

ИЗУЧЕНИЕ ДИФФУЗИИ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НИТРОКСИЛЬНЫХ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ ЧЕРЕЗ БИСЛОЙНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ ПО ДАННЫМ 300 МГц ЭПР-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2015 г. А.М.Ф. Бениал, М.К. Дхас, К. Ичикава*, К. Ямада*, Ф. Хуодо**,
А. Джавахар***, Х. Уцуми*

Физический факультет, NMSSVN Колледж, Нагамалаи, Мадурай-625 019, Тамилнад, Индия;

**Факультет биофункциональных наук, факультет фармацевтических наук, Университет Кюсю,
Фукуока, Япония;*

***Инновационный центр медицинской редокс-навигации, Университет Кюсю,
Фукуока, Япония;*

****Химический факультет, NMSSVN Колледж, Нагамалаи, Мадурай-625 019, Тамилнад, Индия*

E-mail: hideo.utsumi.278@m.kyushu-u.ac.jp

Поступила в редакцию 10.06.13 г.

Проведено ЭПР-исследование ^{14}N -меченых дейтерированных 3-метоксикарбонил-2,2,5,5-тетраметил-пирролидин-1-оксида (МК-ПРОКСИЛ) и 3-карбокси-2,2,5,5-тетраметил-1-пирролидин-1-оксида (карбокси-ПРОКСИЛ) в чистой воде и в липосомальных растворах разной концентрации на 300 МГц ЭПР-спектрометре. Регистрировали такие ЭПР-параметры, как ширину линии, константу сверхтонкой структуры, время вращательной корреляции, g -фактор, параметр распределения и проницаемость. В липосомальных растворах наблюдали увеличение ширины линии для МК-ПРОКСИЛа и карбокси-ПРОКСИЛа. Постоянная сверхтонкой структуры регистрировалась для обоих нитроксильных спиновых зондов. Было продемонстрировано свойство нитроксильных спиновых зондов проникать и не проникать через мембрану. Время вращательной корреляции увеличивалось с увеличением концентрации липосом для МК-ПРОКСИЛа, что указывает на диффузию нитроксильных спиновых зондов в липидную мембрану. Значение проницаемости (R) уменьшалось с увеличением концентрации липосом, что говорит об увеличении проницаемости мембраны. Пик, соответствующий липидной фазе, был зарегистрирован в растворе липосом для МК-ПРОКСИЛа, но не для карбокси-ПРОКСИЛа. Результаты подтверждают, что нитроксильные спиновые зонды способны проникать или не проникать в липидный слой в зависимости от их природы.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, свободные радикалы, липосомы, проницаемость.

Биологические мембраны – это динамические структуры с липидным содержимым, известные своей асимметричностью и гетерогенностью [1]. Липосомы – замкнутые структуры, состоящие из амфифильных липидов, формирующих бислой вокруг водной составляющей. Липосомы имеют структуру мембраны, близкую к клеточной, в которой липофильная углеводородная область зажата между двумя упорядоченными областями полярных головок [2]. Липосомы являются удобной моделью клеточной мембраны для изучения влияния некоторых

параметров, таких как вязкость или плотность поверхностного заряда, на распределение гидрофобных сенсibiliзирующих агентов в нормальных и опухолевых тканях [3].

ЭПР-спектроскопия липидов со спиновыми метками уже давно зарекомендовала себя как ценный метод изучения динамики вращения и молекулярной упорядоченности в липидных бислоях и биологических мембранах путем выявления неспаренных электронов и радикалов в биологических молекулах [4]. ЭПР является мощным неинвазивным спектроскопическим инструментом, который может быть использован для контроля процесса высвобождения лекарственных средств *in vitro* и *in vivo* [5].

Сокращения: МК-ПРОКСИЛ – 3-метоксикарбонил-2,2,5,5-тетраметил-пирролидин-1-оксил, карбокси-ПРОКСИЛ – 3-карбокси-2,2,5,5-тетраметил-пирролидин-1-оксил.

Определение размера частиц. Размер частиц липосом после экструзии суспензии через поликарбонатный фильтр был определен светорассеивающим спектрофотометром Zetasizer Nano (Malvern, Великобритания) и составил ~100 нм.

ЭПР измерения. Работа была выполнена на 300 МГц ЭПР-спектрометре при 23°C [16]. ЭПР-спектры были зарегистрированы для 2 мМ растворов ^{14}N -меченого дейтерированного проникающего МК-ПРОКСИЛа в чистой воде и в липосомальных растворах с концентрацией 100, 200, 300, 400 мМ, а также непроникающего карбокси-ПРОКСИЛа в чистой воде и в липосомальном растворе с концентрацией 400 мМ при изменении магнитного поля от 8 до 13 мТл, модулирующей частоте 100 кГц, амплитуде модуляции поля 0,1 мТл, временной константе 30 мс, радиочастотной мощности 100 мВт, ширине развертки $\pm 2,5$ мТл и радиочастоте 300 МГц. Спектр ЭПР записывали в режиме первой производной при 27°C. Для удаления кислорода из раствора через образцы около двух часов пропускали аргон. Образцы готовили на фосфатном буфере, рН 7,4. Образцы с различной концентрацией липосом помещали в капсулу диаметром 2 см. При каждом измерении капсула была заполнена образцом на 5 см в длину, объем образца составлял 10 мл. Для того чтобы избежать потери воды во время измерений, ампулы были запечатаны с обеих сторон. Температуру поддерживали с помощью водяного термостата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В гетерогенной мембране области, различающиеся одним или несколькими свойствами текучести, называются доменами. Экспериментальный спектр ЭПР представляет собой суперпозицию спектральных компонент, соответствующих спиновым зондам в мембранных доменах с различными характеристиками текучести. Спектры ЭПР исследованных растворов приведены на рис. 1 и 2. Параметры спектров, такие как ширина линии, константа сверхтонкой структуры, время вращательной корреляции и величина g -фактора, приведены в табл. 1. В табл. 2 показаны параметр диффузного распределения (partition parameter), проницаемость и параметр упорядочения МК-ПРОКСИЛа в липосомальном растворе с концентрацией 300 и 400 мМ.

Ширина линии. Ширина линии спектров ЭПР характеризует упорядоченность и динамику спиновых зондов, что также отражает динамические характеристики их окружения. Дан-

ные о наблюдаемой ширине центральной линии ЭПР для исследованных систем приведены в табл. 1. Ширина линий дейтерированного проникающего МК-ПРОКСИЛа в чистой воде и в растворе с концентрацией липосом 400 мМ составила 79 и 110 мкТл соответственно. Ширина линий непроникающего карбокси-ПРОКСИЛа в чистой воде и в растворе с концентрацией липосом 400 мМ равнялась 78 и 112 мкТл соответственно. Таким образом, выявлено увеличение ширины линии на ~40% для обоих нитроксильных радикалов в растворе с концентрацией липосом 400 мМ по сравнению с водным раствором. Вязкая природа липосомальных растворов приводит к уширению линий в спектре ЭПР, что свидетельствует о меньшей подвижности нитроксильного спинового зонда в липосомальном растворе [18].

Константа сверхтонкой структуры и g -фактор. Наблюдаемые значения константы сверхтонкой структуры и g -фактора указаны в табл. 1. Линии ЭПР слабого и сильного поля, соответствующие водному и липидному пикам и полученные для проникающего МК-ПРОКСИЛа в растворах с концентрацией липосом 300 и 400 мМ, представлены на рис. 1г,д. Константа сверхтонкой структуры для МК-ПРОКСИЛа и карбокси-ПРОКСИЛа в чистой воде составляла ~1,430 мТл, а для проникающего МК-ПРОКСИЛа в 400 мМ липосомальном растворе – 1,421 и 1,282 мТл для водного и липидного пиков соответственно. Эти результаты могут быть объяснены с точки зрения контактного ферми-взаимодействия. Липидный пик не наблюдался для непроникающего карбокси-ПРОКСИЛа при концентрации липосомального раствора 400 мМ.

Время вращательной корреляции. Время вращательной корреляции описывает динамику движения спинового зонда в домене и пропорционально текучести. Скорость вращения или переворачивания спиновой метки влияет на форму линии спектра ЭПР. Время вращательной корреляции τ_R является параметром, отражающим подвижность спиновых зондов в окружающей их среде. Величину τ_R можно получить из спектральной ширины и относительной интенсивности линий ЭПР. Время вращательной корреляции описывается следующей эмпирической формулой [19,20]:

$$\tau_R = 6,5 \cdot 10^{-10} \Delta B_0 [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1],$$

где h_{-1} и h_0 – высоты сильнопольной и центральной линий ЭПР-спектра соответственно, а ΔB_0 – ширина центральной линии в гауссах. Вращательное движение спинового зонда предполагается изотропным. Эта формула справед-

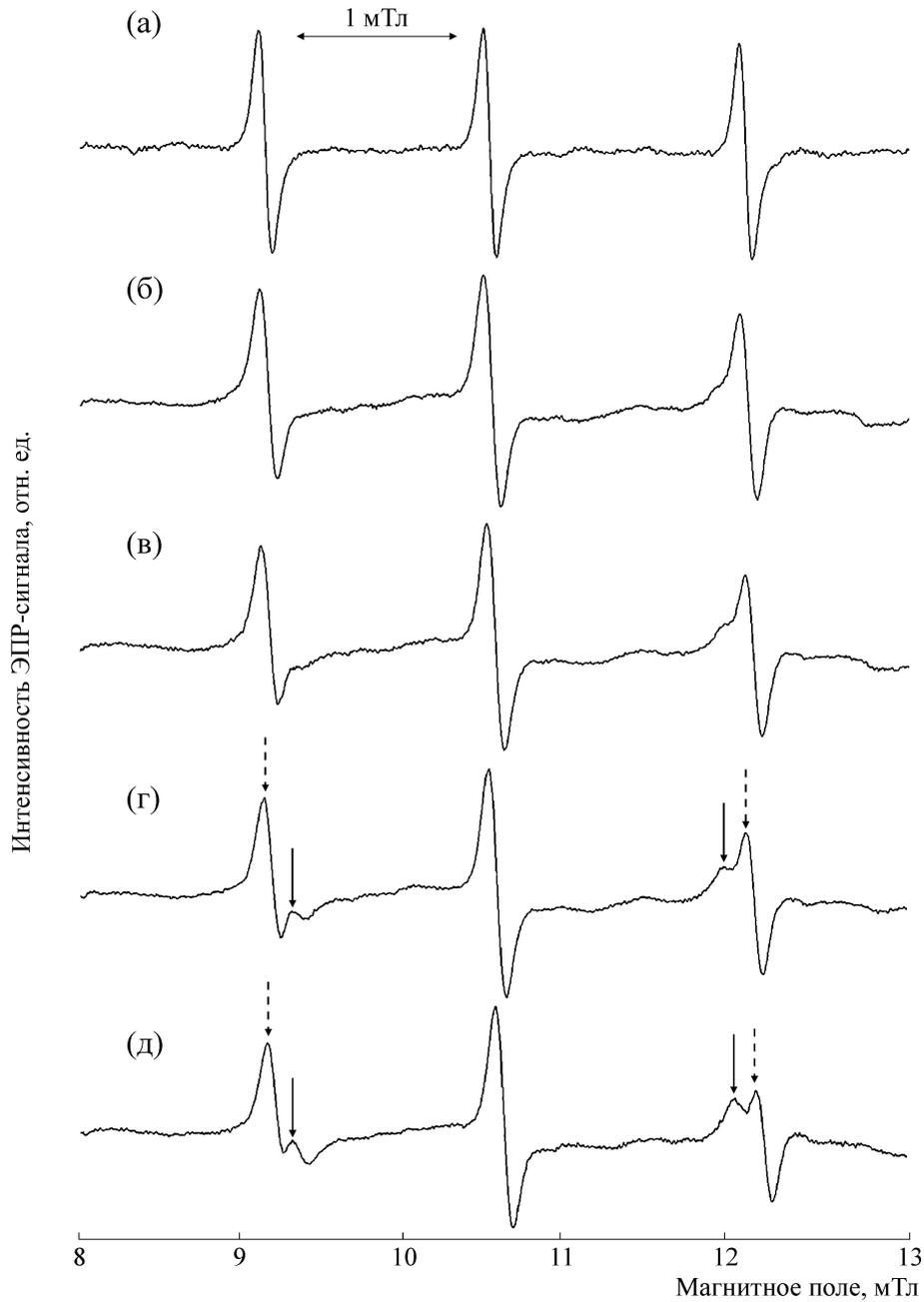


Рис. 1. ЭПР-спектр 2 мМ раствора ^{14}N -меченого дейтерированного проникающего МК-ПРОКСИЛа в чистой воде (а), 100 (б), 200 (в), 300 (г) и 400 мМ липосомальном растворе (д). Сплошная стрелка показывает липидную компоненту, а пунктирная стрелка – водную.

лива только для быстрого изотропного движения в растворе и может быть использована в случае мембраны лишь при сопоставлении относительных различий в динамике спиновых зондов для различных линий клеток и различных видов воздействия [21]. Эмпирическое значение времени корреляции обратно пропорционально текучести мембраны. Текучесть мембраны описывается также двигательными характеристиками алкильных цепей фосфолипидов

мембраны и обратно пропорциональна ее средней вязкости [22].

Времена вращательной корреляции для проникающего МК-ПРОКСИЛа в чистой воде, 100 и 200 мМ растворе липидов, а также для непроникающего карбокси-ПРОКСИЛа в чистой воде и 400 мМ липосомальном растворе перечислены в табл. 2. Время вращательной корреляции увеличивалось с увеличением концентрации липосом для МК-ПРОКСИЛа. Времена

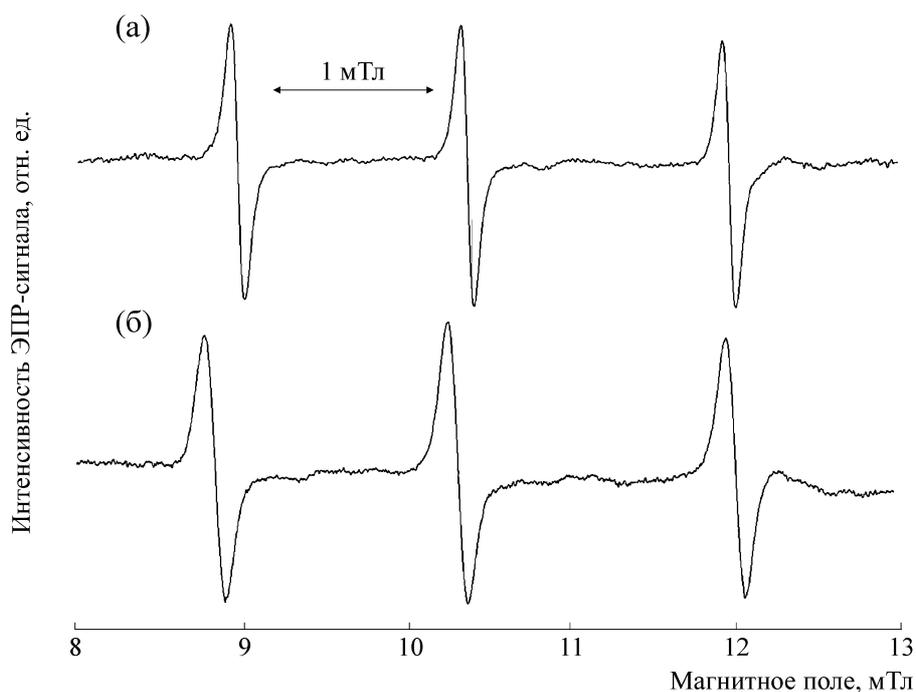


Рис. 2. ЭПР-спектр 2 мМ раствора ^{14}N -меченого дейтерированного непроницающего карбокси-ПРОКСИЛа в чистой воде (а) и 400 мМ липосомальном растворе (б).

вращательной корреляции для МК-ПРОКСИЛа в чистой воде и в липосомальном растворе концентрации 200 мМ составляли $1,35 \cdot 10^{-11}$ и $12,26 \cdot 10^{-11}$ с соответственно. Увеличение времени вращательной корреляции происходит главным образом из-за вязкости жидкого образца и динамического характера проникающего МК-ПРОКСИЛа. Такое поведение указывает на меньшую подвижность нитроксильного спинового зонда в липосомальном растворе. Время вращательной корреляции для непроницающего

карбокси-ПРОКСИЛа не столь значительно по сравнению с проникающим МК-ПРОКСИЛом.

Проницаемость мембраны. Проницаемость мембраны (R) измеряли методом ЭПР с использованием спинового зонда в двойном фосфолипидном слое мембраны. Мембранная проницаемость определяется как способность растворенного вещества вытекать из клеток или диффундировать в клетки не путем активного транспорта [23]. Значение R , определяемое как отношение водной (W) и липидной (L) компо-

Таблица 1. ЭПР-параметры МК-ПРОКСИЛа карбокси-ПРОКСИЛа в чистой воде и липосомальных растворах

Образец	Ширина центральной линии ΔB , мкТл	Константа сверхтонкой структуры A_{iso} , мТл		Время вращательной корреляции τ_R , с ($\times 10^{-11}$)	g -Фактор
		Водный пик	Липидный пик		
МК-ПРОКСИЛ					
Чистая вода	79	1,430	–	1,35	2,0443
100 мМ липосом	108	1,425	–	7,82	2,0374
200 мМ липосом	108	1,421	–	12,26	2,0370
300 мМ липосом	110	1,421	1,271	–	2,0367
400 мМ липосом	110	1,421	1,282	–	2,0367
Карбокси-ПРОКСИЛ					
Чистая вода	78	1,429	–	1,31	2,0458
400 мМ липосом	112	1,420	–	3,08	2,0344

Примечание. В случае прочерка липидный пик не получен.

ненты по высоте в области сильного поля спектра ЭПР, используется для количественной оценки проницаемости мембран в различных тканях [24]. Для измерения проницаемости мембраны могут быть использованы нитроксильные спиновые зонды. Значения R , рассчитанные для МК-ПРОКСИЛа в растворе с концентрацией липосом 300 и 400 мМ, представлены в табл. 2. Величина R уменьшается с увеличением концентрации липосом, что указывает на увеличение проницаемости мембраны.

Параметр распределения. Распределение между липидной и водной фазой может быть непосредственно получено исходя из относительных амплитуд числа молекул спиновых меток в гидрофобном H и полярном P окружении [25]. Параметр распределения f можно вычислить по формуле:

$$f = \frac{H}{H + P}.$$

Параметры распределения были рассчитаны для МК-ПРОКСИЛа в липосомальном растворе с концентрацией 300 и 400 мМ. Предполагаемый параметр распределения увеличивался с увеличением концентрации раствора. Его значение было на 25% выше для МК-ПРОКСИЛа в 400 мМ растворе, чем в 300 мМ растворе. Поэтому концентрация липосом в 400 мМ была принята оптимальной для модельных исследований. Проникающий нитроксильный спиновый зонд МК-ПРОКСИЛ с высоким коэффициентом мембранного распределения (9,5) проникает в липосомальный раствор, а непроникающий карбокси-ПРОКСИЛ с низким коэффициентом мембранного распределения (0,02) не проникает в липидную мембрану [17], что и демонстрируют рис. 1в–д и 2б соответственно.

ВЫВОДЫ

Способность МК-ПРОКСИЛа проникать, а карбокси-ПРОКСИЛа не проникать через мембрану была продемонстрирована на низкочастотном ЭПР-спектрометре (300 МГц). Концентрация липосом до 400 мМ была определена как оптимальная для модельных исследований. Для нитроксильного спинового зонда наблюдалось уширение ширины спектральной линии в липосомальном растворе. Были оценены константа сверхтонкой структуры и соответствующие водные и липидные пики. Время вращательной корреляции нитроксильного спинового зонда увеличивается с увеличением концентрации липосомального раствора, что указывает на его менее подвижное поведение в очень вязкой среде. Параметр распределения показы-

Таблица 2. Параметр диффузного распределения, проницаемость и параметр упорядоченности ^{14}N -меченого дейтерированного проникающего МК-ПРОКСИЛа в 300 и 400 мМ липосомальном растворе

Образец	Параметр распределения f	Проницаемость R
300 мМ липосом	0,279	2,578
400 мМ липосом	0,340	1,934

вает способность нитроксильных спиновых зондов проникать либо не проникать через мембрану. Значение проницаемости мембраны (R) уменьшается при увеличении концентрации липосом для МК-ПРОКСИЛа, что свидетельствует об увеличении проницаемости мембраны. Наше исследование показывает, что метод ЭПР при низкой частоте может использоваться для различения интра- и экстраводы в двухслойных липидных мембранах путем помещения проникающих нитроксильных спиновых зондов в липосомальные везикулы.

Авторы (А. М. Ф. Бениал, А. Джавахар и М. К. Дхас) благодарят управление Колледжа Нагамалаи за стимулирование и разрешение провести данное исследование.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комиссии по университетским грантам, Нью-Дели (ведущий исследовательский проект F.No.38-140/2009 (SR)). Работа была также поддержана целевой субсидией Японского общества продвижения науки (JSPS) в виде докторской стипендии для зарубежных исследователей (ID № P 04489).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Chernomordik, M. M. Kozlov, and J. Zimmerberg, *J. Membr. Biol.* **146** (2), 1 (1995).
2. C. Peetla, A. Stine, and V. Labhasetwar, *Mol. Pharm.* **6** (5), 1264 (2009).
3. M. Hoesbeck, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **28** (3), 189 (1995).
4. G. L. Millhauser, *Trends Biochem. Sci.* **17** (11), 448 (1992).
5. J. Raffi, S. Gelly, L. Barral, et al., *Spectrochim. Acta, Part A: Mol. Biomol. Spectros.* **58** (6) 1313 (2002).
6. P. Kuppusamy, M. Chzhan, and J. L. Zweier, *J. Magn. Reson. Ser. B* **106** (2), 122 (1995).
7. D. Stevens and J. A. Brivati, *Meas. Sci. Technol.* **5** (7), 793 (1994).
8. D. J. Lurie and K. Mader, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** (8), 1171 (2005).
9. T. X. Xiang and B. D. Anderson, *J. Membrane Biol.* **173** (3), 187 (2000).

10. L. Mainali, M. Raguz, and W. K. Subczynski, *Biophys. J.* **101** (4), 837 (2011).
11. A. Alonso, N. C. Meirelles, and M. Tabak, *Chem. Phys. Lipids* **104** (2), 101(2000).
12. F. M. Megli, L. Russo, and E. Conte, *Biochim. Biophys. Acta – BioMembranes* **1788** (2), 371 (2009).
13. C. Matos, C. Moutinho, and P. Labao, *J. Membr. Biol.* **245** (2), 69 (2012).
14. M. F. Benial, H. Utsumi, K. Ichikawa, et al., *J. Magn. Reson.* **204** (1), 131 (2010).
15. M. F. Benial, M. K. Dhas, K. Ichikawa, et al., *Appl. Magn. Reson.* **44** (4), 439 (2013).
16. H. Sano, K. Matsumoto, and H. Utsumi, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42** (3), 641 (1997).
17. M. Yamato, T. Egashira, and H. Utsumi, *Free Radic. Biol. Med.* **35** (12), 1619 (2003).
18. M. F. Benial, M. K. Dhas, and A. Jawahar, *Appl. Magn. Reson.* **40** (3), 311 (2011).
19. P. F. Knowles and D. Marsh, *Magnetic Resonance of Biomolecules: An Introduction to the Theory and Practice of NMR and ЭИП in Biological systems* (Wiley, London, 1976).
20. M. J. G. W. Roozen and M. A. Hemminga, *J. Phys. Chem.* **94** (19), 7326 (1990).
21. D. Marsh, in *Membrane Spectroscopy*, Ed. by E. Grell, (Springer-Verlag, Berlin, 1981), pp. 51–142.
22. M. Sentjurc, J. Strancar, and T. Koklic, *Curr. Top. Biophys.* **26** (1), 65 (2002).
23. Z. Wang and R. You, *Environ. Exper. Bot.* **43** (3), 219 (2000).
24. E. A. Golovina, A. N. Tikhonov, and F. A. Hoeksta, *Plant Physiol.* **114** (1), 383 (1997).
25. M. Kveder, G. Pifat, S. Pecar, et al., *Chem. Phys. Lipids* **85** (1) 1 (1997).

Diffusion Studies of Redox-sensitive Nitroxyl Spin Probes through Bilayer Lipid Membranes Using 300 MHz Electron Spin Resonance Spectrometer

A.M.F. Benial*, **M.K. Dhas***, **K. Ichikawa****, **K. Yamada****, **F. Hyodo*****,
A. Jawahar****, and **H. Utsumi****

**Department of Physics, NMSSVN College, Nagamalai, Madurai-625 019, Tamilnadu, India*

***Department of Bio-functional Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan*

****Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University, Fukuoka, Japan*

*****Department of Chemistry, NMSSVN College, Nagamalai, Madurai-625 019, Tamilnadu, India*

Electron spin resonance (ESR) studies were carried out for ^{14}N -labeled deuterated 3-methoxy-carbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxyl (MC-PROXYL) and 3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidin-1-oxyl (carboxy-PROXYL) in pure water and various concentrations of liposomal solutions by using 300 MHz ESR spectrometer. The ESR parameters such as the line width, hyperfine coupling constant, rotational correlation time, g -factor, partition parameter and permeability were reported for the samples. The line width broadening was observed for MC-PROXYL and carboxy-PROXYL in liposomal solution. The hyperfine coupling constant was observed for both nitroxyl spin probes. The permeable and impermeable nature of nitroxyl spin probes was demonstrated. The rotational correlation time increases with increasing concentration of liposome. The partition parameter increases with increasing concentration of liposome for MC-PROXYL, which indicates that the nitroxyl spin probes diffuse into lipid membrane. The permeability value decreases with increasing concentration of liposome, which reveals an increase in membrane permeability. The peaks corresponding to the lipid phase were observed for MC-PROXYL in liposomal solution, but not resolved for carboxy-PROXYL. These results confirm the permeable and impermeable nature of nitroxyl spin probes.

Key words: electron spin resonance, free radicals, liposomes, permeability