

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԹՈՐՈՍՅԱՆ ԱՆԱՀԻՏ ԼԵՎՈՆԻ

ՊՈՐՏԻՐԻՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՐԿՇԵՐՏ ԼԻՊԻԴԱՅԻՆ
ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ՎՐԱ

Գ.00.02 - Կենսաֆիզիկա մասնագիտությամբ
ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2015

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ТОРОСЯН АНАИТ ЛЕВОНОВНА

ДЕЙСТВИЕ ПОРФИРИНОВ НА
БИСЛОЙНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук по специальности
03.00.02 - Биофизика

ЕРЕВАН 2015

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Վ.Բ. Առաքելյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,
կենս. գիտ. դոկտոր,
պրոֆեսոր Ա.Ն. Թոշունյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Ֆիզմաթ. գիտ. թեկնածու,
դոցենտ Հ.Գ. Բաղայան
ՀՀ ԳԱԱ Միջազգային
գիտակրթական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2015 թ. մարտի 6-ին ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Սանտրյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2015 թ.-ի հունվարի 30-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,

կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ

Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

доктор физ.-мат наук,
профессор В.Б. Аракелян

Официальные оппоненты:

член кор. НАН РА,
доктор биол. наук,
профессор А.Г. Трчунян

кандидат физ.-мат. наук,
доцент Г.Г. Бадалян

Ведущая организация:

Международный научно-образовательный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 6-го марта 2015 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 30-го января 2015 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
кандидат биол. наук, доцент

М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Порфирины, и особенно их металлопроизводные, широко распространены в природе. Они включены в состав многих биологических соединений, таких как гемоглобин, хлорофилл, витамины группы В и т. д. И природные, и синтетические порфирины широко используются в практической медицине и биологии, в основном из-за того, что они обладают низкой токсичностью, хорошо растворимы в воде, быстро выводятся из организма, имеют низкие эффективные концентрации и др. Порфирины имеют широкий спектр применения в онкологии, радиобиологии, их используют также в качестве противовирусных, противогрибковых, антибактериальных препаратов.

Было показано, что порфирины избирательно накапливаются в опухолевых клетках. Это обстоятельство, с одной стороны, используется в качестве диагностического теста в онкологической практике, с другой стороны, используя фотосенсибилизирующие свойства порфирина успешно применяют его в фотодинамической терапии опухолей. Было установлено, что большая часть повреждений, вызванных порфиринами в опухолевых клетках, происходит при его прямом или косвенном воздействии на клеточную мембрану. Исследования прямо указывают на важность взаимодействия порфиринов с мембранами для выяснения механизма их действия на клетки, в том числе и опухолевые.

Во многих исследованиях биологическую активность порфиринов связывают с их взаимодействием с ДНК, белками и другими внутриклеточными структурами. В течение последних нескольких лет интенсивно исследовалось взаимодействие порфиринов с ДНК и белками *in vitro*. Получен целый ряд важных результатов. Однако следует отметить, что стадии взаимодействия порфирина с ДНК и белками (особенно для внутриклеточных) должна предшествовать стадия взаимодействия и прохождения порфирина через мембраны. Таким образом эффективность действия порфирина зависит не только от его прямого действия на ДНК и белки, но и от его взаимодействия и транспорта через мембраны.

Как следует из вышеизложенного, физико-химические свойства порфиринов и, в частности, их взаимодействие с мембранами являются важными определяющими факторами их биологической активности. Несмотря на ряд работ, посвященных взаимодействию порфиринов с модельными мембранами, все же нет прямых экспериментальных исследований по влиянию порфиринов на такие важные параметры мембраны, как ее устойчивость, проводимость и электрическая емкость. Ввиду чрезвычайно сложной организации биологических мембран исследования устойчивости, проводимости и электрической емкости биологической мембраны становится сложной задачей. По этой причине

представляется целесообразным проводить эксперименты на модельных системах, каковым являются БЛМ и липосомы, которые зарекомендовали себя как удачные модели биологических мембран. Эксперименты на БЛМ имеют целый ряд преимуществ по сравнению с экспериментами на биологических мембранах. Их можно проводить в макроскопических условиях, имеется возможность контролировать и варьировать экспериментальные условия, а результаты поддаются практически однозначной интерпретации.

Результаты, полученные в рамках этой работы могут служить основой для целенаправленного синтеза лекарственных препаратов на основе порфиринов.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования явилось изучение влияния порфиринов на наиболее важные параметры бислоистой липидной мембраны: устойчивость, проводимость, проницаемость и адсорбция. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. исследовать влияние порфиринов на электрическую емкость БЛМ,
2. исследовать влияние порфиринов на поверхностное и линейное натяжение БЛМ,
3. исследовать электрическую проводимость БЛМ в присутствии порфиринов,
4. исследовать адсорбцию порфиринов на поверхности липосом с помощью измерения дзета-потенциала,
5. приготовить специальную ячейку для исследования проницаемости БЛМ для порфиринов оптическим методом и определить коэффициент проницаемости плоских БЛМ для безметалльного порфирина.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в том, что впервые детально исследовано действие катионных и анионных порфиринов на устойчивость и электрические параметры (электрическая проводимость и электрическая емкость) БЛМ. Исследовано совместное действие электростатического поля и порфиринов на устойчивость БЛМ и механизм образования поры в них. Научная новизна исследования заключается также и в том, что в работе разработан новый метод определения проницаемости БЛМ для порфиринов оптическим методом и впервые определен коэффициент проницаемости плоских БЛМ для TOEtPyP4 порфирина.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Изменение устойчивости БЛМ в электрическом поле в присутствии катионных и анионных порфиринов связано с влиянием

порфиринов на линейное натяжения кромок пор, которые спонтанно образуются в БЛМ.

2. В присутствии катионных порфиринов поверхностное натяжение БЛМ уменьшается, а электрическая емкость БЛМ и вероятность образования поры в БЛМ увеличиваются. В присутствии анионного порфирина поверхностное натяжение БЛМ и скорость роста поры увеличиваются, а электрическая емкость БЛМ уменьшается.

3. В присутствии катионных и анионного порфиринов электрическая проводимость БЛМ растет.

4. Катионный порфирин адсорбируется на липосомы из смеси фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина и изменяет знак дзета-потенциала и заряда поверхности липосомы. Анионный порфирин не влияет на дзета-потенциал липосом. Определены константы связывания иона натрия и CoTOEtPyP4 порфирина с липосомами.

5. Предложен метод определения проницаемости плоских БЛМ для TOEtPyP4 порфирина.

Научная и практическая ценность работы

Научная ценность работы заключается в том, что результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы в научных исследованиях, посвященных проблеме устойчивости мембран в присутствии разных препаратов, представляющих биологическую и биомедицинскую важность. Полученные результаты позволят оценить и понять механизмы взаимодействия порфиринов с клеточными мембранами. Такой подход направлен на понимание и оптимизацию химического строения и фармакологических свойств порфиринов, используемых в фотодинамической терапии. Разработанный в работе метод определения проницаемости плоских БЛМ для порфиринов имеет научную ценность, поскольку этот метод может быть использован в аналогичных научных исследованиях по определению проницаемости БЛМ для других фармакологических препаратов.

Практическая ценность работы заключается в том, что примененная в работе методика исследования устойчивости БЛМ может быть использована для оценки влияния других фармакологических и медицинских препаратов на такой важный параметр БЛМ, как его устойчивость в электрическом поле. Результаты имеют практическую ценность в области биомедицины и фармакологии, так как на основе полученных результатов может быть проведен целенаправленный синтез лекарственных препаратов на основе порфирина. Исследования практически важны и с точки зрения взаимодействия порфиринов с липосомами, так как липосомы широко используются как транспортер для доставки лекарств (например, на основе порфиринов) к клетке-мишени. Полученные результаты могут быть использованы в

лабораториях, изучающих действие биологически активных соединений на биологические объекты, их так-же можно использовать в специальных курсах соответствующих дисциплин.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на следующих научных конференциях:

- 2nd European Symposium on Microbial Lipids “Microbial Lipids: Diversity in Structure & Function”, May 16-19, 2012, Bern, Switzerland.
- 11th Greta Pifat-Mrzljak International School of Biophysics, Sept. 30 – October 9, 2012, Primošten, Croatia.
- The 5th EMBO meeting “Advancing the life sciences”, September 21-24, 2013, Amsterdam, Netherlands.
- 16th GEM-10th GERLI lipidomics meeting: from membranes to pathologies, November 10-14, 2013, Saint-Jean-Cap-Ferrat, France.
- Biophysical Society 58th annual meeting. February 15-19, 2014, San Francisco, California.

Материалы диссертации периодически докладывались на семинарах кафедры молекулярной физики физического факультета ЕГУ.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ: 4 статьи и тезисы 5-и докладов на международных конференциях.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов и списка литературы насчитывающего 135 наименований. Общий объем работы – 114 страниц, включает 33 рисунков и 8 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована цель диссертационной работы, приведены основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обсуждению структуры порфиринов, а также бислойных липидных мембран (БЛМ) и липосом. Изложен литературный обзор теоретических и экспериментальных исследований устойчивости, проводимости и проницаемости БЛМ, приведены современные представления о поверхностном потенциале БЛМ и дзета-потенциале липосом.

Вторая глава посвящена материалам и методам исследования.

Использованные препараты. В работе были использованы следующие препараты: водорастворимые катионные мезо-тетра-[4N-оксизетилпиридил] порфирины (ТОEtPyP4) и их Co(II) содержащие

аналоги (CoTOEtPyP4), а также анионные мезо-тетра-фенилпорфирины (TFnSO₃Na), которые были синтезированы на кафедре фармакологической химии ЕМГУ и любезно предоставлены Робертом Казаряном. Выбор этих катионных порфиринов продиктован тем, что они в первую очередь отличаются высокой противомикробной эффективностью без применения каких-либо дополнительных агентов для укрепления их действия. Они также обладают фототоксичными и фотодинамическими свойствами, что широко используется в противоопухолевой терапии. Для формирования БЛМ использовалась смесь из фосфатидилсерина (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine], DOPS) и фосфатидилэтаноламина (1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, DPPE) (1:1). БЛМ формировался по методу Мюллера и соотр. в растворе 0.1 М NaCl. Моноламелярные липосомы были получены из чистого фосфатидилсерина (DOPS), а также из смеси фосфатидилсерина (DOPS), фосфатидилэтаноламина (DPPE) и фосфатидилхолина (1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, DPPC) (1:1:1) с помощью обработки многослойных липосом ультразвуком. Все фосфолипиды были приобретены из Avanti (USA).

Использованные приборы. Для измерения электрических параметров использовался усилитель Keitley 427. Разность потенциалов на БЛМ подавалась с помощью хлорсеребряных электродов, которые были подключены к АЦП (E14-140-M), ток на мембране измеряли с помощью ЦАП (E14-140-M) используя программу созданную с помощью NI LabVIEW. Диапазон подаваемой на БЛМ разности потенциалов был от 0.20 В до 0.55 В. Контроль геометрических параметров БЛМ проводился путем измерения электрической емкости БЛМ с помощью циклических вольт-амперных характеристик (ВАХ).

Подвижность и средний размер липосом были получены с помощью метода динамического светорассеяния в сочетании с электрофоретическими методами. Измерения проводились на установке ZetaPALS, Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, USA).

Для исследования проницаемости БЛМ для порфиринов был предложен метод, с помощью которого можно рассчитать коэффициент проницаемости БЛМ. Специальные БЛМ-ные ячейки адаптированные к UV/VIS спектрофотометру (Specord M40) были приготовлены для исследования прохождения порфиринов через БЛМ, формируемые методом Мюллера. Ячейки толщиной 2 см были сделаны из кварца, а средняя перегородка, на которой формировалась БЛМ - из тефлона. Во всех экспериментах БЛМ формировалась в растворе 0.1 М NaCl.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Третья глава посвящена исследованию устойчивости БЛМ в отсутствие и в присутствии катионных (ГОЕТРyP4, СоГОЕТРyP4) и анионного (TFnSO₃Na) порфиринов.

Специально проведенными экспериментами ранее было показано, что потеря устойчивости БЛМ в электрическом поле не связана с макроскопическими изменениями в структуре БЛМ, а связана со спонтанным появлением на БЛМ дефектов типа микроскопических сквозных пор. Появление этих пор при наличии на БЛМ электрического поля сильно облегчается, что в конечном счете приводит к электрическому пробою БЛМ. Детальные экспериментальные и теоретические исследования устойчивости БЛМ в электрическом поле привели к раскрытию механизма разрушения БЛМ в электрическом поле, в основе которого лежат представления о спонтанном появлении и развитии пор до критических размеров в электрическом поле. Основным параметром, который характеризует устойчивость мембраны является среднее время жизни мембраны при заданном потенциале. Таким образом, так как среднее время жизни БЛМ зависит от потенциала, то является естественным, охарактеризовать устойчивость мембраны кривой зависимости среднего времени жизни БЛМ от потенциала.

Влияние порфиринов на устойчивость БЛМ было рассмотрено при четырех разных концентрациях: 10^{-6} М, $5 \cdot 10^{-6}$ М, 10^{-5} М и $5 \cdot 10^{-5}$ М. Образование равновесных черных пленок контролировали по величине емкостного тока. Электрическая емкость БЛМ была измерена путем применения симметричного треугольного напряжения со скоростью развертки 0.07 В/с. Эти измерения позволили оценить толщину БЛМ, которая во всех экспериментах составляла 40-50 Å.

Вначале было исследовано изменение среднего времени жизни БЛМ в зависимости от увеличения разности потенциалов в отсутствие порфирина.

Детальный анализ зависимости среднего времени жизни БЛМ \bar{t} от разности потенциалов φ был проведен с использованием теоретической зависимости $\bar{t}(\varphi)$:

$$\bar{t} = \frac{(k_B T)^{3/2}}{4\pi D c_0 S \gamma \left(\sigma + \frac{C \varphi^2}{2} \right)^{1/2}} \cdot \exp \left(\frac{\pi \gamma^2}{\left(\sigma + \frac{C \varphi^2}{2} \right) k_B T} \right) \quad (1)$$

где σ - поверхностное натяжение БЛМ; γ - линейное натяжение кромки поры в БЛМ; D - коэффициент диффузии дефектов в пространстве радиусов; φ - разность потенциалов на мембране; k_B - постоянная

Больцмана; T – температура; C - приведенная электрическая емкость, которая определяется соотношением $C = C_0 (\varepsilon_w / \varepsilon_m - 1)$, где $C_0 = \varepsilon_0 \varepsilon_m / h$ - удельная электрическая емкость БЛМ; ε_w - диэлектрическая проницаемость воды; ε_m - диэлектрическая проницаемость БЛМ; ε_0 - диэлектрическая постоянная; c_0 - концентрация пор на БЛМ; S - площадь БЛМ.

При сопоставлении теоретической формулы (1) с экспериментальными данными ее удобно представить в логарифмическом виде:

$$\lg \bar{t} = A - \frac{1}{2} \lg(1 + M\varphi^2) + \frac{B}{1 + M\varphi^2}, \quad (2)$$

$$A = \lg \left(\frac{(k_B T)^{3/2}}{4\pi D c_0 S \gamma \sigma^{1/2}} \right), \quad B = \frac{\pi \gamma^2 \lg e}{\sigma k_B T}, \quad M = \frac{C}{2\sigma}$$

Было исследовано изменение среднего времени жизни БЛМ в зависимости от увеличения разности потенциалов в присутствии катионных ТОEtPyP4 и CoTOEtPyP4 и анионного TFnSO₃Na порфиринов в концентрациях 10^{-6} М, $5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} М и $5 \cdot 10^{-5}$ М (рис. 1).

Сопоставив теоретическую кривую с экспериментальными точками на рис. 1, можно определить значения поверхностного натяжения БЛМ (σ), линейного натяжения кромки поры в БЛМ (γ) и параметр $c_0 S D$, от которых в основном зависит устойчивость БЛМ. Вначале вычислялась приведенная электрическая емкость БЛМ C , а затем значение натяжения БЛМ в отсутствие порфиринов, которая равна $\sigma = 4.8 \cdot 10^{-3}$ Н/м. Используя значение σ , можно получить значение для линейного натяжения кромки поры в БЛМ в отсутствие порфирина, которое равно $\gamma = 1.13 \cdot 10^{-11}$ Н. Эти величины хорошо согласуются с литературными данными.

Экспериментальные данные на рис. 1,а и 1,б показывают, что в присутствии катионных порфиринов с увеличением концентрации порфирина уменьшается среднее время жизни БЛМ. Анализ экспериментальных данных с использованием формулы (2) позволяет определить значения физико-химических параметров, от которых зависит устойчивость БЛМ в электрическом поле. Такой анализ кривых на рис. 1,а и 1,б показал, что уменьшение среднего времени жизни БЛМ связано в основном с уменьшением коэффициента линейного натяжения БЛМ. Показано также, что с увеличением концентрации порфирина уменьшается величина коэффициента линейного натяжения. Действие ТОEtPyP4, CoTOEtPyP4 порфиринов на устойчивость БЛМ в

электрическом поле может быть объяснено следующим образом: катионные порфирины адсорбируясь на БЛМ уменьшают коэффициент линейного натяжения кромок спонтанно образующихся пор, а это в свою очередь приводит к уменьшению устойчивости БЛМ.

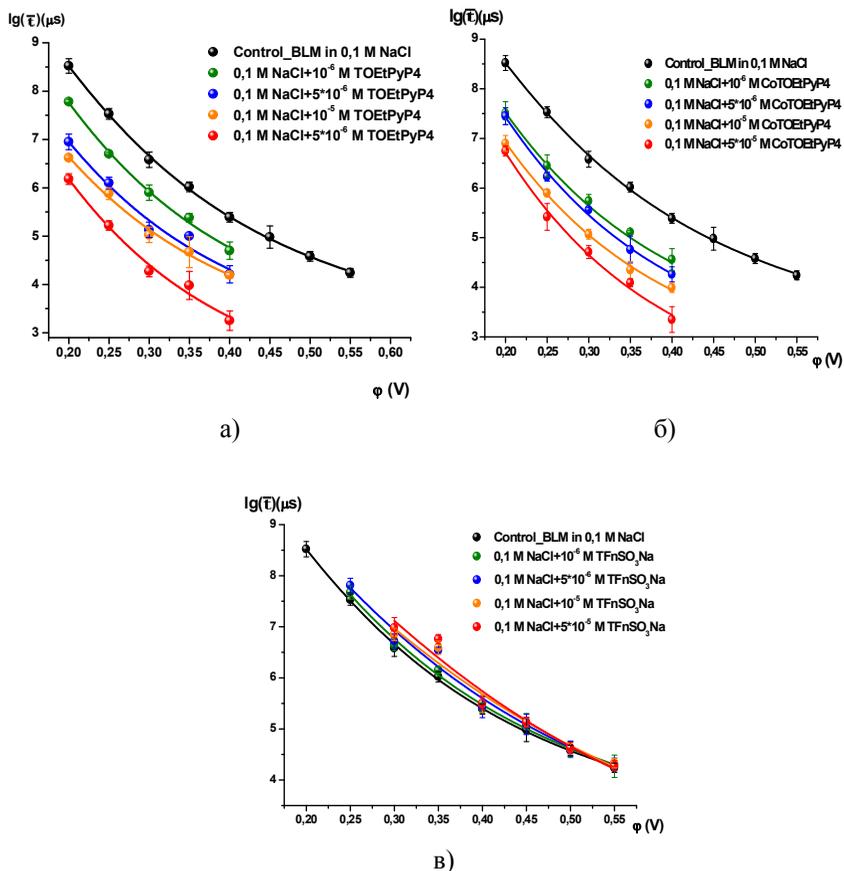


Рис. 1. Уменьшение среднего времени жизни БЛМ при увеличении разности потенциалов а) в присутствии порфирина TOEtPyP4, б) в присутствии порфирина CoTOEtPyP4, в) в присутствии порфирина TFnSO₃Na в концентрациях 10^{-6} M, $5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} M и $5 \cdot 10^{-5}$ M: точки - экспериментальные данные (среднее из 5 измерений при каждом потенциале), сплошные линии – теоретические кривые, проведенные по формуле (2) методом наименьших квадратов.

Аналогичный анализ был проделан и при исследовании действия анионного порфирина на устойчивость БЛМ в электрическом поле. Эти экспериментальные данные представлены на рис. 1,в. Из этого рисунка видно, что в присутствии анионного порфирина среднее время жизни БЛМ увеличивается, и оно растет с увеличением концентрации порфирина. Анализ экспериментальных данных с использованием формулы (2) позволил определить параметры устойчивости и показал, что увеличение среднего времени жизни БЛМ связано в основном с увеличением коэффициента линейного натяжения БЛМ. Анализ показал также, что с увеличением концентрации порфирина увеличивается также и величина коэффициента линейного натяжения. Порфирин TfSO_3Na действует на устойчивость БЛМ в электрическом поле следующим образом: анионный порфирин, взаимодействуя с БЛМ, увеличивает коэффициент линейного натяжения кромок спонтанно образующихся пор, а это, в свою очередь, приводит к увеличению устойчивости БЛМ.

В присутствии порфиринов были определены значения натяжения БЛМ. Натяжение БЛМ в присутствии катионных порфиринов TOEtPyP4 и CoTOEtPyP4 ниже, чем в контроле, а в присутствии анионного порфирина TfSO_3Na выше. Причем, с увеличением концентрации катионных порфиринов TOEtPyP4 и CoTOEtPyP4 , уменьшается значение натяжения БЛМ, а с ростом концентрации анионного порфирина TfSO_3Na значение натяжения БЛМ растет. Заметим, что качественно зависимость поверхностного натяжения БЛМ (σ) от типа порфирина и его концентрации согласуется с зависимостью линейного натяжения кромки поры (γ) от типа и концентрации порфирина. Этого и следовало ожидать, поскольку часто в качестве оценки линейного натяжения берут формулу $\gamma = \sigma h$, (где h - толщина БЛМ), из которой следует, что линейное натяжение кромки поры и поверхностное натяжение БЛМ линейно зависимы.

Зная значения σ и γ можно вычислить значения c_0SD . Из анализа проведенных экспериментов в отсутствие порфирина было получено следующее значение: $c_0SD = 2.68 \cdot 10^{-23} \text{ м}^2/\text{с}$. Показано, что в присутствии порфиринов параметр c_0SD увеличивается. Поскольку для катионных порфиринов TOEtPyP4 и CoTOEtPyP4 с ростом их концентрации уменьшается линейное натяжение БЛМ, то увеличение параметра c_0SD с ростом концентрации порфирина может быть связано с увеличением вероятности образования поры в БЛМ. С ростом концентрации анионного порфирина TfSO_3Na линейное натяжение увеличивается и увеличение параметра c_0SD не может быть связано с увеличением вероятности образования поры в БЛМ, оно связано с увеличением скорости роста поры (D).

Заметим, что параметр c_0SD стоит в знаменателе формулы (1) и его увеличение должно было привести к уменьшению среднего времени жизни БЛМ. Однако, поскольку среднее время жизни БЛМ экспоненциально растет с увеличением квадрата линейного натяжения кромки поры, то при их совместном действии преобладающим оказывается влияние линейного натяжения, и по этой причине и наблюдается небольшое увеличение устойчивости БЛМ.

В четвертой главе диссертационной работы изучено влияние катионных (ТОЕТРуР4, СоТОЕТРуР4) и анионного (ТFnSO₃Na) порфиринов на электрические параметры БЛМ.

Электрическая емкость и проводимость БЛМ были измерены с помощью циклических вольт-амперных характеристик (ВАХ) путем применения симметричного треугольного напряжения со скоростью развертки 0.07 В/с. Из ВАХ были вычислены электрическая емкость (С) и проводимость (g) БЛМ. В отсутствие порфирина для удельной проводимости и удельной электрической емкости БЛМ были получены следующие значения: $g_{уд}=(1.33\pm 0.03)\cdot 10^{-7}$ ом⁻¹·см⁻², $C_{уд}=0.34\pm 0.03$ мкФ/см² (средние значения из пяти экспериментов).

В присутствии катионных порфиринов (ТОЕтРуР4 и СоТОЕтРуР4) в растворе NaCl электрическая емкость БЛМ выше, чем в контроле и практически не изменяется при росте концентрации ТОЕтРуР4 и незначительно уменьшается с увеличением концентрации порфиринов СоТОЕтРуР4. В присутствии анионного порфирина (ТFnSO₃Na) в растворе NaCl электрическая емкость БЛМ несколько ниже, чем в контроле и незначительно уменьшается с увеличением концентрации порфиринов. Может быть предложен следующий вариант объяснения полученных результатов: при фиксированной толщине БЛМ, изменение электрической емкости в присутствии порфирина может быть связано с изменением площади плоской части БЛМ, что подтверждается простыми оценками.

В присутствии порфирина в растворе NaCl электрическая проводимость БЛМ растет. Увеличение проводимости объяснить за счет увеличения площади БЛМ в этом случае не удастся; увеличение площади слишком мало. Увеличение проводимости может произойти за счет увеличения вероятности образования поры в случае катионных порфиринов (ТОЕтРуР4, СоТОЕтРуР4) и за счет скорости роста поры в случае анионного порфирина (ТFnSO₃Na). Такое объяснение согласуется с результатами анализа влияния порфиринов на устойчивость БЛМ, проведенный в главе 3.

В пятой главе диссертационной работы исследована адсорбция выше указанных трех порфиринов на поверхности липосом,

приготовленных из смеси DOPS, DPPE и DPPC (1:1:1). Экспериментальные данные этой главы были получены в совместном проекте с Институтом Медицинской физики и Биофизики университета Лейпцига (Германия) в рамках международного сотрудничества.

Используя метод динамического светорассеяния в сочетании с электрофоретическими методами были определены подвижность (u) и средний размер липосом, что составляло 300-400 нм. Значения дзета-потенциала (ζ) были рассчитаны непосредственно из уравнения Гельмгольца-Смолуховского:

$$\zeta = \frac{\eta u}{\varepsilon \varepsilon_0},$$

где ε и η - диэлектрическая проницаемость и динамическая вязкость среды, соответственно, а ε_0 - диэлектрическая проницаемость вакуума.

На рис. 2 представлена зависимость дзета-потенциала липосом из смеси DOPS, DPPE и DPPC от концентрации NaCl в присутствии и в отсутствие катионного порфирина CoTOEtPyP4.

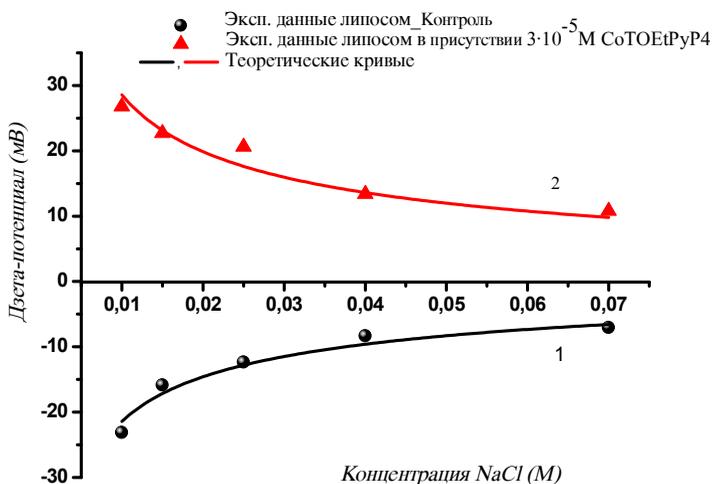


Рис. 2. Зависимость дзета-потенциала липосом из смеси DOPS, DPPE и DPPC (1:1:1) от концентрации NaCl в отсутствие (●) и в присутствии CoTOEtPyP4 порфирина (▲) в концентрации $3 \cdot 10^{-5}$ М. Точки - экспериментальные данные, сплошные линии - теоретические кривые, проведенные по формулам (3) и (4) методом наименьших квадратов.

Как видно из рисунка 2, дзета-потенциал липосом в отсутствие порфиринов отрицательный, что и следовало ожидать, а в присутствии катионных Со-порфиринов знак дзета-потенциала меняется, что свидетельствует о том, что Со-порфирины хорошо адсорбируются на поверхности липосом.

При описании зависимости дзета-потенциала от концентрации соли была использована следующая простейшая модель адсорбции соли и порфирина на липосомы. На поверхность липосом адсорбируются только положительно заряженные ионы натрия и порфирина с константами связывания K_{Na} и K_p соответственно. Процедура анализа экспериментальных данных была следующей: вначале описали кривую зависимости дзета-потенциала от концентрации соли в случае отсутствия порфирина в растворе (рис. 2, кривая 1). Учитывая адсорбцию ионов натрия на липосомы, при малых потенциалах можно получить следующую зависимость дзета-потенциала от концентрации соли:

$$\zeta = \frac{RT}{F} \cdot \frac{\sigma_0}{(2\epsilon\epsilon_0 RT)^{1/2} \sqrt{c} \cdot (1 + K_{Na}c)} \quad (3)$$

где σ_0 – плотность заряда без учета адсорбции ионов, K_{Na} – константа связывания ионов Na^+ с мембраной, c – концентрация $NaCl$, а R , T и F имеют общепринятый смысл. Используя (3) была фитирована кривая 1 из рис. 2 и получены следующие значения для $\sigma_0 = -5.2 \cdot 10^{-3}$ Кл/м² и $K_{Na} = 4$ М⁻¹. Эти значения согласуются с литературными данными.

Если в растворе имеются порфирины с концентрацией c_p , то учет его адсорбции на липосомы приводит к изменению формулы (3). Можно показать, что учет совместной адсорбции ионов натрия и Со-порфирина, несущий заряд +4e, приводит к следующему выражению для дзета потенциала:

$$\zeta = \frac{RT}{F} \cdot \frac{\sigma_0(3K_p c_p - 1)}{(2\epsilon\epsilon_0 RT)^{1/2} \sqrt{c} \cdot (1 + K_{Na}c + K_p c_p)} \quad (4)$$

При фитировании кривой 2 из рис. 2 по формуле (4), с учетом полученных значений σ_0 , K_{Na} , было получено следующее значение константы связывания порфирина с липосомой: $K_p = 4.6 \cdot 10^4$ М⁻¹.

Эксперименты проводились также с порфиринами TFnSO₃Na и ТОEtPyP4 в тех же условиях, что и для СоТОEtPyP4 порфирина.

Tf_nSO₃Na порфирин не дал вклада в изменении дзета-потенциала липосом, что связано, по видимому, с тем, что липосомы и Tf_nSO₃Na порфирин имеют одинаковый заряд. Присутствие ТОЕтРyР4 порфирина незначительно влияет на дзета-потенциал липосом, что по видимому связано его незначительной адсорбцией на липосомы.

В шестой главе диссертационной работы исследована проницаемость БЛМ для порфиринов. В этой главе предложен метод определения коэффициента проницаемости бислойной липидной мембраны (БЛМ) для порфиринов с помощью UV/Vis спектрофотометрии.

Известно, что фотобиологическая активность порфиринов проявляется в основном в результате, или их накопления в плазматической мембране, или в результате их прохождения через мембрану и взаимодействия с ДНК и с другими внутриклеточными мишенями. Поэтому важно исследовать взаимодействие порфиринов с мембранами и их транспорт через мембраны. Ввиду чрезвычайной сложности биологических мембран целесообразно эти исследования провести на модельных мембранах. В данной работе изучается проницаемость БЛМ для порфиринов. Хотя проблеме взаимодействия порфиринов с модельными мембранами посвящено ряд работ, но все же нет прямых экспериментальных исследований описывающих проницаемость мембран для порфиринов.

Проницаемость БЛМ для порфирина была определена с использованием классической БЛМ-ой техники. Была изготовлена специальная БЛМ-ная ячейка из кварца с тефлоновой перегородкой, адаптированная для спектрофотометрических измерений. Ячейка состоит из двух отсеков, объемы которых равны V. ТОЕтРyР4 порфирин с концентрацией 10⁻⁴ М добавлялся в отсек I, а в отсек II добавляли такое же количество раствора 0.1 М NaCl для устранения гидродинамического давления. В этом случае динамика изменения концентрации порфирина в отсеке II, в результате оттока молекул из отсека I в отсек II на малых временах приближенно будет описываться уравнением (4):

$$\frac{c_{II}(t)}{c_{I0}} \approx kt \quad (5)$$

где $k = \frac{PA}{V}$, P - проницаемость БЛМ, $c_{II}(t)$ - текущая концентрация порфирина в отсеке II, c_{I0} - начальная концентрация порфирина в отсеке I, A - площадь БЛМ. Для расчета коэффициента проницаемости БЛМ удобно представить экспериментальные точки в координатах $c_{II}(t)/c_{I0}$ от t (рис.3).

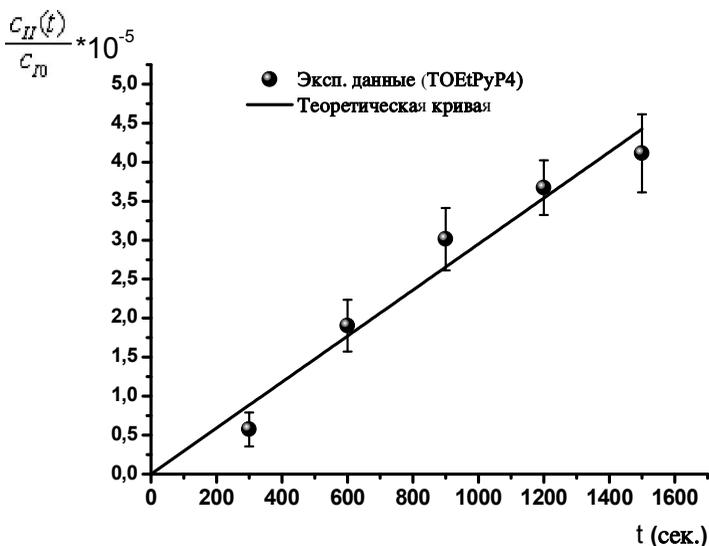


Рис. 3. Зависимость $c_{II}(t)/c_{I0}$ от t для порфирина TOEtPyP4. Точки соответствуют экспериментальным данным (среднее от трех экспериментов), прямая проведена по формуле (5) методом наименьших квадратов.

Описание экспериментальных точек теоретической кривой (5) позволяет определить PA/V , и поскольку для ячейки значения A и V известны, то и коэффициент проницаемости для порфирина TOEtPyP4, который равен $P = (2.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-5}$ см/с.

Были проведены эксперименты также с порфиринами CoTOEtPyP4 и TFnSO₃Na в тех же условиях, что и для TOEtPyP4 порфирина. Для этих порфиринов не удалось зарегистрировать временную зависимость поглощения порфиринов.

Таким образом, предложенный метод позволяет относительно просто оценить значение коэффициента проницаемости порфирина через БЛМ. Этот подход может быть использован для целенаправленной оптимизации структуры химических и фармакологических свойств порфиринов используемых в фотодинамической терапии.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что катионные порфирины (TOEtPyP4, CoTOEtPyP4) уменьшают, а анионный порфирин (TFnSO₃Na) увеличивает устойчивость БЛМ из смеси DOPS и DPPE (1:1) в электрическом поле. Уменьшение или увеличение устойчивости БЛМ связано с уменьшением или увеличением линейного натяжения кромок пор, которые спонтанно образуются в БЛМ.
2. Показано, что катионные порфирины (TOEtPyP4, CoTOEtPyP4) уменьшают, а анионный порфирин (TFnSO₃Na) увеличивает поверхностное натяжение БЛМ.
3. Показано, что катионные порфирины (TOEtPyP4, CoTOEtPyP4) увеличивают вероятность образования поры в БЛМ, а анионный порфирин (TFnSO₃Na) увеличивает скорость роста поры.
4. В присутствии катионных порфиринов (TOEtPyP4 и CoTOEtPyP4) увеличивается, а в присутствии анионного порфирина (TOEtPyP4) уменьшается электрическая емкость БЛМ. Показано, что в присутствии порфирина электрическая проводимость БЛМ растет.
5. Показано, что катионный порфирин CoTOEtPyP4 адсорбируясь на липосомы из смеси DOPS, DPPE и DPPC изменяет знак заряда поверхности липосомы. TFnSO₃Na порфирин не влияет на дзета-потенциал липосом, а влияние TOEtPyP4 порфирина на дзета-потенциал незначительно. Определены константы связывания натрия и CoTOEtPyP4 порфирина с липосомами.
6. Разработан прямой спектрофотометрический метод, с помощью которого измерена проницаемость плоских БЛМ из смеси DOPS и DPPE (1:1) для TOEtPyP4 порфирина.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. A.L.Torosyan, H. Gevorgyan. The Influence of non-metal Porphyrins on Bilayer Lipid Membrane. *2nd European Symposium on Microbial Lipids "Microbial Lipids: Diversity in Structure & Function"*, May 16-19, 2012, Bern, Switzerland, Abstract Book, p. 50.
2. A.L.Torosyan. Estimation of the bilayer lipid membrane permeability for TButPyP4 porphyrins. "*11th Greta Pifat-Mrzljak International School of Biophysics*", September 30 - October 9, 2012, Primošten, Croatia, Abstract Book, p. 69.
3. A.L. Torosyan, V.B. Arakelyan, R.K. Ghazaryan. The interaction of cationic porphyrin with bilayer lipid membrane. *The 5th EMBO meeting "Advancing the life sciences"*, Amsterdam, Netherlands, September 21-24, 2013, Abstract book, p. 230.
4. A.L. Torosyan. Determination Method of Permeability Coefficient of Bilayer Lipid Membrane for Cationic Porphyrins. *Proceedings of the Yerevan State University, Chemistry and Biology*, 2013, № 3, p. 33–37.
5. Anahit Torosyan, Valeri Arakelyan, Robert Ghazaryan. The Stability of Bilayer Lipid Membrane in the Presence of Cationic Porphyrins. *16th GEM-10th GERLI lipidomics meeting: from membranes to pathologies*. Saint-Jean-cap-Ferrat, France, November 10-14, 2013, Abstract book, p. 29.
6. A. Torosyan, V. Arakelyan, R. Ghazaryan. The Permeability Coefficient of Bilayer Lipid Membrane for Cationic Porphyrins. *Biophysical Society 58th annual meeting*, February 15-19, 2014, San Francisco, California, Abstract book, p. 93.
7. V.B. Arakelyan, A.L. Torosyan, R.K. Ghazaryan. Cyclic Current-voltage Characteristics of a Bilayer Lipid Membrane in the Presence of Porphyrin. *Proceedings of the Yerevan State University, Physical and Mathematical Science*, 2014, № 2, p. 60–63.
8. В.Б. Аракелян, А.Л. Торосян, Р.К. Казарян. Адсорбция катионных Со-порфиринов на липосомы. *Биолог. журн. Армении*, 2014, 66, № 2, с. 63-67.
9. В.Б. Аракелян, А.Л. Торосян, Р.К. Казарян. Устойчивость бислоистой липидной мембраны в присутствии Со-содержащих металлопорфиринов. *Известия НАН Армении, Физика*, 2014, 49, № 6, с. 440-445.

ԹՈՐՈՍՅԱՆ ԱՆԱՀԻՏ ԼԵՎՈՆԻ

ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՐԿՇԵՐՏ ԼԻՊԻԴԱՅԻՆ ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ՎՐԱ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր. ադսորբցիա, երկշերտ լիպիդային թաղանթ, երկշերտ լիպիդային թաղանթի կայունություն, հադորդականություն, թափանցելիություն, ցիկլիկ վոլտ-ամպերային բնութագրեր, լիպոսոմներ, ձետա-պոտենցիալ:

Ներկայացվող ատենախոսության մեջ ուսումնասիրված է բարձր կենսաբանական ակտիվությամբ օժտված կատիոնային մեզո-տետրա-[4N-օքսիէթիլպիրիդիլ] պորֆիրինի և նրա Co(II) մետաղական ածանցյալի, ինչպես նաև անիոնային մեզո-տետրա-ֆենիլպորֆիրինի ազդեցությունը երկշերտ լիպիդային թաղանթների (ԵԼԹ) կայունության և էլեկտրական պարամետրերի վրա: Ցույց է տրվել, որ կատիոնային պորֆիրինները (TOEtPyP4, CoTOEtPyP4) փոքրացնում են, իսկ անիոնային պորֆիրինը (TFnSO₃Na) մեծացնում է ֆոսֆատիդիլսերինի (DOPS) և ֆոսֆատիդիլթանոլամինի (DPPE) խառնուրդից (1:1) կազմված ԵԼԹ-ի կայունությունը էլեկտրական դաշտում, ինչը պայմանավորված է թաղանթի վրա ինքնաբերաբար ձևավորվող անցքերի եզրի գծային լարվածության փոքրացմամբ կամ մեծացմամբ համապատասխանաբար: Ցույց է տրվել, որ կատիոնային պորֆիրինների առկայությունը փոքրացնում է ԵԼԹ-ի մակերևութային լարվածությունը, իսկ անիոնային պորֆիրինի առկայությունը՝ մեծացնում այն: Կատիոնային պորֆիրինները մեծացնում են թաղանթի վրա ինքնաբերաբար ձևավորվող անցքերի առաջացման հավանականությունը, իսկ անիոնային պորֆիրինը մեծացնում է անցքերի չափերի փոփոխման արագությունը:

Ուսումնասիրվել են ԵԼԹ-ի ցիկլիկ վոլտ-ամպերային բնութագրերը, որոնց միջոցով հաշվարկվել է ԵԼԹ-ի էլեկտրական ունակությունը և գնահատվել թաղանթի հաստությունը յուրաքանչյուր փորձի համար: Ցույց է տրվել, որ կատիոնային

պորֆիրինների առկայության դեպքում ԵԼԹ-ի էլեկտրական ունակությունն աճում է, իսկ անիոնային պորֆիրինի առկայության դեպքում՝ նվազում: Ցույց է տրվել նաև, որ ուսումնասիրված երեք պորֆիրինների առկայության դեպքում էլ մեծանում է ԵԼԹ-ի էլեկտրական հաղորդականությունը:

Ուսումնասիրվել է վերոնշյալ պորֆիրինների ազդեցությունը լիպոսոմների ձեռա-պոտենցիալի վրա դինամիկ լուսացրման մեթոդով: Ցույց է տրվել, որ կատիոնային CoTOEtPyP4 պորֆիրինը փոխում է լիպոսոմի ձեռա-պոտենցիալի բասացական արժեքը դրականի: Նկարագրվել է լիպոսոմի ձեռա-պոտենցիալի կախվածությունը NaCl-ի կոնցենտրացիայից պորֆիրինի բացակայության և առկայության դեպքում, որոշվել են լիպոսոմի հետ Na^+ իոնի և CoTOEtPyP4 պորֆիրինի կապման հաստատունները:

Առաջարկվել և մշակվել է նոր մեթոդ ԵԼԹ-ի միջով պորֆիրինների թափանցելիությունն ուսումնասիրելու համար: Որոշվել է ֆոսֆատիդիլսերինի (DOPS) և ֆոսֆատիդիլլեթանոլամինի (DPPE) խառնուրդից (1:1) կազմված ԵԼԹ-ի թափանցելիության գործակիցը TOEtPyP4 պորֆիրինի համար:

INFLUENCE OF PORPHYRINS ON BILAYER
LIPID MEMBRANES

SUMMARY

Keywords: adsorbtion, bilayer lipid membrane, bilayer lipid membrane stability, conductivity, permeability, cyclic current-voltage characteristics, liposomes, zeta-potential.

The influence of cationic meso-tetra-[4N-oxyethylpyridyl] porphyrins and their Co(II) derivatives, as well as the influence of anionic meso-tetra-phenylporphyrins on the stability and electrical parameters of bilayer lipid membranes (BLM) is presented in the dissertation. It was shown that cationic porphyrins (TOEtPyP4, CoTOEtPyP4) decrease, and anionic porphyrin (TFnSO₃Na) increases the stability of BLM made of a mixture of DOPS and DPPE (1:1) in an electric field due to either a reduction or, in the latter case, a growth of line tension of spontaneously formed pore edges on the membrane. It was shown that the presence of cationic porphyrins reduces BLM surface tension, while it is increased in the presence of anionic porphyrin. It was found that cationic porphyrins increase the probability of spontaneous pore formation in BLM, while anionic porphyrin increases the changing rate of the radius of the pores.

The cyclic current-voltage characteristics of BLM were investigated, by which the electrical capacity and subsequently the thickness of BLM was determined for each experiment. It was shown that in the presence of cationic porphyrins the electrical capacity of BLM increases, while it decreases in the presence of anionic porphyrin. Furthermore, all three porphyrins tested here led to an increase in the electrical conductivity of BLM.

The effect of the abovementioned porphyrins on the zeta-potential of liposomes is examined by the method of dynamic light scattering. It was shown that cationic CoTOEtPyP4 porphyrin changes the negative zeta-potential of liposomes to a positive one. The NaCl concentration dependence of the zeta-potential of liposomes is described both in the absence and presence of porphyrins. Binding constants of Na⁺ ions and CoTOEtPyP4 porphyrins with liposomes are determined.

A new method is developed and established for studying the penetration of porphyrins through BLM. The permeability coefficient of BLM made of a DOPS and DPPE mixture (1:1) for TOEtPyP4 porphyrins is determined.