

Unele aplicații ale markerilor de spin în studiul albuminei serice și al membranelor biologice

GHEORGHE BENGA¹, IOANA-COSTINA DÂN², OREANU², MARIA FRANGOPOL³, PETRE T. FRANGOPOL³

¹Catedra de Biologie Celulară și Moleculară, ²Catedra de Radiologie Maxilo-dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Str. Emil Isac, Nr. 13, 400023, Cluj-Napoca, România

³Institutul de Fizică și Inginerie Nucleară București-Măgurele, România

The main contributions of the groups lead by the two main authors (Gh.B and P.T.F.) in the field of spin labeling ESR in studies of serum albumin and of some biomembranes are briefly described, mentioning some priorities. These are: the description in Romanian publications of the methodology for using spin labels in studies of proteins and biomembranes using the type ART-6 ESR spectrometer manufactured in Romania; the adaptation to this ESR spectrometer of a computerized system for the acquisition and processing of data; the application of a newly synthesized spin label, reactive with SH groups, in the study of serum albumin; the finding of the effects of 25-hydroxycholesterol at low concentrations (0,5-10 %) on egg yolk lecithin; the finding of a relatively high fluidity of human liver microsomes.

Keywords: electron spin resonance; spin labels; biomembranes; serum albumin; cytochrome oxidase; liposomes; microsomes; human liver; rat liver; phenothiazines, cholesterol

Evoluția cunoștințelor privind structura și funcțiile membranelor biologice (biomembrane), un domeniu al „membraneologiei” a cunoscut patru perioade istorice [1]: perioada „timpurie” (înainte de 1940), perioada „clasică” (1940-1970), perioada „modernă” (1970-1984) și „membraneologia moleculară” (după 1985). În primele două perioade progresele au fost lente, deoarece majoritatea biomembranelor nu se văd la microscopul optic, numai la microscopul electronic, ceea ce a devenit posibil abia pe la mijlocul perioadei „clasice”. Spre finalul acesteia, dar mai ales în perioadele „modernă” și „moleculară”, pe lângă tehnicile morfologice amintite mai sus, apar altele noi, printre care și cele spectroscopice, înregistrându-se progrese revoluționare în privința structurii (caracterizarea compoziției proteice și lipidice, formularea modelului de structură în mozaic fluid lipido-proteic), și a funcțiilor (identificarea enzimelor și transportorilor, apoi purificarea și reconstituirea lor în modele de membrane, de pildă în liposomi). Aceste progrese sunt descrise pe larg în prima monografie românească privind biomembranele [2] și în diferite capitole ale unor volume cu mai mulți autori [3].

Metodele spectroscopice analizează modalitatea interacțiunii radiației electromagnetice cu materia folosind instrumente specifice numite spectroscopice [4]. Una dintre variantele cele mai sensibile de spectroscopie este cea de rezonanță electronică de spin (RES) sau rezonanță paramagnetică electronică (RPE), descoperită de E. Zavoiski în 1945 (cit. de [5]) care detectează radicalii liberi și/sau alte specii paramagnetice. Un radical liber este o specie moleculară paramagnetică ce conține un electron neîmperecheat. Materialele biologice nemodificate se pot studia prin RES numai atunci când conțin centri paramagnetici (din categoria cărora fac parte și radicalii liberi). Răspândirea naturală a paramagnetismului în materialele biologice (deci și în biomembrane) este relativ scăzută. Această situație naturală dezavantajoasă a fost transformată într-un avantaj în 1965 [6] prin încorporarea

unor grupări paramagnetice (radicali liberi stabili) în sistemele biologice studiate, radicali ce au „marcat cu spin” aceste materiale, fiindcă markerii pot fi detectați prin spectroscopie de RES. În aceste condiții markerii de spin (MS) devin „sonde” sau „reporteri” la nivel molecular, spectrele lor RES conțin informații și „raportează” atât asupra unor caracteristici ale micro-mediului molecular ambiant, cum este polaritatea, cât și asupra mobilității și naturii orientărilor și mișcărilor moleculare, a mișcărilor de structură și/sau conformație [4, 7, 8]. Bazele teoretice și modalitățile practice de lucru folosind spectroscopia RES cu MS au fost descrise anterior [9]. În ultimii ani această metodologie se bucură de un interes crescut [10].

În studiul biomembranelor ca MS se folosesc aproape exclusiv radicali liberi de tip nitroxilic, având ca grupare paramagnetică gruparea nitroxil (=N-O), la a căror sinteză E. G. Rozantsev a avut rol de pionier [11].

Scopul acestei lucrări este de a descrie unele contribuții ale noastre în studiul albuminei serice și al biomembranelor folosind MS, cu sublinierea contribuțiilor prioritare în România și pe plan internațional și de a descrie o perfecționare a sistemului de înregistrare, achiziție și prelucrare a datelor cu spectrometrul RES de tip ART-6.

Partea experimentală

Structura chimică a unor MS folosiți în cercetările noastre este redată în figura 1. Unii MS (de pildă cei notați cu I, IV și V în fig. 1) se introduc prin difuziune în membranele biologice (liposomi sau membrane naturale). Alții (de pildă cei notați cu II și III în fig. 1) se leagă covalent de proteinele membranelor celulare și anume de grupările SH din proteine. Detaliile privind modul concret de marcare sunt redate în legenda figurilor.

Ca modele de membrane s-au folosit liposomi multilamelari preparați din ovolectină, după cum se descrie în legenda figurii 5.

Ca membrane naturale s-au folosit membrane microsomale hepatice de om și obolan și membrane eritrocitare. Microsomi sunt vezicule formate prin

* email: gbenga@umfcluj.ro; Tel.: (+40) 0264 594373

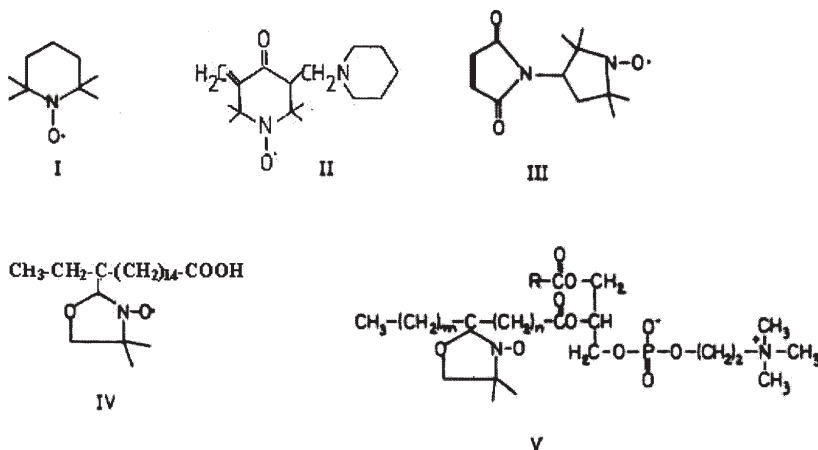


Fig. 1. Structura chimică a unor markeri de spin folosiți în cercetările pe proteine și biomembrane I: TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil); II (3-metilen-5-(piperidin-N-metil)-4-oxo-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxil), III (*N*-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-maleimida); IV: 16 NS (derivatul *N*-oxil-4', 4'-dimetil-oxazolidinic al acidului 16-cetostearic; V (marker de spin fosfolipidic)

fragmentarea membranelor reticulului endoplasmic în cursul omogenizării țesutului și fracționării subcelulare prin centrifugare diferențială. Pentru prepararea microsomilor s-au folosit fragmente de țesut hepatic uman obținut prin biopsie intraoperatorie sau ficat de obolan, după cum s-a descris anterior [12-15]. Membranele eritrocitare au fost preparate prin procedee descrise anterior [16-19].

Purificarea citocromoxidazei mitocondriale bovine s-a făcut prin metodele descrise anterior [20-22].

Dozarea proteinelor din membrane s-a făcut prin metoda Lowry și colab. [23].

Înregistrarea spectrelor s-a făcut la 9.5 GHz, cu spectrometrul RES de tip ART-6 produs de IFIN București-Măgurele, cuplat cu un înregistrator X-Y Sefram tip TGM-164 sau cu un calculator personal de tip laptop.

În majoritatea cazurilor proba marcată a fost introdusă în tuburi capilare, care au fost închise la flacără. Pentru înregistrarea spectrelor, tuburile capilare conținând probele au fost introduse pe rând într-un tub de cuarț care a fost plasat în poziție verticală în cavitatea spectrometrului.

Rezultate și discuții

Contribuții la dezvoltarea utilizării markerilor de spin în studii pe biomembrane în România

Spre a facilita utilizarea în România a MS în studiul biomembranelor (și nu numai) am descris în premieră națională această metodologie [2, 4, 24], prezentând în detalii aspectele metodologice, atât cele teoretice, cât și cele practice, inclusiv cele privind modul concret de lucru cu spectrometrul RES de tip ART-6.

În cazul MS nitroxilici spinul electronului neîmperecheat interacționează cu spinul magnetic nuclear al ^{14}N (egal cu 1). Momentul magnetic al ^{14}N se poate orienta paralel, antiparalel sau perpendicular față de momentul magnetic al electronului neîmperecheat. Prin urmare, fiecare din cele două nivele energetice electronice (apărute prin scindarea în câmp magnetic a nivelului energetic al electronului) se va scinda în trei nivele (fig. 5.19 din ref. [2]). Teoretic, ar fi posibile șase tranziții RES, dar practic se observă doar trei (acelea care duc la modificarea orientării momentului magnetic electronic fără ca orientarea momentului nuclear să fie modificată). Se vor observa deci trei linii RES, extremele fiind separate de linia mijlocie prin aceeași distanță numită scindarea hiperfină a nucleului de azot.

În cazul în care MS efectuează mișcări foarte rapide izotrope spectrul RES este compus din trei linii ascuțite, acest gen de spectru este caracteristic pentru MS aflați în soluții (în apă sau în solvenți organici) la temperatura camerei. Linia din mijloc se notează cu 0, cea de la valoarea mai mică a câmpului magnetic cu +1, iar cea de la valoarea mai mare a câmpului magnetic cu -1 (fig. 2).

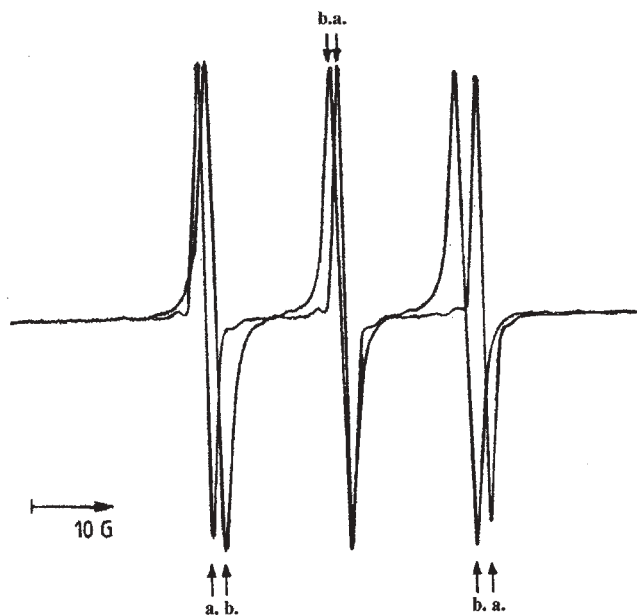


Fig. 2. Spectrul RES al markerului TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil, notat cu I în fig. 1) în apă (a) și benzen (b) la temperatura camerei; concentrația TEMPO este de 10^{-3}M

Dacă mișcarea MS se produce într-un mediu cu vâscozitate mare, apare o deformare a celor trei linii, din ce în ce mai accentuată, pe măsură ce crește vâscozitatea mediului. Deformarea liniilor se datorează faptului că mișcarea MS nu mai este acum suficient de rapidă pentru a putea „terge” efectele anizotrope. La un spectru imobilizat se observă clar numai linia de mijloc (0), în timp ce la valoarea mai mică a câmpului magnetic se observă o deflexiune pozitivă, iar la valoarea mai mare a câmpului magnetic se observă o deflexiune negativă (fig. 4).

Parametrii folosiți pentru evaluarea cantitativă a mobilității markerului diferă în cazul spectrelor mobile față de cele imobilizate. Astfel, atâta timp cât cele trei linii ale spectrului RES sunt clar vizibile, se poate calcula timpul de rotație corelațională (τ_c) după formula:

$$\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} W_0 (\sqrt{h_0 / h_{-1}} - 1) \quad (1)$$

unde W_0 este lărgimea liniei de mijloc (0), iar h_0 și h_{-1} sunt înălțimile liniilor 0 și -1. Adesea se calculează numai raportul înălțimii unor linii și acestea se reprezintă grafic în funcție de alți parametri experimentali ce ne interesează (de exemplu temperatura).

În cazul spectrelor imobile, se calculează distanța în gauss dintre cele două deflexiuni extreme ale spectrului

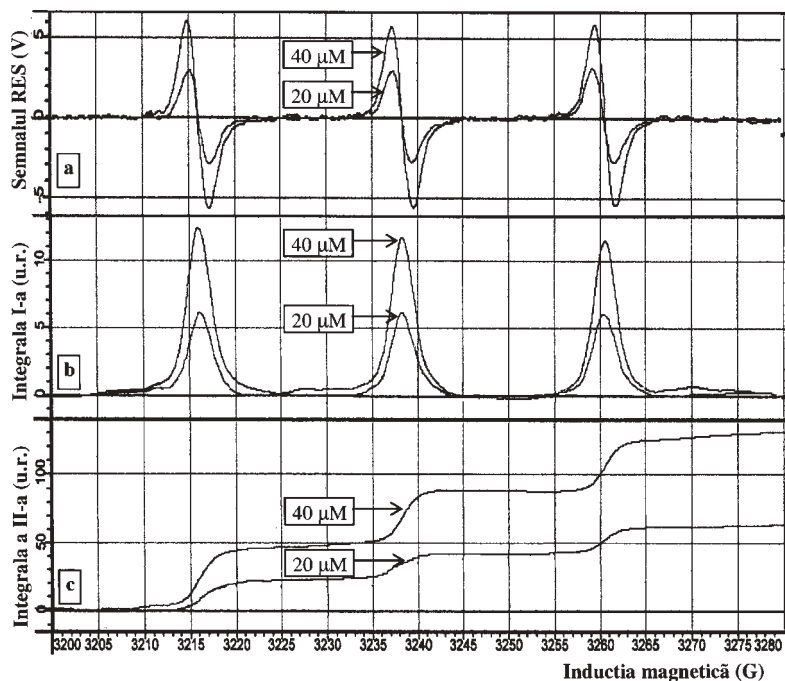


Fig. 3. Înregistrarea computerizată a spectrului RES al markerului de spin TEMPO la concentrațiile de 40 μM și 20 μM , alături de două prelucrări cantitative ale acestuia: **a** - semnalul RES; **b** - curba de absorbție a microundelor, ilustrată de integrala de ordinul 1; **c** - cantitatea de energie absorbită, care este proporțională cu cantitatea de radicali liberi din probă, dată de integrala de ordinul 2. **u.r.** - unități relative. Condiții de lucru: cuva - de cuarț plată (100 μL); baleiaj: 100 G; timp de baleiaj 120 s; modulație: 2 G, amplificarea: 10^3 ; constanta de timp: 0,3s

RES (parametrul $2T_{\parallel}$, în fig. 4). Cu cât mi^ocareă MS este mai rapidă, valoarea lui π este mai mică. Cu cât mi^ocareă MS se face mai lent, cu atât valoarea lui $2T_{\parallel}$ este mai mare.

Adaptarea la spectrometrul RES de tip ART-6 a unui sistem computerizat de achiziție și prelucrare a datelor

În prezent, spectrometrul RES de tip ART-6 aflat în dotarea Catedrei de Biologie Celulară și Moleculară a UMF Cluj-Napoca este echipat cu un sistem computerizat de achiziție și prelucrare a datelor, compus din interfața și programul "Science Workshop 750" (Pasco Scientific, Roseville, CA, USA) care funcționează cu sisteme de operare Windows 95 sau superioare. Ansamblul este extrem de versatil, fiind dedicat uzului științific general. Interfața are 3 intrări analogice (A, B și C), diferențiale, independente, fiecare cu trei trepte de sensibilitate de ± 10 V, $\pm 1,0$ V sau $\pm 0,1$ V. Precizia măsurătorilor este de 12 bit, adică 4,9 mV, 0,49 mV și 0,049 mV, respectiv, pentru cele trei trepte. Cu interfața cuplată la calculator prin ieșirea serială și toate intrările analogice activate, la frecvențe de e^oantionare de până la 100 măsurători/secundă, sistemul poate achiziționa un volum de date limitat doar de memoria calculatorului. Momentele începerii și încetării e^oantionării pot fi stabilite în funcție de valori analogice ale semnalelor de intrare sau digital, prin semnale aplicate la unul din cele 4 canale digitale ale interfeței.

Înregistrarea semnalelor RES, precum și a datelor necesare prelucrării acestora, au fost făcute conectând interfața la spectrometru după cum este descris în continuare. Intrarea A a fost cuplată la ieșirea Y (semnal RES) a spectrometrului, domeniul de măsură fiind ales în funcție de valoarea semnalului și de raportul semnal/zgomot. Intrarea B înregistrează tensiunea de baleiaj furnizată de ieșirea X a spectrometrului, destinată inițial cursei orizontale a unui înregistrator X-Y analogic. Această tensiune mai servește la declanșarea și încetarea achiziției de date prin pragurile de tensiune $-8,0$ V, respectiv, $+0,8$ V. Intrarea C a fost cuplată la o ieșire obținută din interiorul spectrometrului, prin recoltarea tensiunii de pe bobina etalon de control a câmpului magnetic. Această tensiune urmărește linear, inducția magnetică în care se află cavitatea rezonantă, iar valorile ei permit etalonarea, în gauss, a scalei orizontale a spectrului. În timpul unei determinări programul înregistrează și tablează valorile tensiunilor de la toate cele trei intrări.

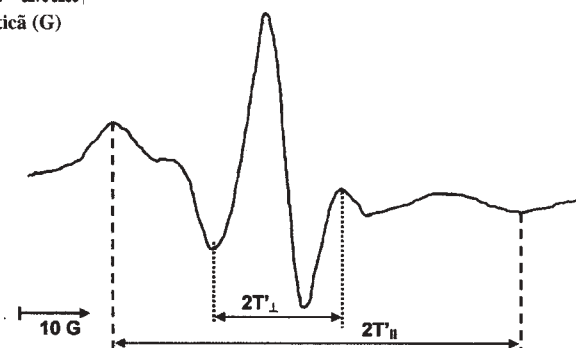


Fig. 4. Spectrul RES al markerului 3-metilen-5-(piperidin-N-metil)-4-oxo-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxil (notat MS II în fig. 1), în soluție de albumină după dializă (24 h la 0°C față de apă distilată).

Pentru studii cu MS în soluție este utilizată și o cuvă plată ("flat cell") din cuarț cu volumul activ de 100 μL . Prin creșterea cantității de substanță din cavitatea rezonantă, această cuvă permite măsurarea semnalului la concentrații mai reduse cu circa un ordin de mărime decât în tuburi capilare, fără ca apa din celulă să afecteze semnificativ factorul de calitate al cavității. Astfel, la o frecvență de e^oantionare de 50 Hz, semnalul RES poate fi înregistrat cu acuratețe în 2 sau 3 min (6000 respectiv 9000 de puncte) cu valori ale amplitudinii de modulație a câmpului magnetic de 1 - 2 gauss.

Sistemul computerizat oferă avantajele măsurătorilor mai rapide, reprezentărilor grafice în coordonate etalonate, calculului exact al parametrilor spectrali, supunerilor și comparațiilor de spectre, precum și ale prelucrărilor matematice, cum sunt netezirile, adăruirile, substrațiile, calculele statistice, integrările, etc. O ilustrare a rezultatelor ce pot fi obținute este dată în figura 3.

Aplicarea în marcarea albuminei serice a unui nou marker de spin pentru grupările SH din proteine

În colaborare cu grupul dr.-ului Rozantsev de la Institutul de Fizică Chimică al Academiei URSS din Moscova s-au efectuat cercetări folosind un MS nou sintetizat, de tipul bazelor Mannich, anume 3-metilen-5-(piperidin-N-metil)-4-oxo-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxil, notat cu II în figura 1. Sinteza s-a făcut prin aminometilarea 4-oxo-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxil cu formaldehidă și piperidină în condiții blânde. MS II a fost folosit apoi pentru marcarea albuminei serice și a membranelor eritrocitare [25].

În cazul albuminei serice marcată cu MS II (1 mg adăugat la 1 ml soluție de albumină 8%, agitare 60 min la 0°C) spectrul RES este mobil, asemănător cu cel al TEMPO dizolvat în apă (la concentrația de $5 \cdot 10^{-2}$ M). După ce se îndepărtează excesul de MS II prin dializă (24 h la 0°C față de apă distilată) se obține un spectru puternic imobilizat (fig. 4), fără nici o componentă mobilă a spectrului RES. Comparând acest spectru al MS II legat de albumină cu cel al unui marker derivat de maleimidă (notat cu III în fig. 1) legat de albumină în aceleași condiții studiate anterior [26] se observă o diferență mare: în cazul MS III apare și o componentă mobilă a spectrului RES. Concluzia este că MS II se leagă mai puternic de proteine comparativ cu MS III.

De aceea considerăm că MS II va fi foarte util în cercetarea unor modificări conformaționale ale albuminei serice, având în vedere că asemenea modificări au fost propuse ca un test nou în diagnosticul și monitorizarea cancerului [27].

Studiul interacțiunilor dintre lipide și proteine în complexul citocromoxidazei

Citocromoxidaza purificată din mitocondriile de miocard bovin fusese studiată [28] ca un model de complex al unei proteine integrale de membrană având fosfolipide asociate; studiile s-au făcut cu acizi grași marcați cu spin, pe complexul purificat inițial (având un raport mare lipide/proteine), precum și după extracția lipidelor. S-a constatat că în cazul complexului inițial mobilitatea MS era mare, după extragerea cât mai completă a lipidelor MS apărea imobilizat. Autorii au conchis că lipidele atașate de proteină sunt complet imobilizate, formând așadar numitul „strat de graniță” („boundary layer”).

Noi am studiat complexul citocromoxidazei cu lipidele asociate folosind ca MS atât acizi grași, cât și fosfolipide. Folosind fosfolipide marcate cu spin se observă o componentă mobilă a spectrului RES și la nivelul minim de lipide în complex, în condițiile în care acidul gras MS era complet imobilizat. Concluzia este că lipidele reziduale din complex, așadar numitul „strat de graniță” nu sunt complet imobilizate, în anumite condiții putând avea mobilitate considerabilă [20-22]. Aceste rezultate completează cunoștințele privind interacțiunile dintre proteine și lipide în biomembrane [29-32].

Studii pe liposomi

Markerul TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil), notat cu I în figura 1, a fost folosit de mulți autori pentru evaluarea tranziției termice a unor fosfolipide sintetice din faza de gel în faza fluidă (de cristal lichid) și pentru evaluarea fluidității unor biomembrane naturale [2, 9, 29].

Liposomii multilamelari (dispersii ale fosfolipidelor în apă), precum și microsomi (vezicule de membrană) prezintă două medii cu polarități diferite: apă, pe de o parte, lipidele membranei (mediu hidrofob) pe de altă parte. Figura 5 redă un astfel de spectru, linia H corespunzând markerului din lipide, iar linia P markerului din apă.

Solubilitatea markerului TEMPO în lipidele membranei depinde însă de fluiditatea acestora, solubilitatea este mult mai mare în lipidele aflate în faza fluidă (cristal lichid) față de cele aflate în faza de gel. Creșterea fluidității lipidelor duce la creșterea numărului de molecule de TEMPO din faza hidrofobă a membranelor, ceea ce se manifestă prin creșterea amplitudinii liniei H. Invers, scăderea fluidității lipidelor determină excluderea TEMPO din membrană și scăderea amplitudinii liniei H. De aceea parametrul spectral $f = H/(H+P)$, care constituie o măsură a coeficientului de partiție lipide/apă pentru markerul

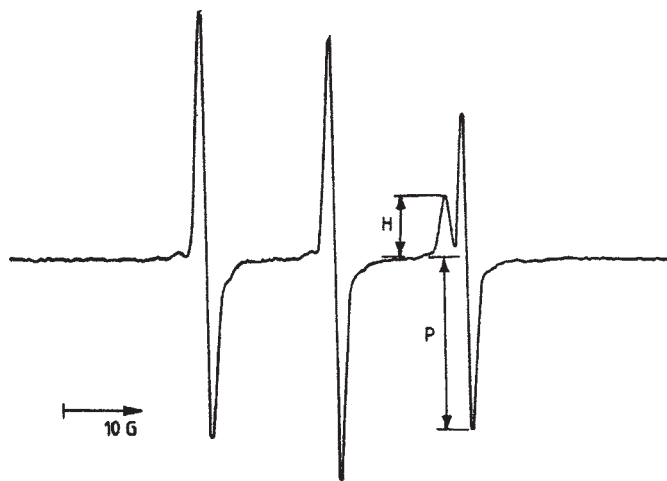


Fig. 5. Spectrul RES al markerului TEMPO (notat cu I în fig. 1) încorporat în liposomi multilamelari de ovoidicitină. S-a dizolvat ovoidicitina în amestec de cloroform: metanol (2:1, v/v), la o concentrație de 32 mg/mL. S-au indus volume de câte 100 μL din această soluție în flacoane curate, s-a evaporat solventul sub curent de azot, apoi s-au adăugat câte 100 μL apă bidistilată, iar lipidele au fost dispersate mecanic la temperatura camerei prin agitare cu o spatulă din oțel inoxidabil, până la obținerea unei suspensii cu aspect lăptos

TEMPO, reprezintă în același timp și o măsură a fluidității membranelor. Cu ajutorul TEMPO și al unor derivați de acizi grași (de tipul IV din fig. 1) am studiat efectele colesterolului (COL) și ale 25-hidroxicolesterolului (25-COL) pe liposomi de ovoidicitină. S-a constatat că 25-COL are efecte la concentrații mici (0,5-1%) similare cu cele ale COL la concentrații de 10%. Acest lucru are importanță mare, fiindcă 25-COL se formează prin oxidarea COL în alimentele congelate păstrate timp îndelungat și se pot corela modificările biomembranelor la nivel molecular cu efectul angitoxic și aterogen al 25-COL observat in vivo.

Studii pe microsomi

În cazul membranelor naturale temperatura la care apar discontinuitățile în reprezentarea parametrului f în funcție de temperatură depinde de fluiditatea membranei. Cu cât membrana este mai fluidă, cu atât discontinuitatea apare la o temperatură mai joasă.

Noi am studiat prin această metodă membranele microsomale izolate din ficatul uman comparativ cu cele de obolan. Am constatat că temperatura la care apare discontinuitatea la reprezentarea parametrului f este cu aproximativ 10° C mai mică în cazul microsomiilor umani față de cei de obolan [15]. Aceasta denotă o fluiditate mai mare a membranelor microsomale umane față de cele de obolan. Din studiul compoziției lipidice a celor două tipuri de microsomi a reieșit că în cazul omului membranele microsomale conțin de două ori mai multe lipide față de cele de obolan, iar în ceea ce privește compoziția în acizi grași a fosfolipidelor membranei la om există o cantitate mai mare de acid linoleic (ce are 18 atomi de carbon și două legături duble) și mai mică de acid arahidonic (20 atomi de carbon și patru legături duble) față de obolan. Aceasta determină un grad de nesaturare al lipidelor membranei mai mic la om față de obolan; ar fi de așteptat ca membranele de la obolan să fie mai fluide, dar experiența a dovedit contrariul. Interpretarea noastră a fost aceea că fluiditatea mai mare a membranelor microsomale umane se datorează unei imobilizări mai mici a lipidelor membranei de către proteine, prin faptul că raportul dintre lipide și proteine este dublu în cazul microsomiilor umani.

Aceste informații completează datele anterioare privind fluiditatea mai mare a membranelor mitocondriale hepatice umane comparativ cu cele de °obolan, cu diferențe similare în privința raportului lipide/proteine °i compoziția în acizi gra°i a fosfolipidelor membranei la cele două specii.

Concluzii

Prin cercetările noastre am contribuit la dezvoltarea utilizării markerilor de spin în studii pe biomembrane, inclusiv a utilizării spectrometrului RES ART-6 produs în România. S-a adaptat la spectrometrul RES de tip ART-6 un sistem computerizat de achiziție °i prelucrare a datelor.

Un marker de spin pentru grupările SH nou sintetizat, 3-metilen-5-piperidin-N-metil-4-oxo-2,2,6,6,-tetrametil-piperidin-1-oxil, (notat cu II în Fig. 1), a fost folosit pentru marcarea albuminei serice. S-a constatat că MS II se leagă mai puternic de albumină comparativ cu markerul derivat de maleimidă N-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)-maleimida (notat cu III în Fig. 1) ce se folosea până atunci în asemenea studii. Deci MS II este mai potrivit pentru studii modificărilor conformaționale ale proteinelor purificate.

Complexul citocromoxidazei mitocondriale cu lipidele asociate a fost investigat cu acizi gra°i MS °i fosfolipide MS. S-a constatat că utilizarea fosfolipidelor MS permite evidențierea unei componente mobile a spectrului RES chiar °i după extragerea fosfolipidelor din complex până la valori sub 0,2 mg lipide/mg proteine. Deci lipidele reziduale din complex, a°a numitul „strat de graniță” nu sunt complet imobilizate, spre deosebire de afirmațiile altor cercetători.

Studiile pe liposomi au arătat că 25-hidroxicolesterolul influențează membranele la concentrații mici (0,5-1%), ceea ce se poate corela cu efectul angiotoxic °i aterogen al acestui compus.

Markerul TEMPO a fost folosit pentru evaluarea fluidității membranelor microsomale hepatice umane comparativ cu cele de °obolan. S-a constatat o fluiditate mai mare a membranelor umane, de°i gradul de nesaturare al fosfolipidelor membranei este mai mare la °obolan. Aceasta s-a interpretat ca fiind datorată unei imobilizări mai mici a lipidelor membranei de către proteine la om, prin faptul că raportul dintre proteine °i lipide este dublu față de °obolan.

Mulțumiri: Autorii mulțumesc tuturor colaboratorilor coautori la lucrările citate în referințe, d-lui prof. dr. Manase Dăn°oreanu, d-nei biolog Adina Chi°, d-lui chimist Radu Munteanu (Universitatea de Medicină °i Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca) pentru ajutorul dat la pregătirea manuscrisului, Ministerului Învățământului, Academiei de Științe Medicale din România, precum °i Welcome Trust (Marea Britanie) pentru sprijinul financiar.

Bibliografie

1. BENGĂ, GH., Cell Biol. Int., **27**, 2003, p. 701
2. BENGĂ, GH., Biologia moleculară a membranelor cu aplicații medicale, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1979
3. BENGĂ, GH., (Ed.) Structure and properties of cell membranes, **I-III**, CRC Press, Boca Raton, 1985
4. FRANGOPOL, PT., FRANGOPOL, M., IONESCU, M.S., POP, V.I., BENGĂ, GH., Markerii de spin. Aplicații în biologie. Pr. CEFIZ RB-3, 1980, p. 1-66.
5. URSU, I., Rezonanța electronică de spin, Ed. Academiei R.S. România, București, 1965
6. HAMILTON, C.L., McCONNELL, H.M., Spin Labels, in „Structural Chemistry and Molecular Biology”, W. H. Freeman, A. Rich, N. Davidson (Eds.), San Francisco, 1968, p. 115

7. FRANGOPOL, PT., BENGĂ, GH., IONESCU, M.S., FRANGOPOL, M., POPESCU, O., POP, V.I., Bul. Acad. Șt. Med., nr. 1, 1982, p. 39-49.
8. BERLINER, L.J. (Ed.), Spin Labeling. Theory and Applications, **1**, Academic Press, New York, 1976
9. BENGĂ, GH., Spin labelling, in „Biochemical Research Techniques”, J. Wrigglesworth (Ed.), John Wiley & Sons, London, 1983, p. 79
10. BERLINER, L.J., Advances in the spin labeling method in „EPR in the 21st Century Basics and Applications to Material, Life and Earth Sciences”, A. Kawamori, J. Yamauchi and H. Ohta (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2002, p. 503
11. ROZANTSEV, E.G., Free Nitroxyl Radicals, Plenum Press, New York and London, 1970
12. BENGĂ, GH., MUREȘAN, L., HODĂRNĂU, A., DANCEA, S., Biochem. Med., **6**, 1972, p. 508
13. BENGĂ, GH., St. Cerc. Biochim., **17**, 1974, p. 123
14. BENGĂ, GH., HODĂRNĂU, A., BÖHM, B., BORZA, V., TILINCA, R., DANCEA, S., PETRESCU, I., FERDINAND, W., Eur. J. Biochem., **84**, 1978, p. 625
15. BENGĂ, GH., POP, V.I., IONESCU, M., HODĂRNĂU, A., TILINCA, R., FRANGOPOL, PT., Biochim. Biophys. Acta, **750**, 1983, p. 194
16. BENGĂ, GH., IONESCU, M., POPESCU, O., POP, V.I., Molec. Pharmacol., **23**, 1983, p. 771
17. BENGĂ, GH., POPESCU, O., POP, V.I., HOLMES, R.P., Biochem., **25**, 1986, p. 1535
18. BENGĂ, GH., POPESCU, O., POP, V.I., BORZA, V., MOCSY, I., MUREȘAN, A., HODĂRNĂU, A., St. Cerc. Biochim., **29**, 1986, p. 28
19. BENGĂ, GH., POPESCU, O., BORZA, V., MUREȘAN, A., POP, V.I., MOCSY, I., BRAIN, A., WRIGGLESWORTH, J., Eur. J. Cell Biol., **41**, 1986, p. 252
20. BENGĂ, GH., PORUMB, T., FRANGOPOL, PT., Cell Biol. Int. Rep., **3**, 1979, p. 651
21. BENGĂ, GH., POPESCU, O., POP, V.I., Rev. roum. biochim., **16**, 1979, p. 175
22. BENGĂ, GH., PORUMB, T., WRIGGLESWORTH, J., J. Bioenerg. Biomembr., **13**, 1981, p. 269
23. LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., J. Biol. Chem., **193**, 1951, p. 265
24. IONESCU, M.S., STRUJAN, V., FRANGOPOL, M., CIOBANU, M., SHOLLE, V.D., BENGĂ, GH., FRANGOPOL, PT., Folosirea spectrometrului RES ART-6 IFIN în studii cu markerii de spin, Pr. ICEFIZ RB-4, 1981
25. SHOLLE, V.D., KAGAN, E.Sh., MICHAÏLOV, V.J., ROZANTSEV, E.G., FRANGOPOL, PT., FRANGOPOL, M., POP, V.I., BENGĂ, GH., Rev. roum. biochim., **17**, 1980, p. 291
26. BENGĂ, GH., STRACH, S.J., Biochim. Biophys. Acta, **400**, 1975, p. 69
27. KAZMIERCZAK, S.C., GURACHEVSKY, A., MATTHES, G., MURAVSKY, V., Clinical Chem., **52**, nr. 11, 2006, p. 2129
28. JOST, P.C., GRIFFITH, O.H., CAPALDI, R.A., VANDERKOOI, G., Proceedings of the National Academy of Science USA, **70**, 1973, p. 480
29. CHAPMAN, D., BENGĂ, GH., Biomembrane fluidity. Studies of model and natural biomembranes, in „Biological Membranes. Physical Facts and Functions”, Vol. V, D. Chapman (Ed.), Academic Press, London, 1984, p. 1
30. BENGĂ, GH., HOLMES, R.P., Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function, in „Progress in Biophysics and Molecular Biology”, T.L. Blundell (Ed.), Pergamon Press, Oxford, **43**, 1984, p. 195-257.
31. BENGĂ, GH., (Ed.), Protein-lipid interactions in biological membranes, in „Structure and Properties of Cell Membranes”, CRC Press, Boca Raton, **1**, 1985, p. 160
32. BENGĂ, GH., Molec. Aspects Med., **10**, 1988, p. 201
33. BENGĂ, GH., HODĂRNĂU, A., IONESCU, M., POP, V.I., FRANGOPOL, PT., STRUJAN, V., HOLMES, R.P., KUMMEROW, F.A., A comparison of the effects of cholesterol and 25-hydroxy-cholesterol on egg yolk lecithin liposomes: spin label studies, in „Biomembranes and Cell Function”, F.A. Kummerow, Gh. Bengă, R.P. Holmes (Eds.), Ann. N. Y. Acad. Sci., **414**, 1983, p. 140