

на правах рукописи

СОКОЛЕНКО ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**МЕЖФАЗНЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ
ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ
РЕАКЦИЯХ НА ПОВЕРХНОСТИ БЛМ.**

Специальность 02.00.05 – Электрохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН

Научный руководитель:

Кандидат физико-математических наук

Соколов Валерий Сергеевич

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук,
профессор

Яковенко Леонид Владимирович

Кандидат химических наук

Лебедев Александр Владимирович

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН

Защита состоится 3 марта 2009 года в 11 час. 00 мин. на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.259.03 при Учреждении Российской академии наук Институте физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН по адресу:

119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 31., корп. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физической химии и электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН.

Автореферат разослан 31 января 2009 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук



Г.М.Корначева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Окисление жизненно важных молекул в мембране активными формами кислорода, образующимися при фотовозбуждении фотосенсибилизаторов (ФС), лежит в основе метода фотодинамической терапии (ФДТ) раковых заболеваний. По схожему механизму происходит деградация клеточных структур зрительной системы фотоактивными продуктами, образованными в результате метаболизма зрительного родопсина, что приводит к развитию заболевания зрения – возрастной деградации сетчатки глаза (AMD) (Островский М.А., 2005). В обоих случаях, в разрушении клеток участвуют фотосенсибилизаторы. В случае AMD ими являются побочные продукты цикла зрительного родопсина, а в случае ФДТ искусственно синтезированные соединения (порфирины или фталоцианины). Механизм их взаимодействия с мембраной недостаточно изучен. Наибольшее значение в фотодинамическом разрушении клеток имеет синглетный кислород, первичной мишенью которого являются мембранные белки и липиды (Красновский А.А., 1990). Несмотря на интенсивные исследования, которые проводятся в течение ряда лет, многие аспекты, касающиеся механизма фотодинамического окисления компонентов мембраны активными формами кислорода, образующимися в присутствии ФС, остаются неизученными. Большинство исследований квантового выхода и свободного пробега активных форм кислорода проводилось в гомогенных растворах, в то время как работ, в которых изучалась проницаемость мембраны для кислорода сравнительно мало, а исследований, посвященных определению проницаемости мембраны для короткоживущих активных форм кислорода: синглетного и супероксидного радикалов, нет. В настоящей работе сделана попытка восполнить этот пробел с помощью исследований на бислойной липидной мембране (БЛМ). Для регистрации фотодинамических реакций на поверхности БЛМ применен электрохимический подход, основанный на измерении межфазного скачка потенциала на границе бислойной липидной мембраны с водой. С помощью такого подхода изучены адсорбция различных соединений, обладающих свойствами фотосенсибилизаторов, а также фотодинамические реакции окисления мишеней, молекулы которых адсорбируются на поверхности БЛМ и создают на ней межфазный скачок потенциала.

Цель и основные задачи исследования.

Изучить механизм взаимодействия побочных продуктов фотопревращения зрительного родопсина с БЛМ, их адсорбцию на поверхности мембраны, их свойства как

фотосенсибилизаторов и их способность к автоокислению, то есть служить мишенью для активных форм кислорода (АФК), генерируемых самим продуктом под действием света.

Изучить механизм адсорбции на БЛМ классических фотосенсибилизаторов - фталоцианинов, используемых при ФДТ раковых заболеваний.

Оценить проницаемость мембраны для синглетного кислорода с помощью подхода, основанного на сравнении скорости окисления молекул флоридина - мишени синглетного кислорода, адсорбированных либо с одной, либо с противоположной стороны относительно молекул фталоцианина.

Научная новизна работы.

В работе предложен оригинальный подход, в котором с помощью электрохимического метода измерения межфазных потенциалов на границе БЛМ удалось исследовать не только адсорбцию различных соединений на липидной мембране, но и процессы окисления в мембране, происходящие с их участием. Этот подход позволил впервые оценить проницаемость плоской бислоистой липидной мембраны для синглетного кислорода и изучить влияние на нее различных факторов.

Теоретическая и практическая значимость.

Выяснение механизмов дестабилизации мембраны при воздействии на нее побочных продуктов фотолиза зрительного пигмента родопсина и активных форм кислорода, образующихся при освещении, имеет большое значение для выяснения механизмов развития патологических изменений сетчатки глаза, к которым, прежде всего, относится возрастная макулярная дегенерация эпителиальных клеток.

Установление механизма действия ФС на мембрану необходимо для разработки новых, более эффективных фотосенсибилизаторов, применяемых в методе фотодинамической терапии раковых заболеваний.

Определение проницаемости мембраны для АФК играет существенную роль в понимании механизма фотодинамических реакций, поскольку от нее зависит доступность компонентов клеточной мембраны к фотодинамическому воздействию и в конечном итоге эффективность фотосенсибилизаторов, применяемых в ФДТ.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 8-м Международном Фрумкинском симпозиуме (Москва, 2005), 3-ем съезде биофизиков России

(Воронеж, 2004), Международном конгрессе биофизиков (Монпелье, Франция, 2005), Международном съезде Американского биофизического общества (Балтимор, США, 2007).

Публикации.

Основные положения диссертации опубликованы в четырех статьях в отечественных и международных реферируемых журналах, входящих в список ВАК, а также в сборниках тезисов международных и отечественных конференций.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы из 145 наименований. Работа изложена на 118 страницах, иллюстрирована 34 рисунками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы исследования.

В работе использовались искусственные БЛМ, которые формировали двумя методами. В первом методе (Мюллера-Рудина) бислойную мембрану формировали из раствора дифитаноилфосфатидилхолина (DPhPC) («Avanti Polar Lipids», США) в декане («Aldrich», США) в концентрации 15 мг/мл, на отверстиях в перегородке диаметром 0,7-1,5 мм. Во втором методе (Монталла) использовалась ячейка, перегородкой в которой служила тефлоновая пленка толщиной 30 мкм с отверстием диаметром 0,1-0,2 мм.

В работе использовались спиртовые растворы А2Е, любезно предоставленные А.Е. Донцовым (ИБФ РАН Москва), спиртовой раствор флоретина («Fluka», Швейцария), растворы фталоцианинов («Porphyrine Products», США).

Для приготовления растворов использовали KCl, («Merck», Германия), HEPES («Sigma», USA). Основной буферный раствор содержал 10 mM KCl, 1 mM HEPES, pH доводился добавлением КОН до величины 7.5.

Электрические измерения проводили с помощью хлорсеребряных электродов, соединенных с ячейкой агаровыми мостиками. Наконечники заполнялись тем же раствором, что и ячейка.

В исследованиях по бис-ретинилиден-этаноламину (A2E) для освещения использовалась ртутная лампа мощностью 250 Вт. Ее свет проходил через водный тепловой фильтр и стеклянный светофильтр СЗС-20, ограничивающий спектр синим цветом (максимум спектра поглощения A2E лежит в районе 430 нм). В исследованиях с несимметричными мембранами для возбуждения фталоцианина использовалась ртутно-ксеноновая лампа мощностью 1 кВт с монохроматором, ограничивающим спектр областью шириной 20 нм с центром, расположенным при 670 нм («Oriel Instruments», США). При исследованиях фотодинамического окисления флорицина использовался полупроводниковый лазерный модуль с мощностью излучения 1 мВт на длине волны 670 нм. Мощность излучения всех источников света контролировалась с помощью фотокалориметра РТН-31С (ВНИИОФИ, Москва, Россия), расположенного в плоскости формирования мембраны.

Разность граничных потенциалов БЛМ измеряли методом компенсации внутримембранного поля (КВП) с использованием второй гармоники емкостного тока (Соколов, В.С., Кузьмин, В.Г., 1980). Измерение осуществлялось с помощью автоматической установки с использованием фазочувствительного усилителя DSP-7265 («Signal Recovery», США), который управлялся компьютером через приборный интерфейс GPIB («Measurement Computing», США) с помощью разработанной авторами метода программы.

Электрофоретическую подвижность липосом, μ , измеряли коммерческим прибором «Zetasizer-2» («Malvern Instr.», UK), использующим метод корреляционного светорассеяния.

Результаты исследований и их обсуждение

Исследование взаимодействия побочных продуктов цикла зрительного родопсина с БЛМ.

Задача имеет большое значение для выяснения механизмов развития патологических изменений сетчатки глаза, к которым, прежде всего, относится возрастная макулярная дегенерация эпителиальных клеток. Ключевая роль в развитии возрастной дегенерации сетчатки принадлежит липофусциновым гранулам или «пигменту старости», накапливающимся с возрастом в клетках ретинального пигментного эпителия. Липофусциновые гранулы не являются инертными внутриклеточными включениями (инертными «шлаками»), а обладают фотоактивностью. При действии видимого света липофусциновые гранулы способны генерировать активные формы кислорода: супероксидные радикалы и синглетный кислород. Было показано, что липофусциновые гранулы выступают в качестве эффективных фотосенсибилизаторов окисления липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты. Липофусцин - гетерогенный комплекс, состоящий из

смеси белков, липидов и ряда флуорофоров, поглощающих свет в синей области спектра. Одними из основных флуорофоров являются бис-ретинилиден этаноламин (сокращенное название А2Е) и его окисленная форма (эпокси-А2Е) (рис.1), которые мы исследовали в данной работе

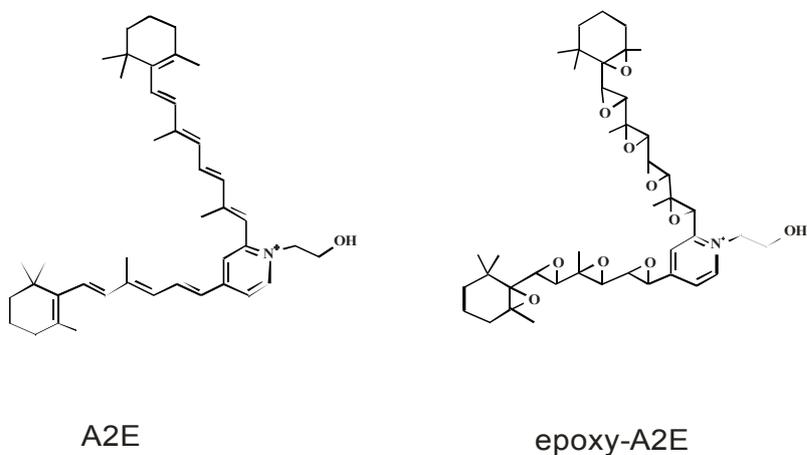


Рис.1. Структура А2Е и эпокси-А2Е.

Сначала изучалось встраивание А2Е в БЛМ. Оно регистрировалось по изменению граничного потенциала БЛМ методом КВП или по электрофоретической подвижности липосом. Типичные кинетики изменения разности граничных потенциалов при введении А2Е в раствор с одной стороны БЛМ изображены на рис 2. Видно, что при введении А2Е в раствор, происходил рост потенциала и выход его на стационарное значение. Этот потенциал связан с появлением положительного заряда на поверхности мембраны вследствие адсорбции на ней А2Е.

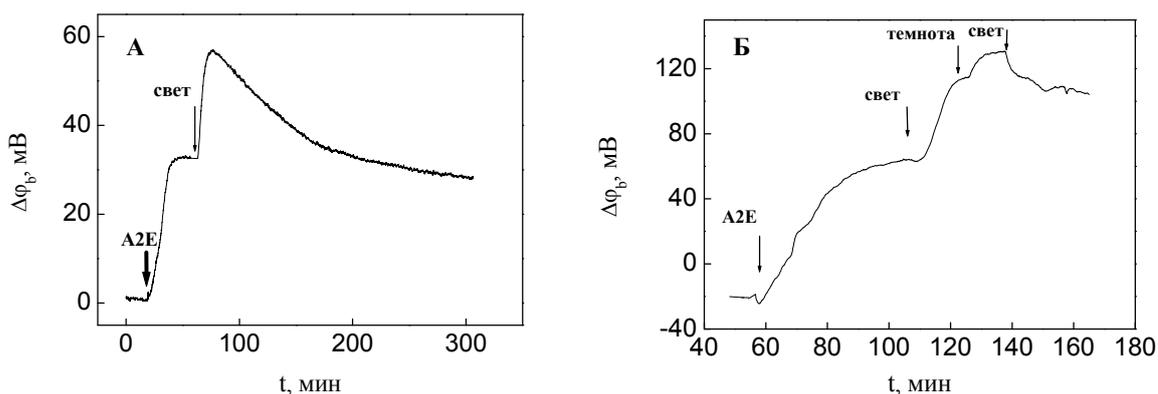


Рис.2 Кинетики изменения граничного потенциала при адсорбции А2Е и последующем включении света (А) и чередовании условий свет-темнота (Б). Водный раствор содержал 10 мМ КСl, 1 мМ НЕРЕС, рН=7,0.

Величину этого заряда мы определяли с помощью измерения электрофоретической подвижности липосом, образованных из липида, в который было добавлено определенное количество А2Е.

Чтобы можно было сравнить данные, полученные на липосомах, с данными, полученными методом КВП, мы сформировали несимметричные мембраны, один из монослоев которых состоял из DPhPC, а другой состоял из смеси липида (DPhPC) с определенной долей А2Е. Разность граничных потенциалов $\Delta\phi_b$, измеренных на таких мембранах, совпадала с поверхностным потенциалом $\Delta\phi_s$ (см. рис.3, А). Учитывая, что плоскость, в которой измеряется поверхностный, находится в водном растворе на некотором расстоянии от БЛМ (т.н. «плоскость скольжения»), а плоскость, где измеряется граничный потенциал методом КВП – внутри мембраны вблизи ее гидрофобной области, совпадение потенциалов, измеренных этими методами, означает, что плоскость расположения зарядов адсорбированных молекул А2Е расположена на поверхности мембраны вблизи границы раздела с водой. Полученная на рисунке 3, А зависимость позволяет по величине потенциала определить содержание А2Е в мембране, даже если А2Е добавляется в водный раствор (рис.3, Б).

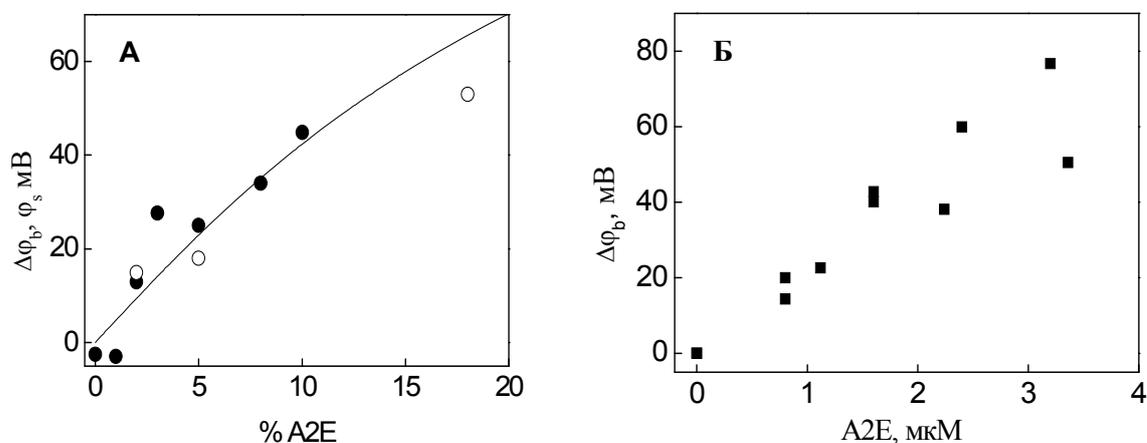


Рис.3. А. Зависимость поверхностного и разности граничных потенциалов от содержания А2Е в липидах. Черные кружки получены из измерений электрофоретической подвижности липосом сформированных из смеси DPhPC с А2Е в молярном отношении, указанном на горизонтальной оси. Каждая точка представляет собой среднее из 2-3 измерений на одном препарате липосом. Белые кружки показывают результаты измерения разности граничных потенциалов асимметричных БЛМ, сформированных методом Монталла-Мюллера из двух монослоев, первый из которых состоял из DPhPC, а второй - из смеси этого липида с А2Е.

Водный раствор содержал 10 мМ КСl, 1 мМ НЕРЕС, рН=7,0. **Б.** Зависимость величины адсорбционного потенциала от концентрации А2Е в водном растворе. Условия те же.

Для изучения фотоэффектов мы использовали способ встраивания А2Е через водный раствор. Бислойную липидную мембрану формировали из раствора DPhPC в декане, после чего в один из отсеков вводили спиртовой раствор А2Е. После окончания адсорбции включали постоянное освещение мембраны. На рис.2 представлены две типичные записи изменений граничного потенциала при адсорбции А2Е из раствора и последующем освещении. Под действием непрерывного освещения потенциал сначала возрастал, а затем уменьшался (рис. 2, А). Если во время роста потенциала свет выключали, потенциал сначала продолжал расти с большей скоростью, а затем выходил на стационарный уровень. Последующее включение света приводило к уменьшению потенциала (рис. 2, Б).

Уменьшение потенциала под действием света можно объяснить образованием эпокси-А2Е, который, будучи менее липофильным, чем исходный А2Е, десорбируется с поверхности мембраны. Это подтверждают эксперименты, в которых исследовалась адсорбция эпокси-А2Е. Растворы А2Е предварительно освещали видимым светом в присутствии кислорода, что приводило к образованию эпоксидов. В результате облучения в течение различного времени: 1ч. 30 мин. и 2ч. 40 мин были получены две смеси с разным соотношением А2Е и его эпокси-форм. Они различались по спектрам поглощения, которые представлены на рисунке 4 А вместе со спектром исходного А2Е. Кинетика адсорбции и фотоиндуцированного изменения потенциала этих образцов, а также, для сравнения – исходного А2Е, приведена на рисунке 4,Б.

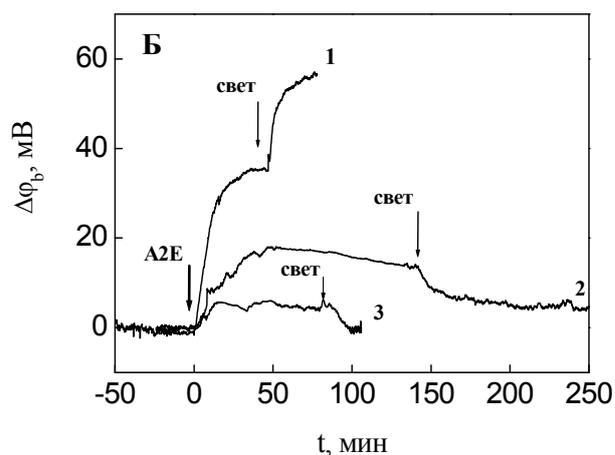
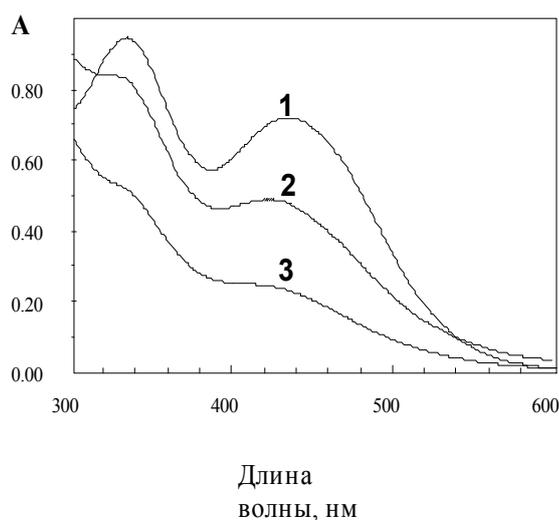


Рис. 4. Спектры поглощения (А) и изменение потенциала на границе мембрана/раствор при адсорбции (Б) для нативного А2Е (1), подверженного облучению 1ч.30 мин.(2), и подверженному облучению 2ч. 40 мин (3).

Как видно из рисунка, адсорбция образцов, предварительно экспонированных светом (кривые 2 и 3), дает меньший адсорбционный потенциал, чем исходный препарат А2Е (кривая 1). Чем больше была длительность предварительного облучения, тем меньше было изменение граничного потенциала. Освещение БЛМ приводило к дальнейшему уменьшению граничного потенциала, которое, по-видимому, вызвано дальнейшим образованием эпокси-форм А2Е в мембране и их десорбцией с ее поверхности.

Причины возрастания потенциала на начальных стадиях освещения (рис.2) не вполне ясны. Можно предположить, что освещение мембраны вызывает образование промежуточной формы окисления А2Е, которая затем превращается в эпокси-форму. Увеличение потенциала при образовании промежуточной формы окисления А2Е под действием света может быть вызвано либо увеличением плотности заряда на поверхности мембраны, либо изменением дипольного потенциала. Для того, чтобы проверить, происходит ли изменение дипольного потенциала, адсорбция А2Е и фотоэффекты изучались в растворах с различной ионной силой фонового электролита. Увеличение ионной силы раствора должно приводить к экранированию заряда и уменьшению поверхностного потенциала, но не может влиять на дипольный потенциал. Поскольку мы показали, что адсорбция А2Е приводит к увеличению поверхностного заряда мембраны, то, как и ожидалось, стократное увеличение ионной силы привело к значительному уменьшению поверхностного потенциала, вызванного адсорбцией. Фотопотенциал в растворах с высокой ионной силой также уменьшился, причем в той же пропорции, что и потенциал адсорбции. Из этого можно заключить, что увеличение граничного потенциала при освещении в присутствии А2Е вызвано увеличением суммарного поверхностного заряда молекул адсорбированного пигмента, а не дипольного потенциала.

Изучение адсорбции классических ФС на примере фталоцианинов.

Второй раздел посвящен изучению адсорбции различных аналогов фталоцианина, отличающихся по числу сульфогрупп и ассоциированному иону металла (рис.5) на мембранах различного липидного состава. Это исследование позволило определить роль гидрофобных и ковалентных взаимодействий в адсорбции ФС на липидной мембране.

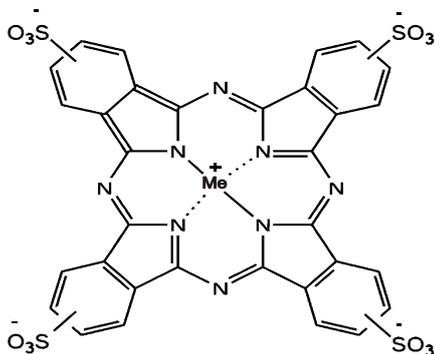


Рис. 5 Структура фталоцианинов. В нашей работе «Me» - Al, Zn либо Ni.

На первом этапе работы мы выясняли влияние на адсорбцию иона металла, ассоциированного в молекуле фталоцианина. В эксперименте использовали AlPcS₄, ZnPcS₄, NiPcS₄.

Из кинетики изменения потенциала после добавления 100 мкМ AlPcS₄ и 100 мкМ ZnPcS₄ (рис. 6) к мембране, сформированной из DPhPC, видно, что оба фталоцианина адсорбируются на мембране и индуцируют появление на ее поверхности отрицательного заряда.

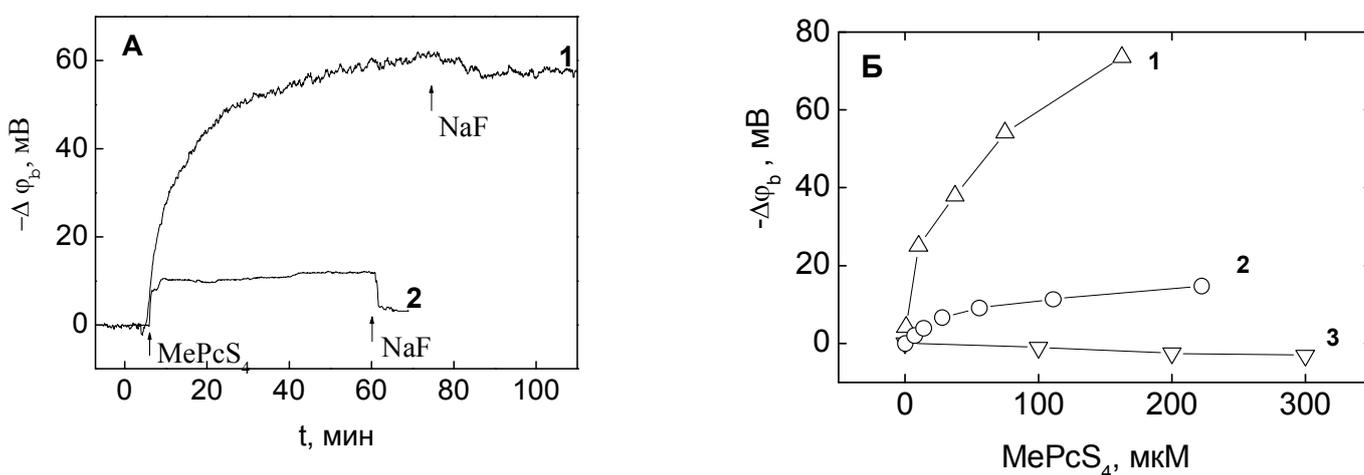


Рис 6. А Кинетика изменения граничного потенциала при адсорбции ZnPcS₄ (1) и AlPcS₄ (2) на фосфолипидной БЛМ и эффект NaF. Б Зависимость граничного потенциала от концентрации ZnPcS₄ (1), AlPcS₄ (2) и NiPcS₄ (3).

Последующая добавка фторида натрия (10 мМ) практически полностью убирала изменение граничного потенциала $\Delta\phi_b$, вызванного адсорбцией $AlPcS_4$ (рис. 6, А (2)), но лишь незначительно уменьшала значение изменения граничного потенциала, наблюдаемое после добавки $ZnPcS_4$ (рис.6, А (1)). Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее, демонстрирующими ингибирование фторидом связывания $AlPcS_4$ с искусственной, клеточной мембранами и белками. Средство, то есть степень связывания с DPhPC мембраной, было выше для $ZnPcS_4$ чем для $AlPcS_4$, что видно из зависимостей изменения граничного потенциала $\Delta\phi_b$ от концентрации фталоцианинов в растворе (рис. 6, Б). Аналогичные измерения, выполненные с $NiPcS_4$ показали, он практически не связывается с БЛМ из DPhPC (рис. 6, Б (3)).

Если БЛМ сформирована из липидов, не содержащих фосфатных групп, связывания с ней фталоцианинов не происходит. Это иллюстрирует рисунок 7, где показана кинетика изменения $\Delta\phi_b$, при добавке 100 мкМ $AlPcS_4$ или $ZnPcS_4$ к мембране, сформированной из глицерилмоноолеата (GMO). Отсутствие сколь-либо значительного изменения граничного потенциала указывает на то, что как $AlPcS_4$, так и $ZnPcS_4$ не связываются с мембраной, сформированной из GMO. Способность адсорбироваться на БЛМ из фосфолипидов и отсутствие адсорбции на БЛМ из GMO являются уникальными свойствами фталоцианинов. Для других соединений, например, бенгальского розового, присутствие в составе БЛМ фосфолипидов не является необходимым условием для их адсорбции, что демонстрирует кинетика изменения потенциала на БЛМ из GMO на рис.7. В совокупности эти эксперименты свидетельствуют о том, что связывание фталоцианинов с БЛМ происходит благодаря образованию координационной связи между атомом металла и фосфатными группами мембранообразующих липидов. Фторид конкурирует с фосфолипидом за образование связи с атомом металла, что объясняет уменьшение адсорбционного потенциала после добавки NaF.

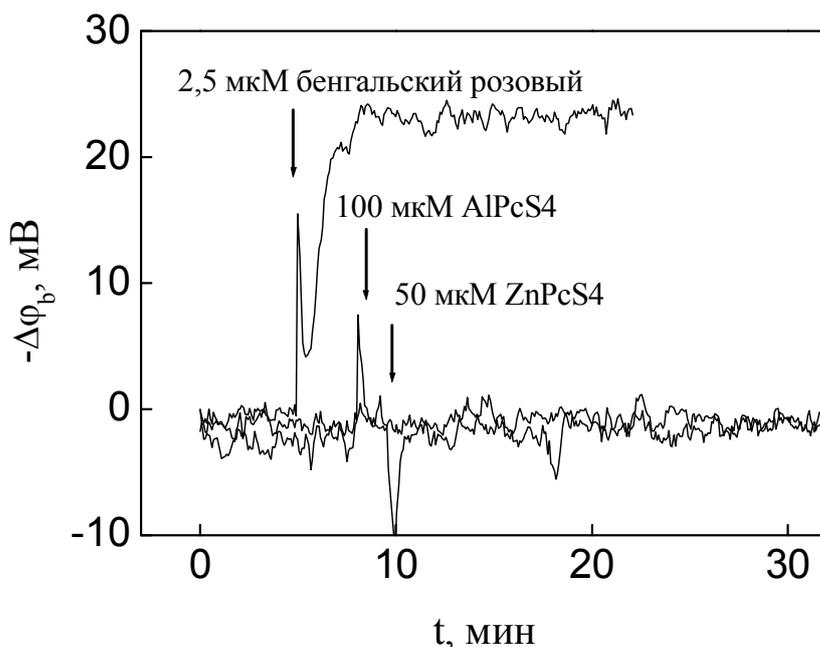


Рис 7. Связывание бенгальского розового, AlPcS4 и ZnPcS4 с БЛМ из GMO, измеренного по разности граничных потенциалов. Водный раствор содержал 100мМКл, 10 мМ Нерес, рН 7,75.

Как было показано ранее (Рокитская, Т.И. и др., 2000) связывание фталоцианинов с липидной мембраной является необходимым фактором для фотодинамического воздействия на мишени, локализованные в или на мембране. Это было доказано на примере фотодинамической инактивации ионных каналов, образуемых пентадекапептидным грамицидином А (gA) в липидной мембране. Примечательно, что результаты наших экспериментов по изучению адсорбции фталоцианинов на БЛМ полностью согласуются с результатами работы, выполненной рабочей группой Антоненко Ю.Н., по фотоинактивации грамицидиновых каналов (gA) этими же фталоцианинами. Из записи элетрических токов сквозь БЛМ, индуцированных gA, было замечено, что освещение видимым светом БЛМ вызывает уменьшение тока в присутствие фотосенсибилизаторов, причем наиболее эффективным оказался цинковый фталоцианин, в то время как с никелевым фиалоцианином фотоинактивации грамицидиновых каналов не наблюдалось. Увеличение концентрации хлорида калия в случае экспериментов на DPhPC мембране никак не сказывалось на фотоинактивации грамицидиновых каналов AlPcS₄, но добавка фторида калия полностью убирала фотоэффект. При проведении подобных экспериментах на мембранах из GMO, фотоактивность AlPcS₄ полностью отсутствовала, в то время как добавка к системе красителя бенгальского розового восстанавливала фотоинактивацию грамицидиновых каналов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что адсорбция фталоцианинов на БЛМ в значительной степени определяется координационной связью между атомом металла в молекуле фталоцианина и фосфатом в молекуле липида в составе БЛМ.

Кроме атома металла в молекуле фталоцианинов, граничный потенциал, образуемый при их адсорбции на БЛМ, зависел также от числа сульфогрупп в их молекуле (рис.8).

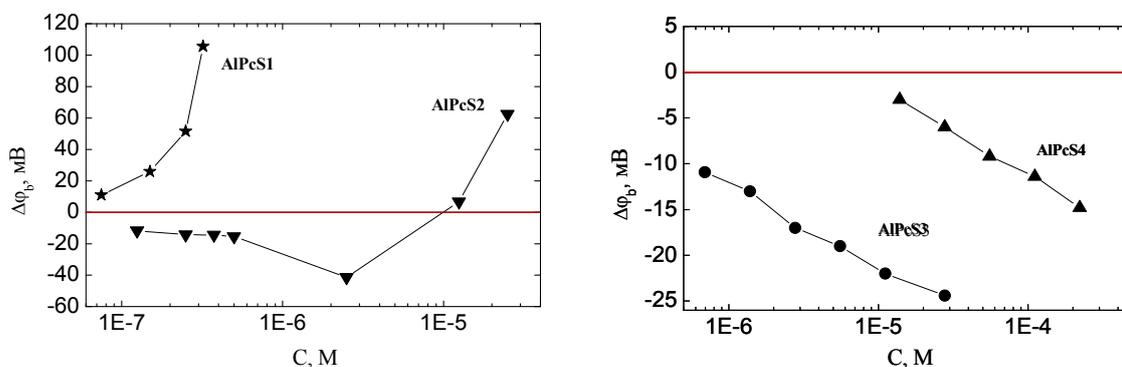


Рис 8. Зависимость граничного потенциала от концентрации фталоцианинов. AIPcS1, AIPcS2 (A), AIPcS3, AIPcS4 (B). Водный раствор содержал 100мМКCl, 10 мМ Нерес, pH 7,75.

По мере уменьшения числа сульфогрупп в молекуле фталоцианина возрастает вклад дипольной составляющей граничного потенциала, возникающего при адсорбции фталоцианина на БЛМ. В случае моносульфированного фталоцианина граничный потенциал оказывается чисто дипольным. Если сравнить наши данные по эффективности адсорбции разносульфированных AIPcS_n, где n варьировал от 1 до 4 с данными по фотоинаktivации гА этими же фталоцианинами (Рокитская, Т.И. и др., 2000), то мы так же обнаруживаем четкую корреляцию.

В случае тетрасульфированного фталоцианина (рис. 9), потенциал зависел от ионной силы, причем потенциал, измеренный нами на БЛМ методом КВП, совпадал с ζ -потенциалом, измеренным в тех же условиях на липосомах (Рокитская, Т.И. и др., 2000). Это доказывает, что потенциал возникает в диффузном электрическом слое вследствие появления на поверхности мембраны заряда, вызванного адсорбцией молекул фталоцианина. Оказалось, что зависимости потенциала от концентрации фталоцианина в растворе при разных значениях ионной силы (рис. 9) могут быть описаны теорией Гуи-Чепмена в предположении, что на поверхности БЛМ происходит адсорбция 4-валентных анионов. Для этого использовалось уравнение, связывающее суммарный заряд адсорбированных молекул фталоцианина на поверхности БЛМ σ с их концентрацией в растворе C_a (изотерма адсорбции Генри):

$$\sigma = zKC_a e^{\frac{zF\phi_b}{RT}}$$

и уравнение Гуи-Чепмена:

$$\frac{\sigma}{\sqrt{8\varepsilon\varepsilon_0RTc_1}} = sh\left(\frac{F\phi_s}{2RT}\right),$$

где c_1 - концентрация раствора KCl, ε , ε_0 - диэлектрическая проницаемость водного раствора и вакуума, R - газовая постоянная T - абсолютная температура (299К), F – число Фарадея, z – заряд иона.

Параметр K устанавливает отношение между концентрацией AlPcS₄ в воде с его концентрацией на поверхности мембраны. Его значение 200 Кл см моль⁻¹ было найдено с помощью аппроксимации экспериментальных данных теоретическими кривыми методом наименьших квадратов.

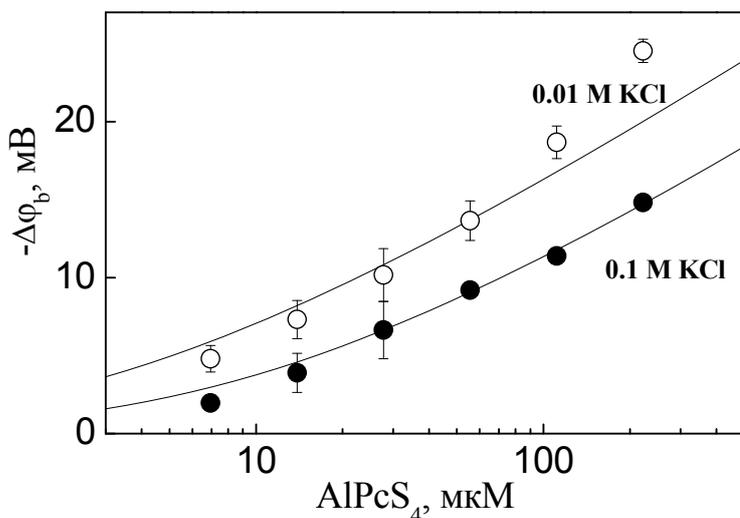


Рис 9. Влияние ионной силы на потенциал адсорбции AlPcS₄ фталоцианина. Пустые кружки - 0,01 М KCl, заштрихованные кружки - 0,1 М KCl. Стандартные отклонения каждой точки изображены вертикальными чертами и рассчитывались по минимум пяти экспериментам на каждую точку.

Изучение транспорта синглетного кислорода через БЛМ.

В третьем разделе представлена работа по изучению фотодинамического окисления флорицина и транспорта синглетного кислорода через мембрану. При выяснении механизма разрушения клеток при применении фотосенсибилизаторов в медицине важным вопросом является определение доступности компонентов клетки для синглетного кислорода, образующемуся при возбуждении фотосенсибилизатора. Очевидно, что эффективность фотосенсибилизаторов зависит от проницаемости мембраны для синглетного кислорода, что недостаточно изучено из-за недостатка методов определения проницаемости. В настоящей работе предложен метод определения проницаемости мембраны для синглетного кислорода по степени асимметрии фотодинамической реакции разрушения мишеней, расположенных по обе стороны мембраны. Если фотосенсибилизатор находится на одной границе мембраны, синглетный кислород, образующийся при его возбуждении, может поражать мишень на той же стороне мембраны. Если мишень находится с противоположной стороны мембраны, скорость ее разрушения зависит от проницаемости мембраны для синглетного кислорода, которая таким образом может быть измерена по различию скорости окисления мишеней на противоположных границах мембраны.

Эта идея была реализована в работе (Sokolov, V.S. and Pohl, P 2008) на примере фотодинамической реакции окисления флорицина, который является аналогом широко известного дипольного модификатора флоретина, но в отличие от него не способен проникать через мембрану (Соколов, В.С и др., 1984). Известно, что электронейтральные молекулы флорицина, адсорбируясь на БЛМ, создают на ее границе дипольный скачок потенциала, который можно измерить методом КВП (Соколов, В.С. и др., 1984). При введении флорицина в раствор с одной стороны БЛМ возникает разность граничных потенциалов (рис. 10). Одностороннее добавление в ячейку фталоцианина также приводило к появлению разности граничных потенциалов (см. раздел 2). Граничные потенциалы, создаваемые флорицином в отсутствие фталоцианина, так же как фталоцианином в отсутствие флорицина, при освещении не менялись. Однако, если в ячейке присутствовали одновременно фталоцианин и флоридин, то освещение приводило к уменьшению граничного потенциала, созданного флорицином. Фотоэффекты были различными в зависимости от того, находились ли флоридин и фталоцианин в одном отсеке ячейки (цис-фотоэффект), или в разных отсеках (транс-фотоэффект). На рисунке 10 показана типичная кинетика транс-фотоэффекта, наблюдаемого на мембране, сформированной методом Мюллера-Рудина.

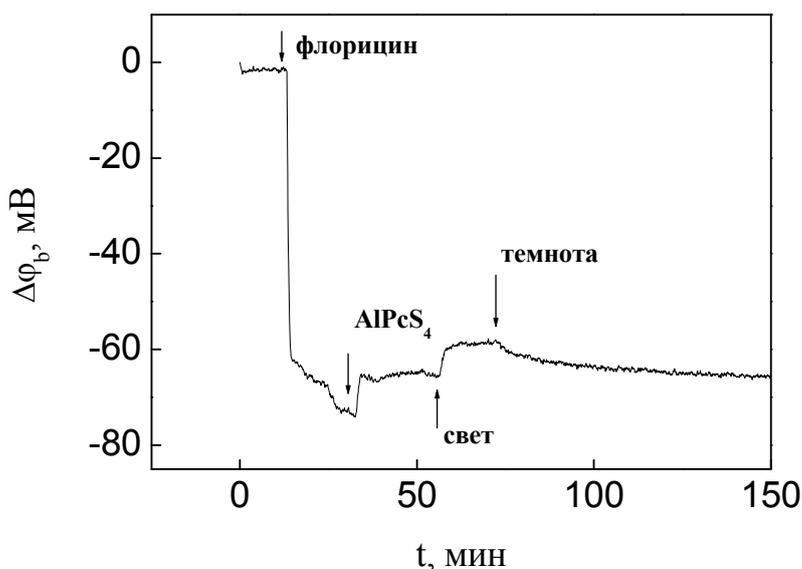


Рис.10. Кинетика изменения граничного потенциала, наблюдаемого при так называемом транс-фотоэффекте на мембране, сформированной методом Мюллера-Рудина, диаметр отверстия 1,5 мм. Водный раствор содержал 100мМKCl, 10 мМ Нерес, pH 7,75.

В транс-конфигурации молекулы фталоцианина и флорицина не могут непосредственно взаимодействовать друг с другом, поскольку находятся на противоположных границах мембраны и не могут проникать через нее. Поэтому транс-фотоэффект можно объяснить, только предположив, что в реакции разрушения флорицина участвуют молекулы синглетного кислорода, образующиеся при освещении фталоцианина и способные проникать через мембрану. Предположение об участии в реакции синглетного кислорода подтверждается экспериментами. Было показано, что фотоэффект подавляется азидом натрия, который является тушителем синглетного кислорода. Более сильным ингибитором оказался убихинон Q₂. На БЛМ, сформированной из смеси фосфатидилхолина с убихиноном, фотоэффект в транс-конфигурации ослаблялся, причем величина ослабления была эквивалентна ослаблению освещения в десять раз (Sokolov, V.S. and Pohl, P, 2008). Возможно, убихинон оказался столь эффективным потому, что он является липидорастворимым соединением и способен тушить синглетный кислород внутри мембраны, в то время как азид натрия является водорастворимым соединением и реагирует с синглетным кислородом преимущественно в водном растворе. В цис-конфигурации, где синглетный кислород не должен проникать через мембрану, чтобы реагировать с флорицином, убихинон не ослаблял фотоэффект. Количественно фотоэффект был измерен по относительной скорости изменения граничного потенциала в момент начала освещения R и по предельному изменению потенциала V при бесконечной длительности

освещения. Эти параметры определялись с помощью аппроксимации зависимости граничного потенциала от времени суммой двух экспонент.

$$R = \left. \frac{d\varphi_b}{dt} \right|_{t=0} ; \quad V = \frac{\Delta\varphi_b|_{t=0} - \Delta\varphi_b|_{t \rightarrow \infty}}{\Delta\varphi_b|_{t=0}}.$$

Экспериментальные данные были объяснены с помощью модели фотодинамических реакций с участием флорицина и синглетного кислорода. Окисление флорицина на поверхности БЛМ приводит к образованию продукта, молекула которого имеет отличающиеся от флорицина дипольный момент и константу диссоциации. Продукт выходит из мембраны в раствор, а убыль флорицина на БЛМ компенсируется его адсорбцией из раствора. Модель позволила получить выражения для начальной скорости R и предельной (при бесконечной скорости окисления) амплитуды V_{lim} фотоэффекта:

$$R = -k_p [^1O_2] \left[1 - \frac{\mu_p (1 + 10^{pH - pK_A})}{\mu_A (1 + 10^{pH - pK_P})} \right], \quad V_{lim} = 1 - \frac{k_d \mu_p (1 + 10^{pH - pK_A})}{k_{pd} \mu_A (1 + 10^{pH - pK_P})},$$

где k_p – скорость реакции, 1O_2 концентрация синглетного кислорода, μ_A и μ_p нормальные составляющие дипольного момента флорицина и продукта, K_A и K_P – константы их диссоциации, H – концентрация ионов водорода. Из этих формул видно, что величина фотоэффекта и его зависимость от pH находятся в соответствии с дипольными моментами флорицина и продукта, а также их констант диссоциации.

Оценка проницаемости БЛМ для синглетного кислорода, P_{IO} , в соответствии с (Sokolov, V.S. and Pohl, P 2008) проводилась по формуле:

$$J = P_{IO} ([^1O_2]_2 - [^1O_2]_1),$$

где $[^1O_2]_1$ и $[^1O_2]_2$ – концентрации синглетного кислорода по одну и другую стороны мембраны. J – поток 1O_2 сквозь мембрану.

В эксперименте определялось отношение скоростей окисления флорицина с двух сторон БЛМ, которое пропорционально отношению концентраций синглетного кислорода на границах:

$$\frac{[{}^1O_2]_2}{[{}^1O_2]_1} = \frac{R_{cis}}{R_{rans}}.$$

Исключить $[{}^1O_2]_1$ и $[{}^1O_2]_2$ удалось, рассмотрев уравнение диффузии D и тушения k_q синглетного кислорода в воде около БЛМ. Пусть концентрация синглетного кислорода в растворе $[{}^1O_2](x)$ является функцией координаты x –расстояния от границы мембраны. Тогда уравнение выглядит следующим образом,

$$0 = -k_q[{}^1O_2](x) + D \frac{d^2[{}^1O_2](x)}{dx^2}$$

Уравнение дополняется граничными условиями – закон Фика у поверхности БЛМ и нулевая концентрация $[{}^1O_2]$ на бесконечном расстоянии от БЛМ:

$$J = -D \left. \frac{d[{}^1O_2](x)}{dx} \right|_{x=0} \text{ и } [{}^1O_2](x) \Big|_{x=\infty} = 0.$$

Из решения уравнения следует, что

$$[{}^1O_2]_1 = \frac{J}{\sqrt{Dk_q}}.$$

Эти уравнения позволили получить простое выражение для оценки проницаемости БЛМ для синглетного кислорода

$$P_{1O} = \frac{\sqrt{Dk_q}}{\frac{R_{cis}}{R_{rans}} - 1}.$$

Из наших экспериментов было получено, что $R_{cis}/R_{rans} \approx 3$. Если использовать для оценки известные значения k_q $3 \times 10^5 \text{ c}^{-1}$ (Rodgers, M.A.J, 1982; Krasnovsky, A.A., 1998) и D $4.75 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ c}^{-1}$ (Fischkoff, S., 1975), то $P_{1O} \approx 2 \text{ cm/c}$.

Полученное значение проницаемости оказалось значительно ниже проницаемости БЛМ для обычного кислорода, которая, согласно данным, полученным методом ЭПР, составляет около 210 - 230 см/с (Subczynski, W. K., 1989; Dzikovski, B. G., 2003). Возможно это различие связано с тем, что синглетный кислород не только проникает через мембрану, но и подвергается тушению. Однако, как показали наши дальнейшие исследования, полученная

оценка оказалась заниженной, поскольку не учитывает, что как флоризин, так и продукт его окисления способны к латеральному обмену с окружающим мембрану тором.

Об участии латерального обмена свидетельствует обнаруженная нами зависимость фотоэффекта от размеров мембраны. Мы показали, что если сформировать мембрану методом Монталла на отверстии с диаметром около 0,1 мм, транс-фотоэффект пропадает, а цис-фотоэффект остается (рис.11).

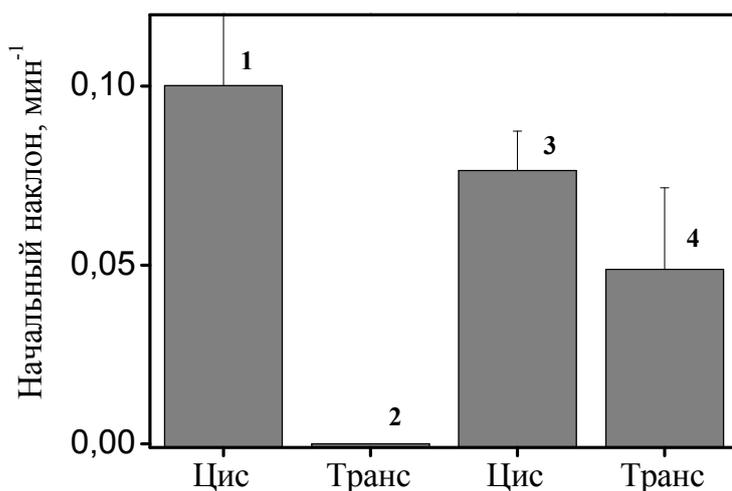


Рис.11 Сопоставления величин цис- (1,3) и транс-эффектов(2,4) в экспериментах на мембранах, сформированных методом Монталла (1,2) и мембранах, сформированных методом Мюллера-Рудина (3,4).

Главное отличие Монталловских мембран от мембран, сформированных методом Мюллера-Рудина в том, что в них отсутствует растворитель - декан. Чтобы проверить, влияет ли на фотоэффекты наличие растворителя, были сформированы «сухие» мембраны методом Мюллера-Рудина, которые не содержали декан. Для этого использовался раствор липидов в гексадекане, который не попадает в бислой, а концентрируется в области тора. Оказалось, что транс-фотоэффекты в таких мембранах также наблюдаются. Таким образом, исчезновение транс-фотоэффектов можно объяснить лишь малыми размерами Монталловских мембран (0,1 мм) по сравнению с Мюллеровскими (0,7-2,5 мм). Влияние размеров мембран на величину фотоэффекта было изучено в экспериментах на мембранах, сформированных методом Мюллера на отверстиях разного диаметра. Результаты представлены на рисунке 12. Видно, что величина транс-фотоэффекта практически линейно зависит от емкости мембраны, по величине которой можно судить о площади.

Впервые возможность латерального обмена между бислоем и тором была продемонстрирована в работе (Benz, 1973), где было показано, что удельная проводимость мембран при встраивании в них валиномицина из водного раствора зависела от площади. При больших отверстиях (более 3 мм) эта зависимость выходила на насыщение, и только в этих условиях (насыщения) величина проводимости определялась равновесным распределением валиномицина между мембраной и водой, при котором латеральным обменом можно было пренебречь. В случае же экспериментов на отверстиях, не превышающих 1,5 мм, которые использовались в наших экспериментах, латеральный обмен существенен.

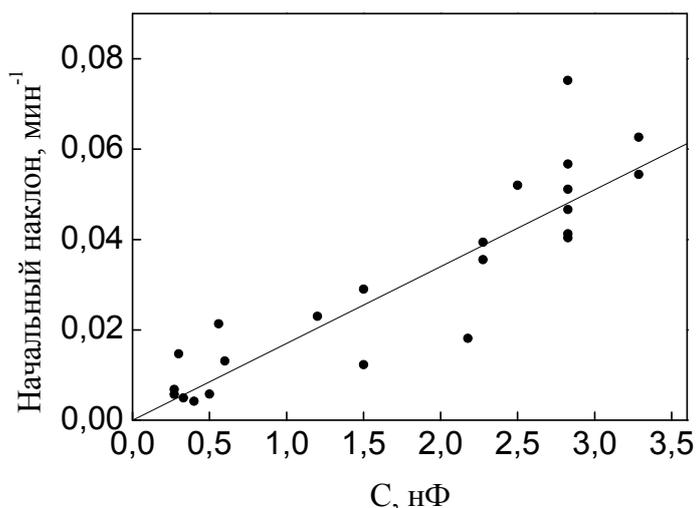


Рис.12. Зависимость величины фотоэффекта от емкости мембраны, то есть, по сути, от «рабочего» размера отверстия.

В работе Benz, 1973, была выдвинута гипотеза, что латеральный обмен происходит вследствие непрерывного обновления липидного бислоя на границе с тором, в котором участвуют фосфолипиды. В наших экспериментах оказалось возможным это проверить, если использовать в качестве мишени синглетного кислорода ненасыщенные липиды. Для этого были сформированы несимметричные мембраны, один из монослоев которых состоял из DPhPC, а другой из DOPC. Известно, что в окислении может участвовать только липиды, содержащие ненасыщенные связи, поэтому окисление могло происходить только в монослое, содержащем ненасыщенный липид DOPC, и не происходило в другом монослое, сформированном из насыщенного липида DPhPC.

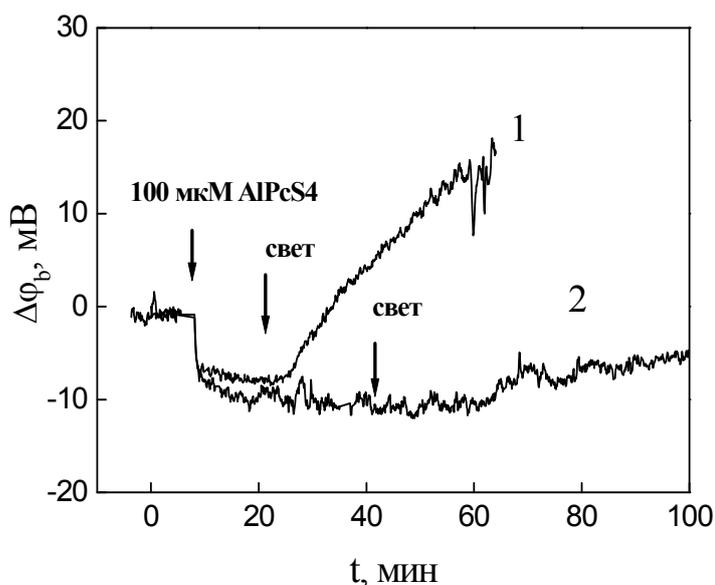


Рис. 13. Окисление ненасыщенных липидов. (1) Цис-сторона мембраны: DOPC(66%) и DOPE(33%), транс-сторона: DPhPC, (2) Цис-сторона мембраны: DPhPC, транс-сторона: DOPC(66%) и DOPE(33%). Водный раствор: 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.5

Сначала добавляли фталоцианин со стороны монослоя DOPC (рис.13, кривая 1) мембраны и наблюдали его адсорбцию по изменению граничного потенциала. Затем освещали систему и наблюдали монотонное изменение потенциала, знак которого соответствовал положительному заряду мембраны со стороны того монослоя, где находились ненасыщенные липиды. Рост потенциала можно объяснить тем, что при освещении появляются сшивки двойных связей липидов по свободнорадикальному механизму под действием синглетного кислорода, генерируемого возбужденной молекулой фталоцианина. Так же, как и с флорицином, проводили два типа экспериментов: в одном фталоцианин находился со стороны монослоя DOPC, в другом со стороны насыщенного DPhPC. Оказалось, что фотоэффект наблюдался только в первом случае (кривая 1 на рисунке 13) и практически отсутствовал во втором (кривая 2). Таким образом, как в экспериментах с флорицином, так и с ненасыщенными липидами, «транс»-фотоэффект отсутствовал. Эти результаты означают, что с обеими мишенями причина отсутствия транс-фотоэффекта может быть одна и та же, а именно, продукты окисления мишени не удается обнаружить из-за того, что они исчезают вследствие латерального обмена между липидным бислоем и тором.

Синглетный кислород может проникать только через бислой, но не через тор, толщина которого (порядка миллиметра) превышает длину его свободного пробега. Поэтому в условиях наблюдения транс-фотоэффекта фотодинамические реакции происходят только на

поверхности бислоя, но не тора, где есть адсорбированные молекулы мишени. В этом случае из-за латерального обмена между бислоем и тором происходит отток продуктов окисления в тор и замена их на нативные молекулы мишени. Поскольку латеральный обмен происходит на границе между бислоем и тором, его эффективность зависит от размеров мембраны. В случае, если мембрана имеет очень маленький диаметр, латеральный обмен настолько эффективен, что не позволяет наблюдать фотоэффект, поскольку скорость образования продуктов окисления в бислое оказывается значительно ниже скорости их замены на нативные молекулы из тора.

В случае цис-фотоэффекта фотодинамические реакции окисления могут происходить на поверхности как бислоя, так и тора, поскольку он проницаем для света, а на его поверхности, как и на поверхности мембраны, находятся молекулы фотосенсибилизатора и мишени. В этом случае латеральный обмен ни к чему не приводит, так как поверхность тора содержит те же продукты окисления мишени, что и бислой. Тогда и усиление латерального обмена на мембранах малого размера не приводит к ослаблению фотоэффекта. Именно поэтому диаметр мембраны влияет только на транс-фотоэффекты, но не на цис-фотоэффекты.

Из данных экспериментов следует, что заниженная оценка проницаемости мембраны для синглетного кислорода связана с тем, что наша мембрана имела недостаточно большой диаметр, поэтому транс-фотоэффект занижался из-за латерального обмена продуктов окисления между бислоем и тором. Зависимость величины фотоэффекта от размеров мембраны не обнаружила насыщения, поэтому оценить проницаемость мембраны для синглетного кислорода в условиях, когда латеральным обменом можно пренебречь, не удалось. Таким образом, в результате проведенного исследования удастся получить только нижнюю оценку этой проницаемости, то есть ее величина больше, чем 2 см/с. Более точную оценку данным способом можно получить только если удастся найти мишень с большей чувствительностью для синглетного кислорода, для которой эффектом латерального обмена можно будет пренебречь в экспериментах с реальными размерами мембраны.

ВЫВОДЫ

1) Изучено встраивание побочного продукта цикла зрительного родопсина A2E в мембрану. Показано, что изменение граничного потенциала при встраивании A2E в мембрану происходит в диффузном слое около мембраны, что говорит о том, что заряженная группа A2E расположена вблизи границы раздела мембраны с раствором.

2) Показано, что граничный потенциал изменяется при освещении A2E на поверхности мембраны в результате окисления A2E кислородом с образованием нескольких

продуктов. Один из продуктов является гидрофильным и десорбируется с поверхности мембраны. По этой причине мембранная фототоксичность A2E оказывается существенно более слабой, чем у известных фотосенсибилизаторов.

3) Изучена адсорбция на БЛМ различных аналогов фталоцианинов, различающихся числом сульфогрупп и атомом металла в центре молекулы. Показано, что адсорбция тетрасульфированных фталоцианинов происходит благодаря координационной связи атома металла с фосфатной группой фосфолипидов. Эффективность адсорбции разных аналогов фталоцианина коррелирует с их эффективностью как фотосенсибилизаторов.

4) Показано, что граничный потенциал, возникающий при адсорбции фталоцианинов, зависит от числа сульфогрупп в молекуле. В случае тетрасульфированного фталоцианина потенциал возникает в диффузном электрическом слое и может быть описан теорией Гуи-Чепмена. По мере уменьшения числа сульфогрупп в молекуле фталоцианина возрастает вклад дипольной составляющей граничного потенциала. В случае моосульфированного фталоцианина граничный потенциал оказывается чисто дипольным.

5) Изучено окисление флорицина синглетным кислородом, образующимся при фотовозбуждении фталоцианинов на поверхности мембраны с помощью регистрации изменений граничного потенциала при освещении. Окисление происходило не только в том случае, когда фотосенсибилизатор и мишень были расположены на одной границе мембраны (цис-фотоэффект), но и в том случае, когда они находились на противоположных границах мембраны (транс-фотоэффект), благодаря транспорту синглетного кислорода через мембрану. Показано, что транс-фотоэффект зависит от размеров БЛМ, из-за латерального обмена флорицина и продуктов его окисления между липидной мембраной и окружающим ее тором.

6) Обнаружено изменение граничного потенциала при фотоокислении липидов в несимметричных БЛМ, один из монослоев которых содержит насыщенные, а другой ненасыщенные липиды. Показано, что данный фотоэффект имеет место только в случае, если фотосенсибилизатор адсорбирован со стороны монослоя, содержащего ненасыщенные липиды.

7) Сделана оценка проницаемости мембраны для синглетного кислорода, основанная на сравнении скоростей окисления флорицина с двух сторон мембраны, величина проницаемости оказалась не менее 2 см/с. Эта оценка представляет собой только нижний предел, поскольку на величину фотоэффекта оказывает влияние латеральный обмен продуктов окисления мишени синглетным кислородом между липидным бислоем и тором.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Соколенко, Е. А., Соколов, А. В., Финогенова, О. А., Соколов, В. С., Донцов, А. Е. Влияние продуктов фотолиза зрительного родопсина на бислойные липидные мембраны. 2, 458-459. 2004. Воронеж. 111 Съезд биофизиков России. 24-6-2004.
2. Sokolenko, E. A., Sokolov, V. S., Sokolov, A. V., Finogenova, O. A., Dontsov, A. E., Ostrovsky, M. A. Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. *Eur.Biophys.J.* 34[6], 772. 2005.
3. Sokolenko, E. A., Sokolov, V. S., Sokolov, A. V., Finogenova, O. A., Dontsov, A. E., Ostrovsky, M. A. Interaction of bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. 236. 2005. 8th International Frumkin Symposium "Kinetics of electrode processes", Moscow, 18 Oct - 22 Oct 2005. 18-10-2005.
4. Sokolov, V. S., Ayuan, A. G., Lenz, A. A., Sokolenko, E. A., Wiesner, B., Pohl, P. Membrane diffusion of singlet oxygen: bare lipid bilayers versus membranes reconstituted with aquaporin-1. *Eur.Biophys.J.* 34[6], 653. 2005.
5. Соколов, В. С., Е. А. Соколенко, А. В. Соколов, О. А. Финогенова, А. Е. Донцов, and М. А. Островский. 2005. Взаимодействие бис-ретинолиден этаноламина (A2E) с бислойными липидными мембранами в темноте и при действии света. *Биологические мембраны* 22:361-369.
6. Pashkovskaya, A. A., E. A. Sokolenko, V. S. Sokolov, E. A. Kotova, Y. N. Antonenko. 2007. Photodynamic activity and binding of sulfonated metallophthalocyanines to phospholipid membranes: Contribution of metal-phosphate coordination. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:2459-2465.
7. Sokolenko, E. A., Pashkovskaya, A. A., Kotova, E. A., Sokolov, V. S., Antonenko, Yu. N. Interaction of sulfonated metallophthalocyanines with bilayer lipid membranes: photochemical activity versus adsorption on the membrane surface. *Biophysical Journal* . 2007.
8. Sokolov, V. S., E. A. Sokolenko, D. V. Filinsky, Yu. A. Ermakov, O. D. Lopina, H.-J. Apell. 2007. Electrostatic potentials created by membrane fragments with Na,K-ATPase adsorbed on lipid membranes. *Eur. Biophys. J.* 36:S88.
9. Sokolov, V. S., E. A. Sokolenko, A. V. Sokolov, A. E. Dontsov, Y. A. Chizmadzhev, M. A. Ostrovsky. 2007. Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol.* 86:177-185.

10. Соколов, В.С., Е.А.Соколенко, Д.В.Филинский, Ю.А.Ермаков, О.Д.Лопина, Х.-Ю.Апель. 2007. Электрические потенциалы, возникающие при адсорбции фрагментов мембран с Na,K,АТР-азой на липидных бислоях. *Биологические мембраны* 24:333-347.