

УДК 577.352.2

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ГРАМИЦИДИНОВЫХ КАНАЛОВ В БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ: ЗАВИСИМОСТЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ТУШИТЕЛЕЙ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ОТ ЛОКАЛИЗАЦИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА

© 2015 Т.И. Рокицкая*, А.М. Фирсов, Е.А. Котова,
Ю.Н. Антоненко

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; факс: +7(495)939-3181,
электронная почта: rokitzkaya@genebee.msu.ru*

Поступила в редакцию 23.12.14
После доработки 27.02.15

Изучение ингибирования фотодинамической инактивации каналообразующего пептида грамицидина А двойными связями жирнокислотных цепей липидов выявило зависимость степени защиты грамицидина от глубины расположения фотосенсибилизатора в липидной мембране. Наибольшее защитное действие ненасыщенные липиды проявляли при фотодинамическом повреждении грамицидина, сенсибилизированном погруженным в толщу мембраны амидом диметилового эфира хлорина e_6 , наименьшее – в присутствии располагающегося на поверхности мембраны трижды сульфированного алюмофталоцианина. Глубину погружения фотосенсибилизаторов в мембрану оценивали по тушению их флуоресценции йодидом. Действие гидрофильного тушителя синглетного кислорода – аскорбата, напротив, было наиболее выражено в присутствии фталоцианина и меньше всего проявлялось в случае амида диметилового эфира хлорина e_6 . Различное защитное действие тушителей синглетного кислорода по отношению к фотодинамическому повреждению пептидов в мембране, очевидно, объясняется тем, что эффективность тушителей возрастает, если они располагаются ближе к фотосенсибилизатору.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотодинамическое воздействие, грамицидин А, фотосенсибилизатор, ненасыщенные липиды, аскорбат, синглетный кислород, бислойная липидная мембрана.

Фотодинамическая терапия – перспективный метод лечения раковых заболеваний. В ее основе лежит селективное накопление фотосенсибилизаторов в опухолях и окислительное действие активных форм кислорода (в большинстве случаев синглетного кислорода), образующихся при возбуждении фотосенсибилизаторов светом видимого диапазона. Известно, что время жизни синглетного кислорода (1O_2) в искусственных липидных мембранах больше, чем в водных растворах [1–3], что обуславливает взаимосвязь глубины погружения фотосенсибилизаторов

в липидный бислой с эффективностью окисления различных мембранных молекул-мишеней [4–6].

Из-за высокого содержания в живых организмах и больших констант скоростей окисления некоторых аминокислот активными формами кислорода [1, 7, 8] белки являются основными мишенями синглетного кислорода и радикалов [9] при фотодинамическом воздействии (ФДВ). Многие работы указывают на то, что повреждение мембрано-связанных белков, таких как сукцинат дегидрогеназа, NADH дегидрогеназа и другие, играет ключевую роль при ФДВ на митохондриях и приводит к нарушению их функций [10, 11]. При окислении интегральных и периферических белков ненасыщенные липиды могут служить антиоксидантами и препятствовать потере функциональности таких белков [12].

Принятые сокращения: БЛМ – бислойная липидная мембрана; ФДВ – фотодинамическое воздействие; DPhPC – дифитаноилфосфатидилхолин; DOPC – диолеилфосфатидилхолин; AlPcS₃ – трижды сульфированный алюмофталоцианин.

* Адресат для корреспонденции.

Ранее было показано [13–16], что пептид грамицидин А, образующий ионный канал в липидных мембранах и имеющий в своем составе четыре триптофана, инактивируется при ФДВ под действием синглетного кислорода, теряя способность образовывать канал. Эта модельная система оказалась очень удобной для исследования различных свойств фотосенсибилизаторов [17–21]. Недавно нами было показано, что ненасыщенные липиды защищают пептид грамицидин А от фотодинамического повреждения в присутствии борированного производного хлорина e_6 (VASE [22]) и степень защиты растет с увеличением числа двойных связей в липиде [23]. В настоящей работе на примере фотоинактивации грамицидина в плоской бислоидной липидной мембране (БЛМ) мы изучили зависимость антиоксидантного действия ненасыщенного липида и аскорбата от степени погружения фотосенсибилизатора в мембрану. Для этой задачи были выбраны фотосенсибилизаторы разной гидрофобности: трижды сульфированный алюмофталоцианин, хлорин e_6 и амид диметилового эфира хлорина e_6 (рис. 1). Относительная глубина расположения хлоринов в мембране была оценена по тушению их флуоресценции йодидом калия. Сопоставляя результаты изменения фотоинактивации пептида при введении гидрофобных или гидрофильных тушителей синглетного кислорода для различных фотосенсибилизаторов, мы обнаружили значительные различия в действии тушителей. Оказалось, что антиоксидантное действие тушителей зависит

от гидрофобности используемого фотосенсибилизатора, которая определяет глубину его локализации в липидной мембране.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

13(1)-N-(2-аминоэтил)-амид-15(2),17(3)-диметиловый эфир хлорина e_6 , синтезированный как описано ранее [24], был предоставлен В.А. Ольшевской (Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова, РАН). Хлорин e_6 и трижды сульфированный алюмофталоцианин (AlPcS₃) были получены от «Porphyrin Products», США.

Бислоидная липидная мембрана (БЛМ) сформирована из 2%-ного раствора дифитаноилфосфатидилхолина (DPhPC) или диолеилфосфатидилхолина (DOPC) («Avanti Polar Lipids», США) в декане на отверстии в перегородке, разделяющей на два отсека тefлоновую ячейку, содержащую буферный раствор [25]. Диаметр отверстия составлял 0,5 мм. Грамицидин А («Sigma», США) добавляли из концентрированного раствора в спирте в водный раствор с двух сторон мембраны и тщательно перемешивали в течение 15 мин. Фотосенсибилизаторы добавляли из концентрированных растворов в воде или диметилсульфоксиде в водный раствор с *транс*-стороны мембраны (*цис*-сторона являлась передней стороной по отношению к лампе-вспышке) и тщательно перемешивали в течение 20 мин. Водный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ

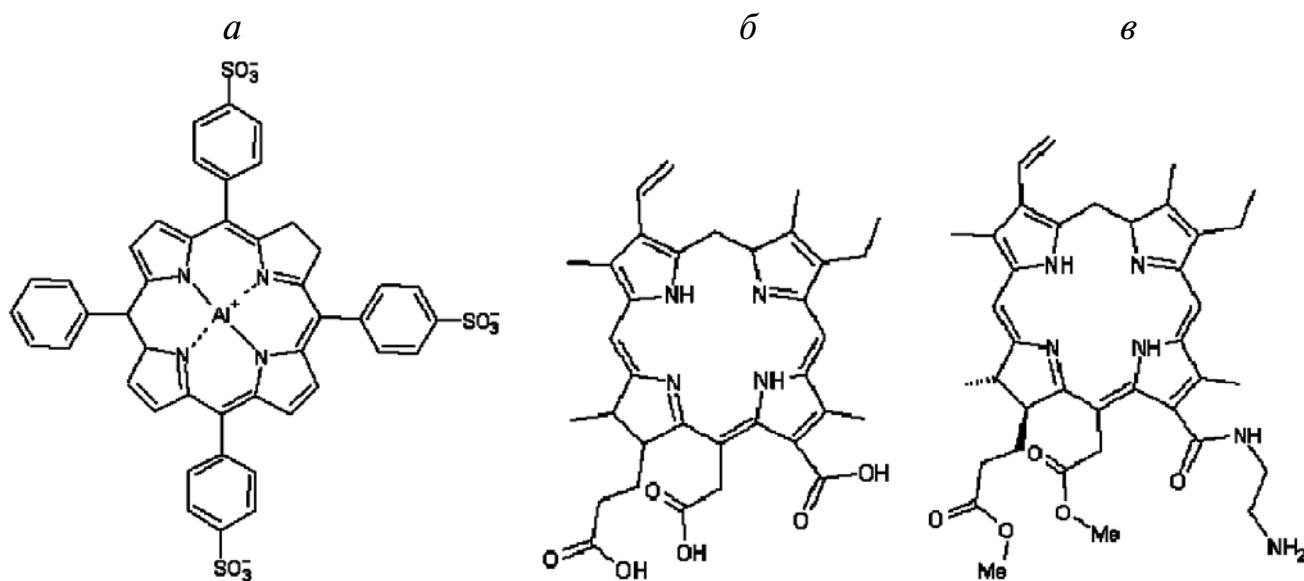


Рис. 1. Структурные формулы трижды сульфированного алюмофталоцианина (а), хлорина e_6 (б) и амида диметилового эфира хлорина e_6 (в)

Tris, pH 7,4. Все эксперименты проводили при комнатной температуре (23–25°).

Электрический ток регистрировали в условиях фиксации потенциала. Разность потенциалов подавали на хлор-серебряные электроды, помещенные в тefлоновую ячейку. Ток измеряли с помощью усилителя Keithley 428 («Keithley Instruments Inc.», США), оцифровывали с помощью NI-DAQmx («National Instruments», США) и анализировали с использованием компьютерной программы WinWCP Strathclyde Electrophysiology Software, написанной Дж. Демпстером (Университет Стратклайда, Великобритания).

БЛМ освещалась ксеноновой лампой-вспышкой с плотностью энергии около 400 мДж/см² и длительностью меньше 2 мс. Стекланный фильтр, отсекающий свет с длиной волны <500 нм, был помещен между вспышкой и ячейкой. Согласно ранее опубликованным данным [26], в присутствии фотосенсибилизатора одиночная вспышка света вызывала уменьшение электрического тока (*I*) через грамицидиновые каналы в мембране. Зависимость тока от времени хорошо описывалась моноэкспоненциальной кривой: $I(t) = (I_0 - I_\infty) \cdot \exp(-t/\tau) + I_\infty$, где I_0 , I_∞ и τ – начальный ток до освещения, стационарный ток, установившийся после вспышки света, и характерное время фотоинактивации, соответственно. Относительная амплитуда фотоинактивации (α) определялась как $\alpha = (I_0 - I_\infty)/I_0$. Электрический ток был вызван приложенной к БЛМ разностью потенциалов в 50 мВ.

Липосомы приготавливали из яичного фосфатидилхолина («Avanti Polar Lipids», США), суспендированного в растворе, содержащем 10 мМ Tris, 100 мМ KCl pH 7,4, с помощью миниэкструдера («Avanti Mini-Extruder», «Avanti Polar Lipids», США), используя поликарбонатные фильтры с диаметром пор 100 нм (Nucleopore). Фотосенсибилизаторы добавляли к липосомам из концентрированных растворов и инкубировали в темноте 24 ч для достижения полного равновесного связывания. Для измерения тушения флуоресценции фотосенсибилизаторов йодид калия добавляли к суспензии липосом. Для предотвращения образования I₂ при окислении I⁻ к липосомам также добавляли Na₂S₂O₃ (10⁻³ М). Интенсивность флуоресценции измерялась на флуориметре FluoroMax-3 («Horiba Jobin Yvon», Япония), $\lambda_{\text{ex}} = 407$ нм.

Липосомы, нагруженные 5,6-карбоксифлуоресцеином («Sigma», США) в концентрации самотушения, были приготовлены из диолеилфосфатидилхолина, суспендированного в 100 мМ растворе карбоксифлуоресцеина, методом экструзии через поликарбонатный фильтр (диаметр пор 100 нм). Полученные липосомы отмывали от

свободного карбоксифлуоресцеина пропуская через колонку с сефадексом G-50, используя буфер 100 мМ KCl, 10 мМ Tris, 10 мМ МЭС, pH 7,0. При измерении выхода карбоксифлуоресцеина липосомы разбавляли до конечной концентрации 5 мкг/мл в том же буфере, и флуоресценцию на длине волны 520 нм (возбуждение 490 нм) измеряли на флуориметре «Panorama» (Россия). Для возбуждения фотосенсибилизаторов с целью индукции фотодинамической пермеабиллизации липосомы освещали источником постоянного света – галогеновой лампой («Novaflex», «World precision Instruments», США) с плотностью мощности 0,77 Вт/см² в течение 60 с. В конце каждого опыта добавляли 0,1%-ный раствор Triton X-100 для регистрации полного выхода карбоксифлуоресцеина. Величина выхода карбоксифлуоресцеина вычислялась как $(F_t - F_0)/(F_{100} - F_0)$, где F_0 и F_t – значения флуоресценции в начальный и произвольный момент времени, F_{100} – значение флуоресценции после полного выхода карбоксифлуоресцеина, вызванного добавлением Triton X-100.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все изученные в данной работе фотосенсибилизаторы вызывали снижение индуцированного грамицидином *A* тока через БЛМ при освещении ее вспышкой света. На рис. 2 изображены примеры записей индуцированного грамицидином *A* тока через БЛМ, нормированного на начальный уровень (I/I_0), в присутствии 0,5 мкМ амида диметилового эфира хлорина e₆ (кривые 2, 3 и 4) и без фотосенсибилизатора (кривая 1). В момент времени, равный 0, мембрана освещалась вспышкой света, после чего в присутствии фотосенсибилизатора происходило уменьшение тока грамицидина, вызванное повреждением части молекул пептида синглетным кислородом. Контрольная кривая 1 показывает, что в отсутствие фотосенсибилизатора ток после вспышки света не менялся. БЛМ была сформирована из раствора DPhPC (кривые 1, 3 и 4) или DOPC (кривая 2) в декане. Кинетики тока после вспышки хорошо описываются моноэкспоненциальной зависимостью с постоянными времени $\tau = 0,44$ с (кривая 4), 0,45 с (кривая 3) и 0,49 с (кривая 2). Эти постоянные времени практически не зависели от используемого липида (DPhPC или DOPC) или присутствия аскорбата. Однако относительная амплитуда фотоинактивации (α) грамицидина существенно зависела от используемого липида и была равна 20,5 и 6,4% для DPhPC и DOPC соответственно, и 9% для DPhPC в присутствии 10 мМ аскорбата.

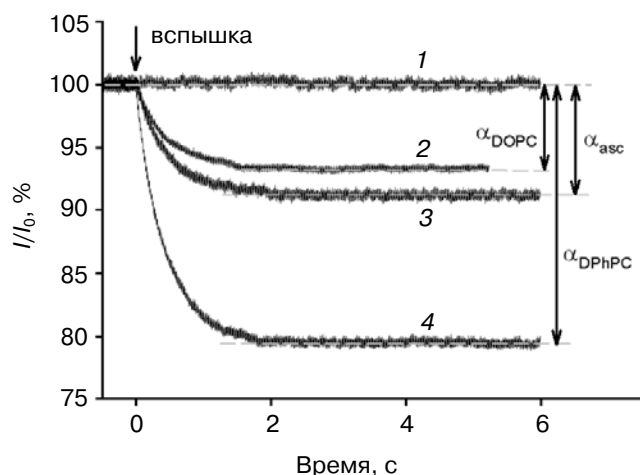


Рис. 2. Запись кинетики относительного тока (I/I_0) при освещении БЛМ вспышкой света в момент времени $t = 0$ с в присутствии $0,5 \text{ мкМ}$ амида диметилового эфира хлорина e_6 (2, 3 и 4) или в отсутствие фотосенсибилизатора (1). БЛМ была сформирована из DPhPC (1, 3 и 4) или из DOPC (2). 3 получена в присутствии 10 мМ аскорбата. Ток через мембрану составлял $0,3 \pm 0,11 \text{ мкА}$

На рис. 3 представлены зависимости относительной амплитуды фотоинактивации грамицидинового тока от концентраций фотосенсибилизаторов для мембран, сформированных из DPhPC (закрашенные значки) и DOPC (пустые значки). В случае больших концентраций фотосенсибилизаторов ($>1 \text{ мкМ}$) и мембраны, сформированной из DPhPC, α увеличивалась согласно ряду $\text{AlPcS}_3 < \text{хлорин } e_6 < \text{амид диметилового эфира хлорина } e_6$. При формировании бислойной липидной мембраны из ненасыщенного липида DOPC амплитуда фотоинактивации грамицидина уменьшалась для всех фотосенсибилизаторов (рис. 3, пустые значки), но степень уменьшения α для этих сенсибилизаторов сильно различалась. Наименьшее изменение α наблюдалось в присутствии AlPcS_3 , где соотношение $\alpha_{\text{DOPC}}/\alpha_{\text{DPhPC}}$ составило $0,75$. Наибольшее ингибирование фотоинактивации грамицидина было в присутствии амида диметилового эфира хлорина e_6 , $\alpha_{\text{DOPC}}/\alpha_{\text{DPhPC}}$ оказалось приблизительно равным $0,3$. Для хлорина e_6 соотношение амплитуд фотоинактивации составило около $0,5$. Таким образом, при фотоинактивации грамицидина антиоксидантное действие ненасыщенных двойных связей липидов зависит от применяемого фотосенсибилизатора.

На мембранах, сформированных из DPhPC, мы сравнили действие аскорбата (водорастворимого тушителя синглетного кислорода) на амплитуду фотоинактивации грамицидина в

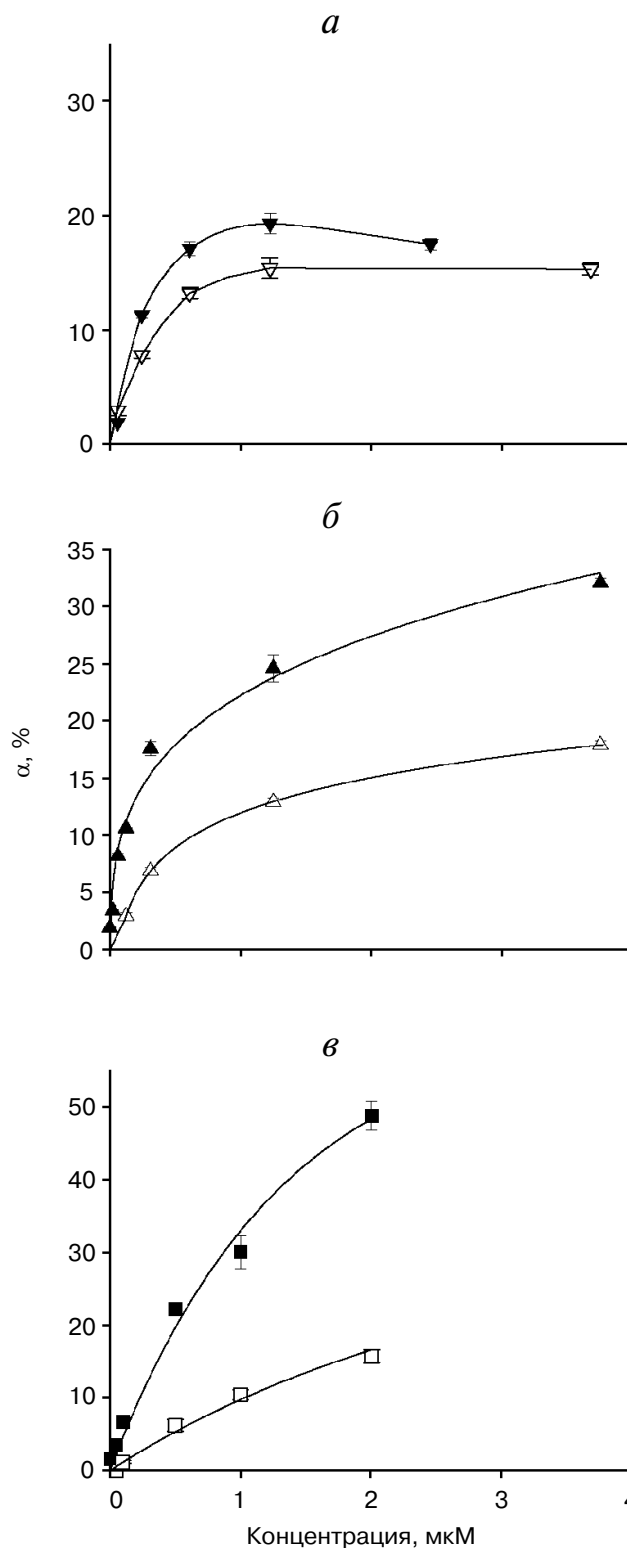


Рис. 3. Зависимость относительной амплитуды фотоинактивации грамицидинового тока α и Std. Err. от концентрации фотосенсибилизаторов в водной среде: а – AlPcS_3 , б – хлорин e_6 и в – амид диметилового эфира хлорина e_6 . БЛМ формировалась из DPhPC (закрашенные значки) или DOPC (пустые значки). Приведенные результаты – усреднение по трем–пяти мембранам

присутствии изучаемых фотосенсибилизаторов. Для всех них аскорбат в концентрации 10 мМ значительно уменьшал α (рис. 4). Наибольшее уменьшение амплитуды фотоинактивации происходило в присутствии AlPcS₃ ($\alpha_{\text{аскорбат}}/\alpha_{\text{контроль}} = 0,35$) и хлорина e₆, меньше всего аскорбат действовал в присутствии амида диметилового эфира хлорина e₆ ($\alpha_{\text{аскорбат}}/\alpha_{\text{контроль}} = 0,56$).

Относительная глубина расположения используемых в данной работе AlPcS₃, хлорина e₆ и амида диметилового эфира хлорина e₆ в липидных мембранах была оценена по тушению флуоресценции фотосенсибилизаторов йодидом калия (KI). Поскольку анионы йодида, в силу своей гидрофильности, находятся в водной фазе, они с большей вероятностью сталкиваются, вызывая тушение флуоресценции, с молекулами водорастворимого красителя – сульфированного алюмофталоцианина, чем с погруженными в мембрану липофильными молекулами хлоринов. На рис. 5 представлены зависимости относительных величин интенсивности флуоресценции для фотосенсибилизаторов от концентрации KI, аппроксимированные согласно уравнению Штерна–Фольмера: $F_0/F = 1 + K_q[\text{KI}]$, где F_0 – флуоресценция в отсутствие тушителя, F – флуоресценция в присутствии определенной концентрации йодида калия. Величины измеренных констант тушения K_q оказались равны 0,733, 0,564 и 0,225 М⁻¹ для AlPcS₃, хлорина e₆ и амида диметилового эфира хлорина e₆ соответственно. Полученные нами данные свидетель-

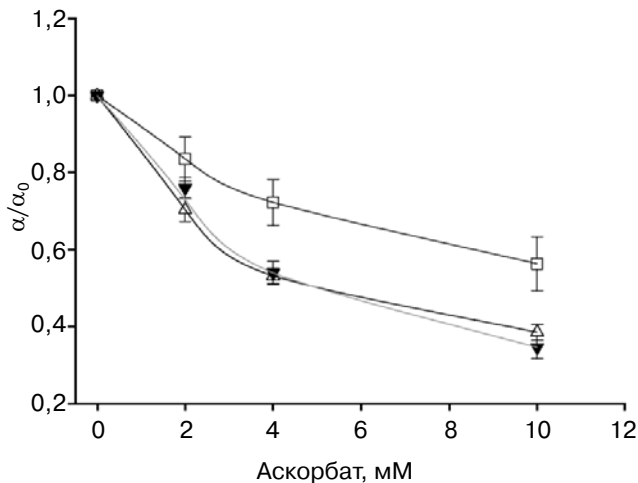


Рис. 4. Зависимость изменения относительной амплитуды фотоинактивации грамицидина от концентрации аскорбата в водной среде в присутствии 0,5 мкМ амида диметилового эфира хлорина e₆ (пустые квадраты, $\alpha_0 = 20,1 \pm 2,3\%$), 0,5 мкМ хлорина e₆ (пустые треугольники, $\alpha_0 = 21,7 \pm 2,4\%$) и 1,3 мкМ AlPcS₃ (закрашенные треугольники, $\alpha_0 = 20,7 \pm 1,2$). Приведенные результаты – усреднение по трем–пяти мембранам

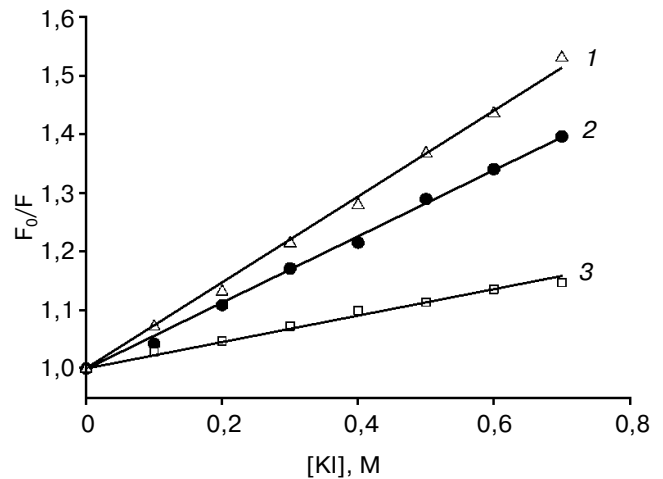


Рис. 5. Зависимости тушения йодидом флуоресценции AlPcS₃ (треугольники, 1), хлорина e₆ (кружки, 2), амида диметилового эфира хлорина e₆ (квадраты, 3) в суспензии 0,1 мг/мл липосом из яичного фосфатидилхолина в координатах Штерна–Фольмера. Концентрация фотосенсибилизаторов составляла 200 нМ; $\lambda_{\text{ex}} = 407$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 672$ нм (хлорин e₆), 669 нм (амид диметилового эфира хлорина e₆) или $\lambda_{\text{em}} = 681$ нм (AlPcS₃). Прямые – результат фиттирования данных

ствуют о том, что глубина локализации хлорина e₆ в мембране больше таковой для AlPcS₃, но меньше глубины погружения в мембрану амида диметилового эфира хлорина e₆.

Согласно [4, 5], от глубины погружения фотосенсибилизатора в мембрану существенно зависит эффективность вызванного им фотодинамического повреждения мембранных мишеней. Этим можно объяснить тот факт, что хлорин e₆ проявляет гораздо большую, чем AlPcS₃, активность в фотодинамической пермеабилитации липосом [27, 28], которая обусловлена окислением двойных связей в жирнокислотных цепях липидов [27, 29]. Для того чтобы сопоставить данную активность исследуемых в настоящей работе фотосенсибилизаторов с относительной глубиной их локализации в мембране, мы измерили фотодинамическую пермеабилитацию липосом по фотосенсибилизированному вытеканию из них карбоксифлуоресцеина. Как видно из рис. 6, в этой системе хлорин e₆ проявляет промежуточную активность между наименьшей для AlPcS₃ и наибольшей для амида диметилового эфира хлорина e₆, что согласуется с данными по тушению флуоресценции йодидом. Следует учесть, что исследуемые фотосенсибилизаторы характеризуются различными квантовыми выходами генерации синглетного кислорода, которые по данным [24, 30] составляют 61% для ами-

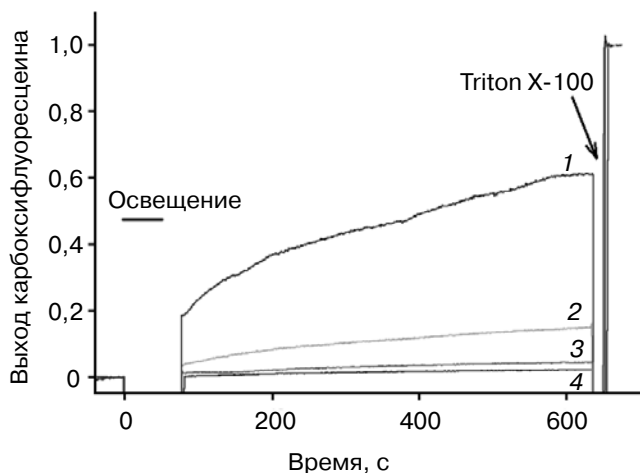


Рис. 6. Вытекание карбоксифлуоресцеина из липосом, измеренное по разгоранию его флуоресценции при фотодинамическом воздействии в присутствии амида диметилового эфира хлорина e_6 (1), хлорина e_6 (2), AlPcS₃ (3) и в отсутствие фотосенсибилизаторов (4)

да диметилового эфира хлорина e_6 , 76% для хлорина e_6 и 38% для AlPcS₃, однако эти различия гораздо меньше наблюдаемой разницы в способности этих соединений сенсibilизировать фотодинамическую пермеабиллизацию липосом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было обнаружено, что ненасыщенные липиды уменьшают фотодинамическое повреждение пептида грамицидина А [23], сенсibilизированное борированным производным хлорина e_6 — ВАСЕ. Такой защитный эффект обусловлен антиоксидантным действием двойных связей ненасыщенных липидов. Существенно, что связывание ВАСЕ с БЛМ не зависело от степени насыщенности липида. По аналогии мы полагаем, что и для других фотосенсибилизаторов адсорбция их на липидные мембраны не меняется при замене насыщенного липида DPhPC на ненасыщенный DOPC. Используемые в данной работе фотосенсибилизаторы имеют разную гидрофобность, поэтому глубина их локализации в мембране различается. Так, ранее было показано [20], что AlPcS₃ сорбируется на поверхности липидной мембраны за счет координационной связи центрального атома алюминия с фосфатной группировкой липида, причем отрицательно заряженные сульфогруппы, находящиеся с разных сторон макроцикла, не позволяют молекуле AlPcS₃ углубиться в липидное окружение. В отличие от AlPcS₃, у хло-

рина e_6 три карбоксильные группы расположены с одной стороны макроцикла (в наших условиях при pH 7,4 все отрицательно заряжены) и обращены в водную фазу, при этом незаряженная часть молекулы располагается в гидрофобном слое мембраны [31]. Также ранее было показано, что глубина погружения хлорина e_6 сильно зависит от pH, что объясняется протонированием карбоксильных групп при низких pH [31]. В молекуле амида диметилового эфира хлорина e_6 карбоксильные группы метилированы, есть только один положительный заряд на свободной аминогруппе этилендиамина. Поэтому можно предположить, что амид диметилового эфира хлорина e_6 более гидрофобен и локализуется в липидной мембране глубже, чем хлорин e_6 . Эти предположения подтверждаются результатами по измерению тушения флуоресценции фотосенсибилизаторов. Константа тушения флуоресценции хлорина e_6 йодидом оказалась существенно больше, чем K_q для амида диметилового эфира хлорина e_6 .

Относительная амплитуда фотоинактивации грамицидиновых каналов уменьшалась в случае мембран, сформированных из DOPC, в присутствии всех используемых фотосенсибилизаторов (рис. 3, пустые значки). Снижение амплитуды оказалось наиболее выражено для амида диметилового эфира хлорина e_6 , который глубже других погружен в мембрану, и минимально для поверхностно-связанного фталоцианина. Повидимому, близкое взаимное расположение молекул фотосенсибилизатора и углеводородных цепей ненасыщенного липида повышает эффективность тушения генерируемого фотосенсибилизатором синглетного кислорода двойными связями, что приводит к сокращению относительной амплитуды фотоинактивации грамицидина. В литературе появляется все больше данных, свидетельствующих о необходимости близкого расположения фотосенсибилизатора и молекулы мишени для эффективного тушения синглетного кислорода [4, 6, 32]. В частности, Соколов с соавт. обнаружили, что при ФДВ водорастворимого алюмофталоцианина повреждение молекул-мишеней синглетного кислорода в модельных липидных мембранах происходило на обеих сторонах мембраны, но скорость повреждения на той стороне мембраны, к которой был добавлен фотосенсибилизатор, была выше [33, 34].

Удивительным кажется то, что двойные связи ненасыщенных липидов так значительно подавляют окисление триптофановых остатков в молекуле грамицидина, тогда как константа скорости дезактивации синглетного кислорода триптофаном на три порядка больше, чем у не-

насыщенных жирных кислот [1, 35]. Однако количество липидов с двойными связями на единицу площади мембраны значительно выше количества молекул грамицидина. В этом можно убедиться, если оценить поверхностную плотность молекул грамицидина в липидной мембране в наших экспериментах, учитывая, что проводимость составляла 8 ± 5 мкСм, площадь мембраны была около $0,5$ мм² и константа равновесия между мономерной и димерной формами грамицидина $K \sim 10^{13} - 10^{14}$ см²/моль [26, 36]. В результате получаем, что, в среднем, одна молекула грамицидина приходится на 5×10^4 нм². В то же время известно, что одна молекула липида в бислоевой мембране занимает $0,7 - 1$ нм² [37]. Таким образом, поверхностная плотность молекул липида более чем на четыре порядка превышает таковую для пептида.

В случае использования нами водорастворимого тушителя аскорбата максимальное уменьшение инактивации грамицидина наблюдается в присутствии хлорина е₆ и AlPcS₃, а минимальное — в присутствии амида диметилового эфира

хлорина е₆. Однако различия не так сильно выражены, как в случае антиоксидантного действия ненасыщенных жирных кислот. Это может быть связано со способностью аскорбиновой кислоты сорбироваться или даже погружаться в липидные мембраны. Об этом косвенно может свидетельствовать достаточной большой для гидрофильной аскорбиновой кислоты коэффициент распределения в системе масло—вода ($\sim 0,01$ [38]).

Существенное влияние глубины погружения фотосенсибилизатора в липидный бислой на эффективность защитного действия ненасыщенных липидов от опосредованного синглетным кислородом повреждения встроенного в мембрану пептида указывает на то, что длина свободного пробега синглетного кислорода в этих условиях сравнима с толщиной бислоя, т.е. близка к величинам, регистрируемым в природных мембранах [1, 39, 40].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 15-04-01755 и 15-04-01688).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krasnovsky, A.A., Jr. (1998) Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies, *Membr. Cell Biol.*, **12**, 665–690.
2. Ehrenberg, B., Anderson, J.L., and Foote, C.S. (1998) Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media, *Photochem. Photobiol.*, **68**, 135–140.
3. Kearns, D.R. (1971) Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen, *Chem. Rev.*, **71**, 395–427.
4. Lavi, A., Weitman, H., Holmes, R.T., Smith, K.M., and Ehrenberg, B. (2002) The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency, *Biophys. J.*, **82**, 2101–2110.
5. Bronshtein, I., Afri, M., Weitman, H., Frimer, A.A., Smith, K.M., and Ehrenberg, B. (2004) Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency, *Biophys. J.*, **87**, 1155–1164.
6. Dror, S.B., Bronshtein, I., Garini, Y., O'Neal, W.G., Jacobi, P.A., and Ehrenberg, B. (2009) The localization and photosensitization of modified chlorin photosensitizers in artificial membranes, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 354–361.
7. Lissi, E.A., Encinas, M.V., Lemp, E., and Rubio, M.A. (1993) Singlet Oxygen O₂(1-Delta-G) Bimolecular processes — solvent and compartmentalization effects, *Chem. Rev.*, **93**, 699–723.
8. Wilkinson, F., Helman, W.P., and Ross, A.B. (1995) Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution — an expanded and revised compilation, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **24**, 663–1021.
9. Davies, M.J. (2005) The oxidative environment and protein damage, *Biochim. Biophys. Acta*, **1703**, 93–109.
10. Giulivi, C., Sarcansky, M., Rosenfeld, E., and Boveris, A. (1990) The photodynamic effect of rose bengal on proteins of the mitochondrial inner membrane, *Photochem. Photobiol.*, **52**, 745–751.
11. Moreno, G., Poussin, K., Ricchelli, F., and Salet, C. (2001) The effects of singlet oxygen produced by photodynamic action on the mitochondrial permeability transition differ in accordance with the localization of the sensitizer, *Arch. Biochem. Biophys.*, **386**, 243–250.
12. Rodrigues, T., De Franca, L.P., Kawai, C., De Faria, P.A., Mugnol, K.C., Braga, F.M., Tersariol, I.L., Smaili, S.S., and Nantes, I.L. (2007) Protective role of mitochondrial unsaturated lipids on the preservation of the apoptotic ability of cytochrome c exposed to singlet oxygen, *J. Biol. Chem.*, **282**, 25577–25587.
13. Strassle, M., and Stark, G. (1992) Photodynamic inactivation of an ion channel: gramicidin A, *Photochem. Photobiol.*, **55**, 461–463.
14. Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., and Kotova, E.A. (1993) The interaction of phthalocyanine with planar lipid bilayers — photodynamic inactivation of gramicidin channels, *FEBS Lett.*, **329**, 332–335.
15. Kunz, L., Zeidler, U., Haegele, K., Przybylski, M., and Stark, G. (1995) Photodynamic and radiolytic inactivation of ion channels formed by gramicidin A: oxidation and fragmentation, *Biochemistry*, **34**, 11895–11903.
16. Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., and Kotova, E.A. (1997) Effect of the dipole potential of a bilayer lipid membrane on gramicidin channel dissociation kinetics, *Biophys. J.*, **73**, 850–854.
17. Rokitskaya, T.I., Block, M., Antonenko, Y.N., Kotova, E.A., and Pohl, P. (2000) Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels, *Biophys. J.*, **78**, 2572–2580.

18. Shapovalov, V.L., Rokitskaya, T.I., Kotova, E.A., Krokhin, O.V., and Antonenko, Y.N. (2001) Effect of fluoride anions on gramicidin photoinactivation sensitized by sulfonated aluminum phthalocyanines, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 1–7.
19. Антоненко Ю.Н., Котова Е.А., Рокицкая Т.И. (2005) Фотодинамическое воздействие как основа релаксационного метода изучения грамицидиновых каналов, *Биологические мембраны*, **22**, 275–289.
20. Pashkovskaya, A.A., Sokolenko, E.A., Sokolov, V.S., Kotova, E.A., and Antonenko, Y.N. (2007) Photodynamic activity and binding of sulfonated metallophthalocyanines to phospholipid membranes: contribution of metal-phosphate coordination, *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 2459–2465.
21. Pashkovskaya, A.A., Maizlish, V.E., Shaposhnikov, G.P., Kotova, E.A., and Antonenko, Y.N. (2008) Role of electrostatics in the binding of charged metallophthalocyanines to neutral and charged phospholipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 541–548.
22. Antonenko, Y.N., Kotova, E.A., Omarova, E.O., Rokitskaya, T.I., Ol'shevskaya, V.A., Kalinin, V.N., Nikitina, R.G., Osipchuk, J.S., Kaplan, M.A., Ramonova, A.A., Moisenovich, M.M., Agapov, I.I., and Kirpichnikov, M.P. (2014) Photodynamic activity of the boronated chlorin E6 amide in artificial and cellular membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 793–801.
23. Rokitskaya, T.I., Kotova, E.A., Agapov, I.I., Moisenovich, M.M., and Antonenko, Y.N. (2014) Unsaturated lipids protect the integral membrane peptide gramicidin A from singlet oxygen, *FEBS Lett.*, **588**, 1590–1595.
24. Moisenovich, M.M., Ol'shevskaya, V.A., Rokitskaya, T.I., Ramonova, A.A., Nikitina, R.G., Savchenko, A.N., Tatarskiy, V.V., Jr., Kaplan, M.A., Kalinin, V.N., Kotova, E.A., Uvarov, O.V., Agapov, I.I., Antonenko, Y.N., and Shtil, A.A. (2010) Novel photosensitizers trigger rapid death of malignant human cells and rodent tumor transplants via lipid photodamage and membrane permeabilization, *PLoS One*, **5**, E12717.
25. Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., and Wescott, W.C. (1963) Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, **67**, 534–535.
26. Rokitskaya, T.I., Antonenko, Y.N., and Kotova, E.A. (1996) Photodynamic inactivation of gramicidin channels: A flash-photolysis study, *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 221–226.
27. Pashkovskaya, A., Kotova, E., Zorlu, Y., Dumoulin, F., Ahsen, V., Agapov, I., and Antonenko, Y. (2010) Light-triggered liposomal release: membrane permeabilization by photodynamic action, *Langmuir*, **26**, 5726–5733.
28. Kotova, E.A., Kuzevanov, A.V., Pashkovskaya, A.A., and Antonenko, Y.N. (2011) Selective permeabilization of lipid membranes by photodynamic action via formation of hydrophobic defects or pre-pores, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 2252–2257.
29. Ytzhak, S., and Ehrenberg, B. (2014) The effect of photodynamic action on leakage of ions through liposomal membranes that contain oxidatively modified lipids, *Photochem. Photobiol.*, **90**, 796–800.
30. Kuznetsova, N.A., Gretsova, N.S., Derkacheva, V.M., Kaliya, O.L., and Lukyanets, E.A. (2003) Sulfonated phthalocyanines: aggregation and singlet oxygen quantum yield in aqueous solutions, *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **7**, 147–154.
31. Zorin, V., Michalovsky, I., Zorina, T., and Khluduev, I. (1996) The distribution of chlorin E6 derivatives in biological systems – investigation of ph-effect, *Proceeding SPIE*, **2625**, 146–155.
32. Vilensky, A., and Feitelson, J. (1999) Reactivity of singlet oxygen with tryptophan residues and with melittin in liposome systems, *Photochem. Photobiol.*, **70**, 841–846.
33. Sokolov, V.S., Block, M., Stozhkova, I.N., and Pohl, P. (2000) Membrane Photopotential generation by interfacial differences in the turnover of a photodynamic reaction, *Biophys. J.*, **79**, 2121–2131.
34. Sokolov, V.S., and Pohl, P. (2009) Membrane Transport Of Singlet Oxygen Monitored By Dipole Potential Measurements, *Biophys. J.*, **96**, 77–85.
35. Krasnovsky, A.A., Kagan, V.E., and Minin, A.A. (1983) Quenching of singlet oxygen luminescence by fatty-acids and lipids – contribution of physical and chemical mechanisms, *FEBS Lett.*, **155**, 233–236.
36. Bamberg, E., and Lauger, P. (1973) Channel formation kinetics of gramicidin A in lipid bilayer membranes, *J. Membrane Biol.*, **11**, 177–194.
37. Nagle, J.F., and Tristram-Nagle, S. (2000) Structure of lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 159–195.
38. Rose, R.C. (1987) Solubility properties of reduced and oxidized ascorbate as determinants of membrane permeation, *Biochim. Biophys. Acta*, **924**, 254–256.
39. Moan, J., and Berg, K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.*, **53**, 549–553.
40. Красновский А.А. (мл.) (2006) Фотодинамическая регуляция биологических процессов: первичные механизмы. В кн. *Проблемы регуляции в биологических системах* (под ред. Рубина А.Б.), Москва, Ижевск, с. 480.

**PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF GRAMICIDIN
CHANNELS IN BILAYER LIPID MEMBRANES:
PROTECTIVE EFFICACY OF SINGLET OXYGEN
QUENCHERS DEPENDS ON PHOTSENSITIZER
LOCATION**

**T. I. Rokitskaya*, A. M. Firsov, E. A. Kotova,
Y. N. Antonenko**

*M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991,
Russia; fax: +7(495)939-3181,
E-mail: rokitskaya@genebeemsu.ru*

Received December 23, 2014
Revision received February 27, 2015

This study examined the impact of double bonds in fatty acyl tails of unsaturated lipids on the photodynamic inactivation of ion channels formed by the pentadecapeptide gramicidin A (gA) in a planar bilayer lipid membrane. The presence of unsaturated acyl tails exerted protection of gA against photodynamic inactivation, with efficacy depending on the depth of a photosensitizer in a membrane. The protective effect of double bonds was maximal with membrane-embedded chlorin e_6 -monoethylenediamine monoamide dimethyl ester, and minimal – in the case of water-soluble trisulfonated aluminum phthalocyanine (AlPcS₃) known to reside at the membrane surface. By contrast, the protective effect of the hydrophilic singlet oxygen scavenger ascorbate was maximal for AlPcS₃ and minimal for chlorin e_6 amide dimethyl ester. The depth of photosensitizer position in a lipid bilayer was estimated from the quenching of photosensitizer fluorescence by iodide. Thus, the protective effect of a singlet oxygen scavenger against the photodynamic inactivation of the membrane-inserted peptide is enhanced upon location of photosensitizer and scavenger molecules in close to each other.

Key words: photodynamic action, gramicidin A, photosensitizer, unsaturated lipids, ascorbate, singlet oxygen, bilayer lipid membrane