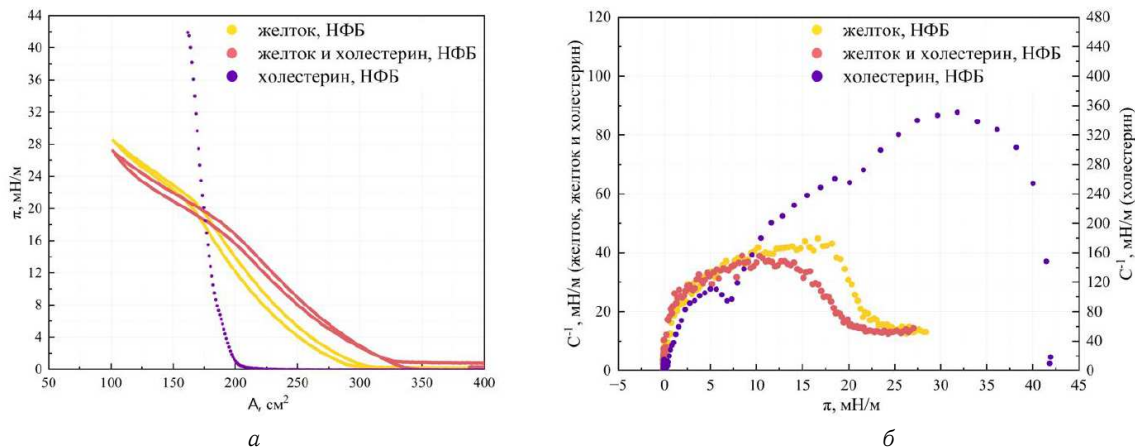


Рис. 1.  $\pi$ - $A$ -изотермы (а) и зависимости модуля сжатия от поверхностного давления (б) для монослоев яичного желтка, холестерина и их смеси (50:1 м/м) на НФБ

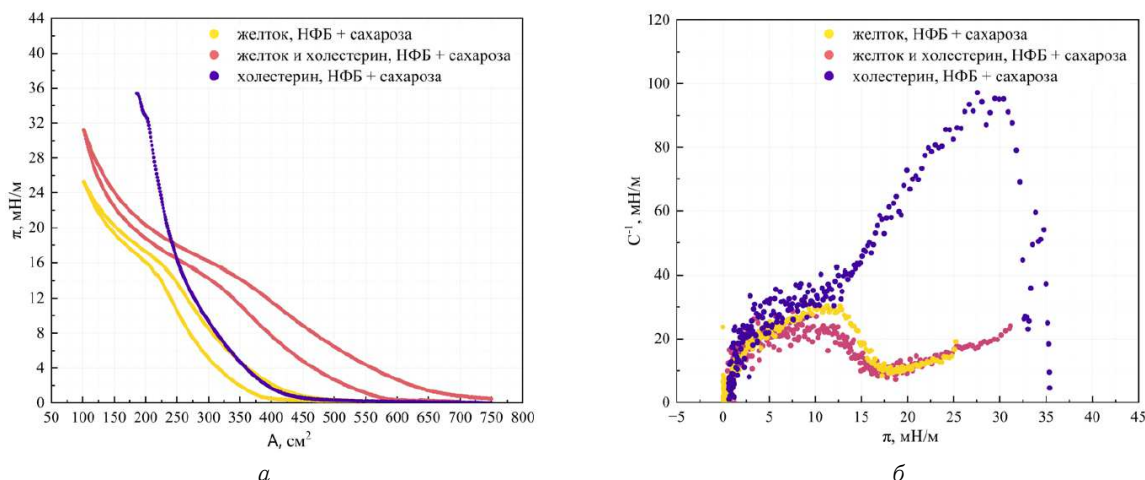


Рис. 2.  $\pi$ - $A$ -изотермы (а) и зависимости модуля сжатия от поверхностного давления (б) для монослоев яичного желтка, холестерина и их смеси (50:1 м/м) на НФБ с добавлением сахарозы

влияние холестерина на многокомпонентные лэнгмуэровские монослои, имитирующие наружный и внутренний листки мембраны эритроцитов человека [51], термодинамические и механические свойства смешанных монослоев ДМФХ/холестерин в физиологических условиях [52], термодинамические аспекты влияния холестерина на свойства фосфолипидных монослоев [53]. Однако присутствие холестерина в концентрации 1:50 м/м в слое желтка почти не влияет на упругость пленки желтка, что отражается в МС монослоя (рис. 1, б).

**2.2. Анализ  $\pi$ - $A$ -изотерм яичного желтка, холестерина и их смеси на субфазе натрий-фосфатного буфера в присутствии сахарозы**

Механизм взаимодействия сахарозы с липидным монослоем из желтка включает несколько этапов: диффузию к поверхности монослоя; адсорбцию на монослой

за счет взаимодействия полярных групп сахарозы с полярными группами липидов [54, 55]; организацию мономолекулярного слоя из адсорбированных молекул сахарозы за счет гидрофобных и водородных взаимодействий между молекулами сахарозы и липидов [34, 56]; и, наконец, изменение упаковки липидного монослоя с изменением поверхностного натяжения и проницаемости слоя.

Изотермы веществ на субфазе НФБ с добавлением сахарозы сдвинуты относительно изотерм, полученных на той же субфазе без сахарозы, в сторону большей площади. Это является прямым следствием того, что молекулы сахарозы, которая сильно гидратирована, встраиваются в монослой между «головными» полярными группами молекул пленки, что вызывает расширение монослоя и сдвигу изотермы сжатия. Отметим, что данный результат согласуется с работой [34].

Таким образом, молекулы монослоя эффективно взаимодействуют с сахарозой, которая представляет собой

непроникающий КП.

Введение в буферный раствор сахарозы приводит к появлению на изотермах для каждого вещества заметного гистерезиса, образуемого первыми двумя циклами сжатия-расширения, — монослой не восстанавливается после первого цикла сжатия. Площадь, приходящаяся на молекулу, возрастает почти в два раза. Это также объясняется связыванием сахарозы с монослоем, включающее в себя некоторую степень интеркаляции — обратимого включения молекулы или их группы между другими молекулами, которая разделяет липидные «головные» группы, тем самым увеличивая площадь пленки. Изотермы первого и третьего циклов не расположены близко друг к другу, как это наблюдалось в случае отсутствия сахарозы в растворе НФБ, поскольку молекулы сахарозы за цикл растяжения покидают монослой полностью.

Отметим, что при одинаково нанесенном количестве вещества на поверхность в экспериментах в присутствии сахарозы и без нее, площадь, при которой начинается подъем давления, увеличивается с 300 до 450 (на 150), с 200 до 450 (на 250), с 330 до 750 (на 420)  $\text{см}^2$  для желтка, холестерина и их смеси соответственно. В табл. 1 указаны площади начала подъема изотерм, пересчитанные для 1 мкг вещества. При аддитивности вклада взаимодействия желтка с сахарозой и холестерина с сахарозой, монослой желток + холестерин расширился бы на  $3.50 + 0.02 \cdot 6 = 3.62$  см в расчете на 1 мкг вещества. Однако в эксперименте расширение произошло на  $10.3 \text{ см}^2$ , что в 2.8 раз превышает предполагавшийся эффект. Таким образом, наличие холестерина в слое желтка усиливает встраивание сахарозы в монослой.

Добавление сахарозы под монослой сильно изменяет его вязкоупругие свойства (рис. 1–2, б, табл. 1). Максимум МС уменьшается при добавлении сахарозы для холестерина почти в 4 раза, для желтка — в 1.5 раза, а для пленки сахароза + холестерин (50:1 м/м) в 2 раза, что указывает на специфическое взаимодействие сахарозы с холестерином, входящим в малых количествах в монослой.

### 2.3. Анализ $\pi$ -А-изотерм яичного желтка на субфазе натрий-фосфатного буфера в присутствии ионов кальция и сахарозы

Двухвалентные ионы, такие как ионы кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), могут оказывать влияние на взаимодействие КП с липидными монослоями [27].

Когда КП вводятся под липидные монослои, они могут встраиваться в структуру сформированной пленки изменять ее физико-химические свойства, включая температуру фазовых переходов, вязкость и упругость [5]. Также это приводит систему к существенному уменьшению поверхностного натяжения, которое может быть обусловлено изменением поверхностных свойств растворов КП по сравнению с чистой водой

и исходной субфазой и изменением гидратации полярных голов молекул липидов.

КП связывают воду, образуют комплексные соединения с водой. Как следствие, они меняют характер гидратации молекул и ионов в водных средах, содержащих КП. Изменение характера гидратации ионов в растворах КП может существенно изменять характер их взаимодействия с липидным монослоем.

Исследования монослоя желтка на субфазе НФБ с добавлением ионов кальция и сахарозы приводят к схожим результатам, описанным выше, как в случае добавления под липидный монослой сахарозы (рис. 3).

Наличие кальция в субфазе приводит к смещению изотермы в сторону значений больших площадей монослоя: начальная площадь подъема изотермы увеличивается с 300 до  $550 \text{ см}^2$  (рис. 3, а, желтая и синяя кривые). Данный результат хорошо согласуется с литературой [27]. Ионы кальция могут образовывать гидратированные комплексы с полярными головками липидных молекул монослоя в стехиометрическом соотношении 1:1 и 1:2. Формируемые комплексы не очень прочные (связывание не очень сильное), поскольку липиды — это цвиттер-ионы (в целом электронейтральные), и связывание происходит по ион-дипольному механизму или через водородные связи воды гидратных оболочек. Следует отметить, что появление заметного гистерезиса в данном случае может обуславливаться достижением коллапса монослоя.

Включение сахарозы, как обсуждалось выше, сдвигает изотерму с 300 до  $450 \text{ см}^2$  (рис. 3, а, зеленая кривая). Однако присутствие в субфазе и кальция, и сахарозы увеличивает начальную площадь подъема изотермы с 300 до  $370 \text{ см}^2$  (рис. 3, а, красная кривая), уменьшает давление, переводя изотерму ближе к изотерме желтка на НФБ и на НФБ без добавления кальция. Так же, как и в случае с добавлением кальция, гистерезис может возникать из-за достижения коллапса монослоя.

Максимум и минимум МС, а следовательно, и жесткость монослоя, возрастают в следующей последовательности для монослоев: (желток + кальций) → (желток + сахароза) → (желток + кальций + сахароза) → желток.

Ионы кальция, так же, как и сахароза, влияют на структуру липидного монослоя, расширяя и размягчая его. По смещению изотерм и изменению упругих свойств монослоя можно говорить о блокировке влияния кальция и сахарозы друг другом. Это происходит из-за образования комплексов ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с КП — гидратированный кальций связывается с ОН-группами сахарозы, что приводит к затруднению их связывания с липидами. Такой характер взаимодействия снижает концентрацию доступных молекул, и, в свою очередь, эффективность криопротекции.

Таблица 1. Изменение площади начала подъема изотермы (в пересчете на 1 мкг вещества) и значение максимума модуля сжатия для монослоев яичного желтка, холестерина, их смеси 50:1 м/м на НФБ в присутствии 0.5 М сахарозы и без нее

Монослой	Изменение площади начала подъема изотерм, см <sup>2</sup> /мкг	Максимум модуля сжатия, мН/м	
		Без сахарозы	С сахарозой
Холестерин	6.00	360	100
Желток	3.50	43	30
Желток + холестерин	10.30	40	20

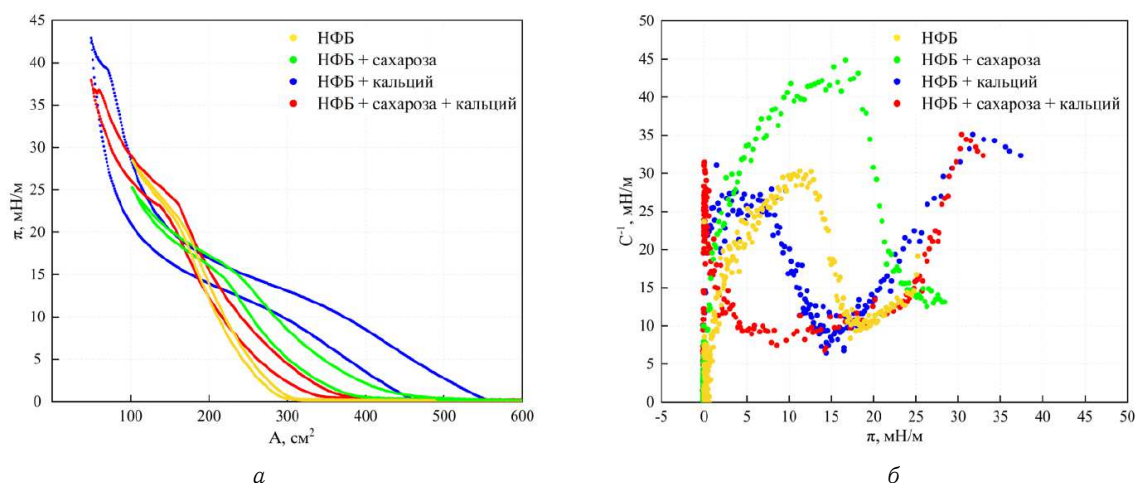


Рис. 3.  $\pi$ - $A$ -изотермы (а) и зависимости модуля сжатия от поверхностного давления (б) для монослоев яичного желтка на НФБ с добавлением кальция (синим) и сахарозы (красным)

#### 2.4. Анализ $\pi$ - $A$ -изотерм яичного желтка, холестерина и их смеси на субфазе питательной среды в присутствии ионов $\text{Ca}^{2+}$ , ЭГ, ДМСО, сахарозы

Ионы  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$ , ионы солевого фона (ионы щелочных и щелочноземельных металлов, ионы металлов, подвергающиеся заметному гидролизу в исследуемой области рН), присутствующие в субфазе, могут оказывать влияние на свойства монослоя [57], и в первую очередь на вид  $\pi$ - $A$ -изотермы. По воздействию на монослой жирных кислот ионы металла, находящиеся в растворе субфазы, могут быть разделены на две группы:

1. ионы, которые уплотняют монослой жирной кислоты, за счет связывания молекул кислоты с ионами металла — это главным образом ионы щелочноземельных металлов;
2. ионы, которые вызывают расширение монослоя за счет образования солей более сложного состава, чем в первой группе — преимущественно ионы гидролизующихся металлов, таких как алюминий, торий, свинец, цинк, медь, железо, кобальт и т. п. [58].

Изотерма желтка, полученная на субфазе ПС, значительно отличается от полученной на НФБ (рис. 4):

МС увеличивается более, чем в два раза (с 43 до 92 мН/м), монослой становится более упругим. При добавлении ионов кальция в субфазу на изотерме появляется заметный гистерезис, что говорит о взаимодействии ионов кальция и возможных его комплексов (например, с фосфатными группами водной субфазы) с липидами. В состоянии разреженного монослоя в начале сжатия (фаза двумерного газа) индивидуальные молекулы липидов взаимодействуют с кальцием с образованием комплексов 1:1, конденсированном состоянии образуются комплексы-сшивки (солевые мостики) типа 2 липида : 1 кальций. При расширении эти комплексы сохраняются и монослой оказывается более конденсированным, что приводит к появлению гистерезиса.

Рассматривая влияние ионов кальция на упругие характеристики монослоя, можно отметить, что при наличии ионов кальция в субфазе без КП происходит расширение монослоя (рис. 4, сдвиг синей кривой относительно зеленой в область больших площадей), при этом введение КП под монослой блокирует такое влияние кальция на пленку (рис. 5, а, б, в), смещая изотермы (синие кривые относительно зеленых) в область меньших площадей. При добавлении КП в присутствии ионов кальция в субфазе наблюдается уменьшение поверхностного давления (синие кривые) в сравнении с аналогичными экспериментами без ионов каль-

Таблица 2. Изменение площади подъема изотермы (в пересчете на 1 мкг вещества) и значения максимума/минимума модуля сжатия для монослоев яичного желтка на НФБ при добавлении ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и 0.5 М сахарозы

	Изменение площади начала подъема изотерм относительно изотермы желтка, $\text{см}^2/\text{мкг}$		Максимум/минимум модуля сжатия, мН/м	
	Без сахарозы	С сахарозой	Без сахарозы	С сахарозой
Монослой				
Желток	0.00	3.50	43/15	30/10
Желток + $\text{Ca}^{2+}$	5.80	1.63	25/9	35/12

ция (зеленые кривые), что свидетельствует о снижении взаимодействия липидов с молекулами КП в слое.

Результаты экспериментов, представленные на рис. 5, не согласуются с данными работы [51], в которых исследовали влияние ДМСО на монослой фосфатидилхолина. Было показано, что ДМСО приводит к конденсации монослоя и уменьшению площади, приходящейся на одну молекулу в монослое липида. Авторы данной работы объясняют такой эффект сильным сродством ДМСО к воде и дегидратацией липидов монослоя — удалению связанной с полярными группами липидов водой.

Удаление или нарушение структуры связанной с монослоем воды может приводить к изменению поверхностного давления монослоя (фактически избыточной поверхностной свободной энергии) и изменению организации молекул в монослое. Предположительно, аналогичный эффект должен оказывать и ЭГ, который тоже сильно связывает воду. Однако появление этих веществ в субфазе привело к сдвигу изотерм вправо. В соответствии с уравнением адсорбции Гиббса это можно объяснить увеличением количества молекул на границе раздела фаз. Поскольку состав ПС довольно сложный, в присутствии ЭГ и ДМСО изменяются свойства растворимости каких-то компонентов водной субфазы или образуются какие-то комплексы, которые адсорбируются на границе раздела фаз и сдвигают изотерму. Эти растворители сильно связывают воду, меняют структуру водородных связей и связанной воды на растворенных ионах и молекулах, меняя их растворимость и свойства. Такие дегидратированные молекулы или их комплексы могут связываться с молекулами желтка или же сами по себе локализоваться на границе раздела фаз (адсорбат Гиббса). Наличие гистерезисов также указывает на адсорбцию и изменение состава граничного слоя при сжатии и расширении монослоя.

Конденсация монослоя (сдвиг изотермы влево) на субфазе, содержащей ЭГ и ДМСО, вызвана наличием ионов кальция в ней. Такой эффект характерен для монослоев жирных кислот — у них образуются солевые мостики с двухвалентными ионами и пропадает жидкая фаза из-за сильного ионного электростатического взаимодействия карбоксильных групп и двухва-

лентных катионов, которое неизбежно приводит к дегидратации и сильным ионным связям. Возможно, дегидратация липидов и ионов кальция в присутствии ЭГ и ДМСО обуславливает более сильное связывание кальция в виде комплексов 1:2, а отсутствие у него гидратной оболочки приводит к конденсации монослоя с соответствующим сдвигом изотерм влево.

Кальций может мешать связыванию с монослоем вышеупомянутого дегидратированного нового адсорбата, образующегося в присутствии ЭГ и ДМСО, что тоже будет приводить к сдвигу изотерм сжатия влево в присутствии данных КП.

Последовательное добавление КП под монослой ведет к увеличению гистерезисов на изотермах как при наличии, так и в отсутствие ионов кальция в субфазе. Значение МС монослоя при таком введении КП уменьшается, что видно на рис. 4 (нижний ряд).

Максимум и минимум МС монослоя желтка уменьшаются при добавлении КП под монослой на ПС в следующем ряду: без КП (92 и 16 мН/м) → ЭГ (73 и 24 мН/м) → ЭГ + ДМСО (65 и 20 мН/м) → ЭГ + ДМСО + сахароза (48 и 10 мН/м). Добавление ионов кальция в субфазу делает слои более эластичными, уменьшая максимумы и минимумы МС в том же порядке: без КП (88 и 14 мН/м) → ЭГ (60 и 10 мН/м) → ЭГ + ДМСО (48 и 10 мН/м) → ЭГ + ДМСО + сахароза (40 и 11 мН/м) (табл. 3). При этом значения поверхностного давления, соответствующие максимумам МС при добавлении кальция, сдвигаются в указанном выше ряду с 12.5–16.0–18.0–20.0 на 10.0–14.5–18.0–19.0 мН/м. Для минимумов МС аналогичное смещение выглядит следующим образом: с 16.0–21.0–22.0–23.0 на 16.0–19.0–20.5–22.0 мН/м.

По мере добавления КП в субфазу, формирование слоя начинается все с более высоких значений площадей (рис. 6, а): монослой расширяется. Также увеличивается значение поверхностного давления, что обусловлено взаимодействием молекул липидной пленки с молекулами КП. Наличие гистерезисов фиксируется только в случае добавления ДМСО и сахарозы, которые, по-видимому, вытесняются из пленки при сильном сжатии. Повышение температуры растягивает изотерму по оси абсцисс, делает слой более мягким и эластичным, подвижным.



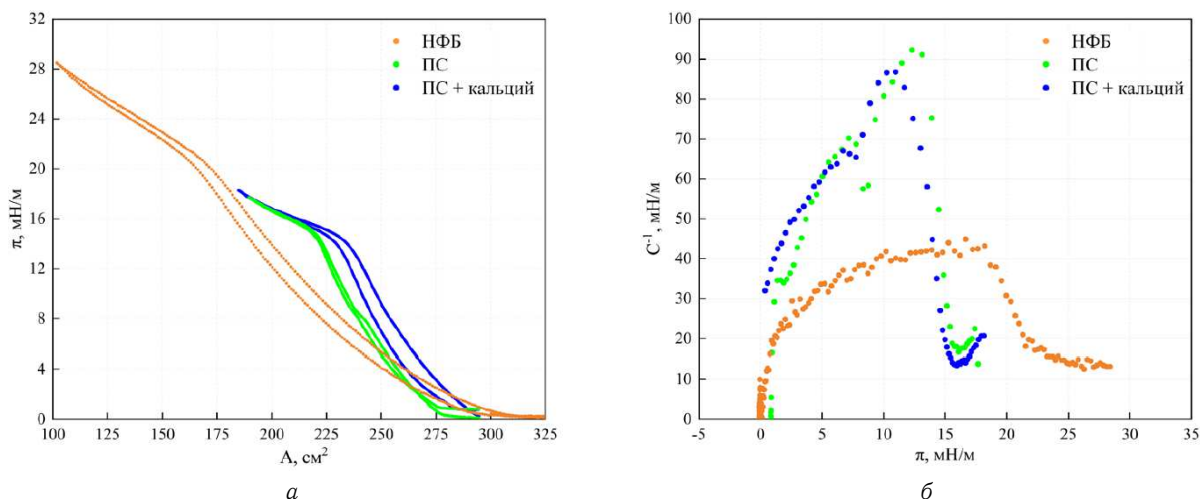


Рис. 4.  $\pi$ - $A$ -изотермы (а) и зависимости модуля сжатия от поверхностного давления (б) для монослоев яичного желтка НФБ (оранжевым) и на ПС (зеленым) с добавлением кальция (синим)

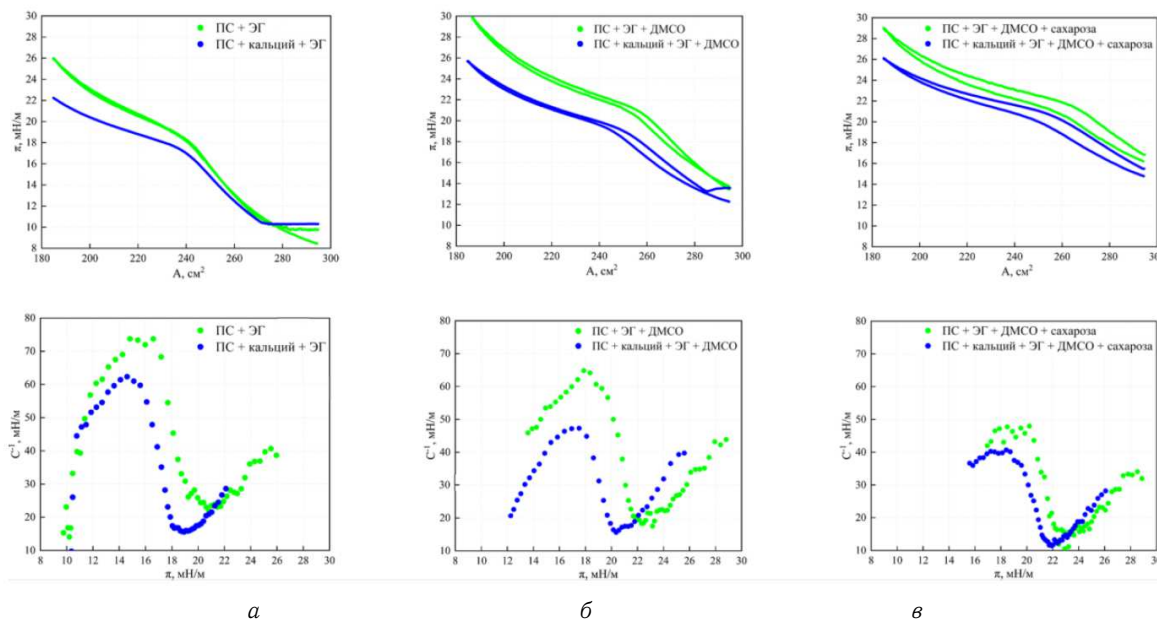


Рис. 5. Верхний ряд:  $\pi$ - $A$ -изотермы для монослоев яичного желтка на ПС (зеленый), на ПС с добавлением кальция (синий) в присутствии ЭГ (а), ЭГ и ДМСО (б), ЭГ, ДМСО и сахаразы (в) в субфазе. Нижний ряд: зависимости модулей сжатия от значений поверхностного давления для  $\pi$ - $A$ -изотерм, которые изображены в верхнем ряду данного рисунка

В случае добавления холестерина к желтку наблюдается сдвиг кривых в область больших площадей относительно экспериментов с монослоями желтка, как в присутствии кальция в субфазе, так и без него. То есть наличие даже малого количества холестерина в монослой изменяет характер взаимодействия ионов кальция с монослоем в присутствии КП.

Холестерин представляет собой липид с химически инертной ОН-группой, которая вряд ли связывает кальций и гидратируется. Холестерин может существенно менять структуру липидной мембраны и монослоя, делая их более жесткими и стабильными. Обра-

зование комплекса металла с органическими лигандами предполагает определенное пространственное расположение лигандов относительно иона металла. Холестерин препятствует нормальной организации липидов для эффективного связывания кальция, поскольку монослой становится более жестким, а их подвижность и ориентация ограничена. Таким образом, способность связывать кальций у такого монослоя существенно ослабевает, а эффект конденсации этого монослоя исчезает вследствие стабилизации структуры липидного монослоя холестерином и уменьшения связывания ионов кальция молекулами липидов с образова-

Таблица 3. Значения максимума/минимума модуля сжатия для монослоев яичного желтка, яичного желтка с холестерином на НФБ при добавлении ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , ЭГ, ДМСО, сахарозы

Монослои	Максимум/минимум модуля сжатия, мН/м			
	Без КП	ЭГ	ЭГ, ДМСО	ЭГ, ДМСО, сахароза
Желток	92/16	73/24	65/20	48/10
Желток + $\text{Ca}^{2+}$	88/14	60/10	48/10	40/11
Желток + холестерин + $\text{Ca}^{2+}$	80/16	52/16	40/12	-/8

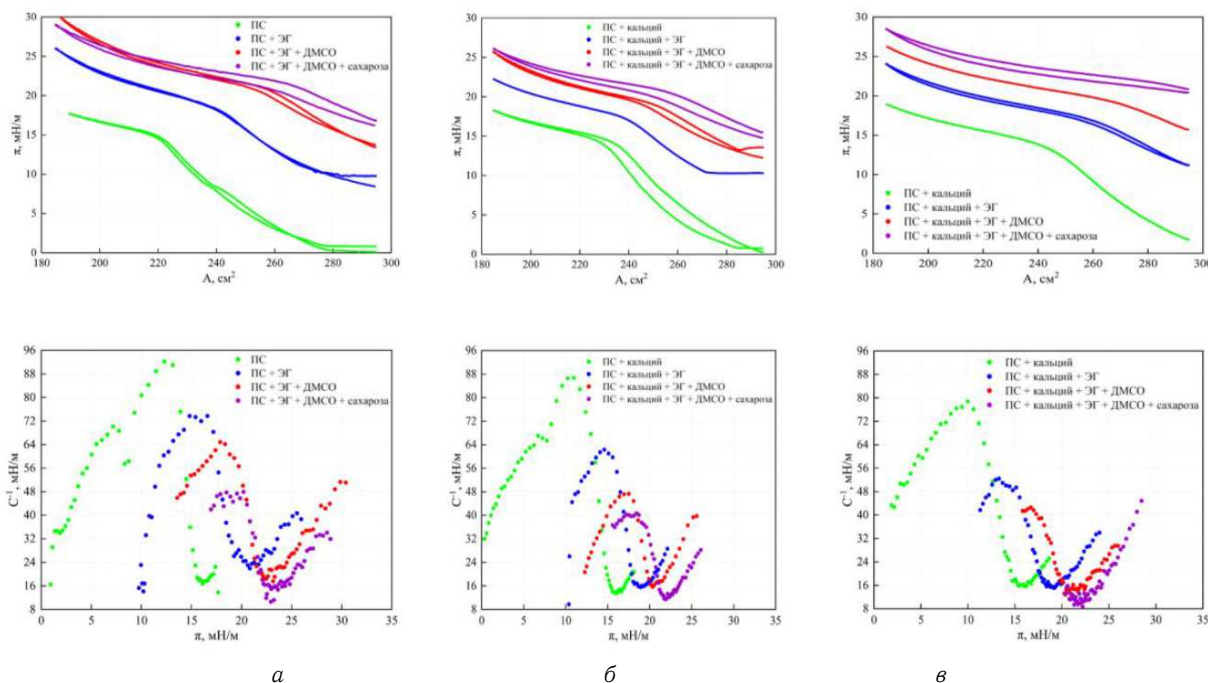


Рис. 6. Верхний ряд:  $\pi$ - $A$ -изотермы для монослоев желтка без кальция в субфазе (а), монослоев желтка с кальцием в субфазе (б) и монослоев желток-холестерин с кальцием в субфазе (в) на ПС (зеленый) с последующим добавлением ЭГ (синий), ДМСО (красный), сахарозы (фиолетовый). Нижний ряд: зависимости модулей сжатия от значений поверхностного давления для  $\pi$ - $A$ -изотерм, которые показаны в верхнем ряду данного рисунка

нием конденсированных структур.

При последовательном добавлении КП наблюдается увеличение площади, занимаемой монослоем. Значение МС при этом уменьшается для каждого случая, что можно увидеть на рис. 6 (нижний ряд) и в табл. 3.

Максимум и минимум МС также уменьшаются при добавлении КП под монослой желток + холестерин: без КП (80 и 16 мН/м) → ЭГ (52 и 16 мН/м) → ЭГ + ДМСО (40 и 12 мН/м) → ЭГ + ДМСО + сахароза (- и 8 мН/м). Минимальные значения МС при добавлении кальция достигаются в ряду без КП → ЭГ → ЭГ + ДМСО → ЭГ + ДМСО + сахароза при 15.0–18.5–21.0–22.0 мН/м.

Несмотря на то, что холестерин должен способствовать уплотнению и укреплению мембраны, обеспечивая прочность и устойчивость липидных монослоев, небольшое добавление холестерина в слой (2% т/т) приводит не только к «размягчению» монослоя, но и к

увеличению процессов встраивания и задерживания КП в липидном слое.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние воздействия криопротекторов (этиленгликоля, диметилсульфоксида, сахарозы) на липидный монослой яичного желтка в присутствии холестерина в слое и без него, а также ионов кальция в субфазе, которые могут влиять на эффективность криопротекции.

В данной работе впервые обнаружен эффект существенного увеличения поверхностного давления (уменьшения поверхностного натяжения на ~20 мН/м) при добавлении криопротекторов в систему, представляющую собой липидный монослой на поверхности водной питательной среды. Этот эффект является ре-

зультатом процессов дегидратации липидных молекул и компонентов субфазы в присутствии криопротекторов, и соответствующего изменения характера молекулярных взаимодействий в монослое, а также изменения поверхностной свободной энергии растворов криопротекторов. Такие значительные изменения (уменьшение поверхностной свободной энергии) мембранных систем указывает на эффективную дегидратацию поверхности липидных мембран используемыми в данной работе криопротекторами. Этот эффект может служить индикатором эффективности дегидратации мембран криопротекторами и использоваться для поиска наиболее эффективных и безопасных композиций криопротекторов.

Добавление в такую систему ионов кальция приводит к определенной конденсации монослоя, обусловленной эффективным взаимодействием дегидратированных ионов кальция и молекул липидов. При этом сохраняющаяся характерная форма изотерм сжатия, типичная для монослоев на субфазе, содержащей криопротекторы, указывает на доминирующую роль криопротекторов во взаимодействиях, определяющих форму изотерм сжатия таких монослоев и связанных с процессами дегидратации и изменения поверхностной энергии монослойной системы.

Присутствие холестерина в концентрации 1:50 м/м в монослое желтка ингибирует действие ионов кальция на монослой в присутствии криопротекторов вследствие модификации структуры и свойств липидного матрикса, затрудняющей связывание кальция с монослоем с образованием солевых мостиков, обуславливающих эффект конденсации монослоя.

Следовательно, для уменьшения количества используемых криопротекторов и оказываемой ими токсической нагрузки, можно уменьшать количество ионов кальция и добавлять небольшое количество холестерина в систему.

Данная работа может иметь важное практическое применение в медицине. На основе полученных данных можно сделать рекомендации для заморозки клеток [59], например гамет, стволовых клеток, клеток крови или костного мозга:

1. Замораживаемые клетки отмыть от кальция в среде их инкубации.

2. Уменьшить потребление пищи, богатой витамином D, для пациентов. Витамин D помогает организму усваивать кальций, поэтому ограничение его потребления может помочь уменьшить уровень кальция в организме. Снизить употребление рыбьего жира, сельди, яичных желтков и других продуктов, содержащих высокие концентрации витамина D.

Изучение взаимодействия криопротекторов с ленгмюровскими монослоями актуально как для технологии получения ленгмюровских пленок, так и для их применения в криобиологии. Добавление криопротекторов в структуру ленгмюровских пленок может повысить их криотолерантность и долговечность и расширить диапазон температур их применения, например, в электронике, оптических покрытиях и в других областях применения. Данная работа может помочь определить оптимальные концентрации криопротекторов для максимальной защиты биологических клеток при замораживании.

Получение биосенсоров и диагностических тестов на основе ленгмюровских пленок, содержащих криопротекторы, может позволить значительно расширить диапазон рабочих температур. Полученные результаты также могут быть использованы для формулировки липидного состава мицелл и других мицеллярных технологий для повышения их стабильности при низких температурах. В частности, полученные данные могут использоваться при разработке состава смазок, работающих в широком диапазоне температур.

Другое применение полученных результатов — это создание искусственных клеток на основе везикул и мицелл. Если такие искусственные клетки изначально создавать с криопротекторами в их составе, то они могут быть гораздо более криоустойчивы по сравнению с природными клетками. Данная работа расширит наше понимание влияния криопротекторов на взаимодействие ленгмюровских монослоев с другими биологическими или химическими компонентами на поверхности.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

[1] Kostyaev A.A., Martusevich A.K., Andreev A.A. // *Sci. Rev. Med. Sci.* **6** 54 (2016).  
[2] Kuwayama M., Vajta G., Ieda S., Kato O. // *Reprod. BioMed. Online* **11**, N 5. 608 (2005).  
[3] Watson P.F. // *Reprod., Fertil. Dev.* **7**, N 4. 871 (1995).  
[4] Notman R., Noro M., O'Malley B., Anwar J. // *J. Am. Chem. Soc.* **128**, N 43. 13982 (2006).  
[5] Raju R., Torrent-Burgues J., Bryant G. // *Chem. Phys. Lipids* **231** 104949 (2020).  
[6] Anchordoguy T.J., Cecchini C.A., Crowe J.H., Crowe L.M. // *Cryobiology*. **28**, N 5. 467 (1991).

[7] Kent B., Hunt T., Darwish T. A. et al. // *J. R. Soc., Interface*. **11**, N 95. 20140069 (2014).  
[8] Arnett E.M., Harvey N., Johnson E.A. et al. // *Biochem.* **25**, N 18. 5239 (1986).  
[9] Whaley D., Damiyar K., Witek R.P. et al. // *Cell Transplant.* **30**. 0963689721999617 (2021).  
[10] Abou-Saleh R.H., McLaughlan J.R., Bushby R.J. et al. // *Langmuir* **35**, N 31. 10097 (2019).  
[11] Ghosh N., Roy S., Ahmed M., Mondal J.A. // *J. Mol. Liq.* **266** 118 (2018).  
[12] Wowk B. // *Cryonics*. **28**, N 3. 3 (2007).

- [13] *Simonenko E.Y., Garmaeva S.B., Yakovenko S.A. et al.* // *Biofizika*. **61**, N 2. 316 (2016).
- [14] *Doxastakis M., Sum A.K., de Pablo J.J.* // *J. Phys. Chem.* **109**, N 50. 24173 (2005).
- [15] *Dabkowska A.P., Collins L.E., Barlow D.J. et al.* // *Langmuir*. **30**, N 29. 8803 (2014).
- [16] *Jurak M., Conde J.M.* // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1828**, N 11. 2410 (2013).
- [17] *Yakovenko S.A., Khomutov G.B., Yurova T.V., Tverdislov V.A.* // *Микроэлектроника*. **23**, N 5. 29 (1994).
- [18] *Tverdislov V.A., Khomutov G.B., Yakovenko S.A. et al.* // *Colloids Surf. B*. **5**, N 5. 205 (1995).
- [19] *Khomutov G. B., Yakovenko S.A., Soldatov E.S. et al.* // *Biol. Membr. Cell*. **13**, N 6. 612 (1996).
- [20] *Marchenkova M.A., Dyakova Y.A., Tereschenko E.Y. et al.* // *Langmuir*. **31**. 12426 (2015).
- [21] *Klechkovskaya V.V., Feigin L.A.* // *Crystallogr. Rep.* **43**, N 6. 917 (1998).
- [22] *Rogachev A.V., Novikova N.N., Kovalchuk M.V.* // *Langmuir* **38**, N 12. 3630 (2022).
- [23] *Nobre T.M., Pavinatto F.J., Caseli L. et al.* // *Thin. Solid Films* **593**. 158 (2015).
- [24] *Pedrosa M., Maldonado-Valderrama J., Gálvez-Ruiz M.J.* // *Colloids Surf. B*. **217** 112636 (2022).
- [25] *Mironov E.P., Borodina T.N., Bukreeva T.V.* // *Colloid. J.* **79**, N 4. 508 (2017).
- [26] *Dynarowicz-Lątka P., Hąc-Wydro K.* // *Colloids Surf. B*. **37**(1-2). 21 (2004).
- [27] *Petelska A.D., Naumowicz M.* // *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* **22** 1187 (2017).
- [28] *Smolenceva D.A., Mironova A.G., Sibachin A.V.* // *Mod. Trends Biol. Phys. Chem.* **5**, N 22. 291 (2020).
- [29] *Raju R., Torrent-Burgués J., Bryant G., Pringle J.* // *Aust. J. Chem.* **75**, N 3. 165 (2022).
- [30] *Raju R., Torrent-Burgués J., Bryant G.* // *Chem. Phys. Lipids*. **231**. 104949 (2020).
- [31] *Hughes Z.E., Mark A.E., Mancera R.L.* // *J. Phys. Chem.* **116**, N 39. 11911 (2012).
- [32] *Malajczuk C.J., Hughes Z.E., Mancera R.L.* // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1828**, N 9. 2041 (2013).
- [33] *Chen X., Huang Z., Hua W., Castada H., Allen H.C.* // *Langmuir* **26**, N 24. 18902 (2010).
- [34] *Krasteva N., Vollhardt D., Brezesinski G., Műhwald H.* // *Langmuir* **17**, N 4. 1209 (2001).
- [35] *Chen X., Allen H.C.* // *J. Phys. Chem. A*. **113**, N 45. 12655 (2009).
- [36] *Binder H., Zschornig O.* // *Chem. Phys. Lipids* **115**(1–2). 39 (2002).
- [37] *Averbakh A., Lobyshev V.* // *J. Biochem. Biophys. Methods*. **45**, N 1. 23 (2000).
- [38] *Wydro P.* // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **82** 209 (2011).
- [39] *Wang J., Zhu H.* // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. **207**. 111998 (2021).
- [40] *Wang J., Sun R., Hao C. et al.* // *Chem. Res. Chin. Univ.* **33**, N 3. 447 (2017).
- [41] *Balla T., Gulyas G., Ju Kim Y., Pemberton J.* // *Curr. Opin. Physiol.* **17**. 1 (2020).
- [42] *Brown K.M. , Seelig J.* // *Nature*. **269**, N 5630. 721 (1977).
- [43] *Huster D., Arnold K., Gawrisch K.* // *Biophys. J.* **78**. 3011 (2000).
- [44] *Pedersen U.R., Leidy C., Westh P., Peters G.H.* // *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* **1758**, N 5. 573 (2006).
- [45] *Martin-Molina A., Del Castillo-Santaella T., Yang Y., Maldonado-Valderrama J.* // *Coatings*. **9**, N 8. 474 (2019).
- [46] *Korchowiec B., Paluch M., Corvois Y., Rogalska E.* // *Chem. Phys. Lipids*. **144**. 127 (2006).
- [47] *Ikonen E.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**. 125 (2008).
- [48] *Mills T.T., Huang J., Feigenson G.W., Nagle J.F.* // *Gen. Physiol. Biophys.* **28**. 126 (2009).
- [49] *Zhang X., Barraza K.M., Beauchamp J.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, N 1. 3255 (2018).
- [50] *Trøder J., Widder K., Kerth A. et al.* // *Cells*. **9**, N 3. 529 (2020).
- [51] *Wydro P.* // *Colloids Surf., B* **103**. 67 (2013).
- [52] *Bacuelos-Frias A., Castaceda-Montiel V.M., Alvizo-Paez E.R. et al.* // *Front. Phys.* **9**. 636149 (2021).
- [53] *Jurak M.* // *J. Phys. Chem. B*. **117**, N 13. 3496 (2013).
- [54] *Hasegawa T.* // *Yakugaku zasshi: J. Pharm. Soc. Jpn.* **120**, N 1. 91 (2000).
- [55] *Rocha J.M., Caseli L.* // *Colloids Surf., B* **116**. 497 (2014).
- [56] *Roy A., Dutta R., Kundu N. et al.* // *Langmuir*. **32**, N 20. 5124 (2016).
- [57] *Khomutov G.B., Yakovenko S.A., Soldatov E.S. et al.* // *Membr. Cell. Biol.* **10**, N 6. 665 (1997).
- [58] *Sukhodolov N.G.* Physicochemical properties and structure of Langmuir-Blodgett films containing transition metal ions, Doctoral dissertation St. Petersburg State University, Russia, 2017
- [59] *Kosorukova I.S., Polzikov M.A., Yutkin E.V. et al.* // *J. N. N. Blokhin RCRC RAMS*. **20**, N 2. 68 (2009).

## The influence of cholesterol and calcium ions on the interaction of cryoprotectors with a biological membrane model

V.Y. Svechnikova<sup>1,2,a</sup>, O.V. Mishukova<sup>1,3</sup>, A.G. Mironova<sup>4</sup>, G.B. Khomutov<sup>2</sup>, M.A. Marchenkova<sup>1</sup>, S.A. Yakovenko<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup>National Research Centre «Kurchatov Institute»  
Moscow, 123182, Russia

<sup>2</sup>Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. Moscow, 119992, Russia

<sup>3</sup>Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology, RUDN University  
Moscow, 117198, Russia

<sup>4</sup>Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences  
Moscow, 119334, Russia

<sup>5</sup>In Vitro Fertilization Clinic, Altravita. Moscow, 119186, Russia  
E-mail: <sup>a</sup>svechnikova.vi21@physics.msu.ru



In this work, we studied the effects of three cryoprotectors — ethylene glycol, dimethyl sulfoxide, sucrose — on the compression isotherms of egg yolk Langmuir monolayers both in the presence and in the absence of cholesterol in the monolayer. The influence of calcium ions from the subphase affecting the effectiveness of cryoprotection on  $\pi$ -A-isotherms is also examined. In addition, the elastic properties of the obtained monolayers are investigated by calculation and comparison the compression modulus of the monolayer. The scientific novelty of the work is in consideration of a complex biosimilar system (an egg yolk monolayer, cholesterol and their mixtures) on the surface of the aqueous solution of the nutrient mixture and obtaining information about the specific interaction of different cryoprotectors with lipid membranes. We found that when calcium ions and cryoprotectors are simultaneously added to the subphase, they block each other's influence on the lipid monolayer and reduce the effectiveness of cryoprotection. Cholesterol in the yolk in a ratio of 1:50 m/m changes the properties of the monolayer, which leads to increased action of cryoprotectors. Also, for the first time, the effect of a significant increase in surface pressure (by  $\sim 20$  mN/m) was detected when cryoprotectors were added to the system under consideration. This effect can serve as an indicator of the effectiveness of membrane dehydration by cryoprotectors and can be used to find the most effective and safe cryoprotector compositions. Since the study of the mechanisms of calcium interaction (the most important signaling cation) with biological membrane and membrane-like systems is important for understanding the various effects caused by medicinal and biologically active drugs at the cellular level, the study is of interest for various fields of biophysics and biomedicine.

PACS: 82.45.Mр.

*Keywords:* cryoprotectants, biological membrane model, lipid Langmuir monolayer, egg yolk, cholesterol, calcium ions.

*Received 10 June 2024.*

#### **Сведения об авторах**

1. Свечникова Виктория Юрьевна — лаборант, студентка; e-mail: svechnikova.vi21@physics.msu.ru.
2. Мишукова Олеся Вадимовна — инженер-исследователь, студентка; e-mail: olesia3251@mail.ru.
3. Миронова Анна Геннадьевна — аспирантка; e-mail: agm90@mail.ru.
4. Хомутов Геннадий Борисович — доктор физ.-мат. наук, профессор; e-mail: gbk@mail.ru.
5. Марченкова Маргарита Александровна — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник; e-mail: marchenkova@crys.ras.ru.
6. Яковенко Сергей Александрович — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник, ген. директор клиники ЭКО «АльтраВита»; e-mail: 7909018@mail.ru.