

На правах рукописи

Пашковская Алина Андреевна

**РОЛЬ СВЯЗЫВАНИЯ С ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНОЙ В
ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
МЕТАЛЛОФТАЛОЦИАНИНОВ НА ИОННЫЕ КАНАЛЫ
ГРАМИЦИДИНА А**

Специальность 03.00.02 – «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2009

Работа выполнена на Факультете Биоинженерии и Биоинформатики и в Научно-исследовательском Институте физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Антоненко Юрий Николаевич

кандидат биологических наук

Котова Елена Аврамовна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Соловьева Анна Борисовна

доктор биологических наук, профессор

Иванов Илья Ильич

Ведущая организация:

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится 29 октября 2009 года в 14 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.96 при Московском Государственном Университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Воробьевы Горы, МГУ, Биологический факультет, Кафедра биофизики, Новая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан 28 сентября 2009 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д.501.001.96,
доктор биологических наук, профессор

Т.Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фталоцианины – гетероциклические соединения, содержащие сопряженное кольцо тетраазатетрабензопорфина, структурно родственные порфиринам. Они широко используются как красители, молекулярные полупроводники в различных устройствах микроэлектроники, материалы для жидко-кристаллических дисплеев, катализаторы и т.д. Одной из важных областей применения этих соединений в последние десятилетия стала фотодинамическая терапия, где фталоцианины выполняют роль фотосенсибилизаторов. Для медицинского использования существенным свойством фталоцианинов является водорастворимость ряда их производных, которая достигается присоединением анионных или катионных заместителей. Среди анионных фталоцианинов популярными агентами в фотодинамической терапии стали сульфированные фталоцианины алюминия и цинка. Положительно заряженные производные фталоцианинов оказались эффективными агентами для фотодинамической инактивации бактерий, отрицательно заряженная оболочка которых препятствует проникновению анионных фотосенсибилизаторов.

Диссертационная работа посвящена изучению роли связывания фотосенсибилизаторов с мембраной в процессе фотодинамического повреждения мембранных белков на примере фотосенсибилизированной инактивации грамицидиновых каналов в искусственной бислойной липидной мембране (БЛМ) в присутствии замещенных металлофталоцианинов. Актуальность темы определяется значением мембраны как одной из важнейших мишеней фотодинамического воздействия и необходимостью связывания фотосенсибилизатора с мишенью из-за малого радиуса действия активных форм кислорода, вызывающих фотодинамическое повреждение.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось выяснение механизма взаимодействия катионных и анионных металлофталоцианинов с липидной мембраной, ведущего к фотодинамическому повреждению встроенных в нее пептидов.

В работе планировалось решить следующие задачи:

1. Изучить в модельной системе на примере фотосенсибилизированной инактивации ионных каналов, образованных пентадекапептидом грамицидином А в плоских БЛМ различного липидного состава, фотодинамическую активность металлокомплексов фталоцианинов, несущих различные анионные и катионные заместители.

2. С помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии и измерения электрофоретической подвижности липосом исследовать связывание с мембранами ряда

анионных и катионных металлофталоцианинов в зависимости от липидного состава мембран.

3. Сопоставить данные по фотодинамической активности и связыванию фталоцианинов в различных условиях и выяснить природу взаимодействий, определяющих связывание металлофталоцианинов с фосфолипидной мембраной.

Научная новизна и практическая значимость работы. В настоящей диссертационной работе впервые представлены обоснованные доказательства того, что связывание фотосенсибилизаторов с мембраной является необходимым звеном в процессе фотодинамического воздействия на компоненты мембраны. В работе выявлены два основных типа взаимодействий, определяющих фотодинамическую активность и связывание замещенных металлофталоцианинов с мембраной: координационное взаимодействие центрального атома металла с фосфатной группой фосфолипида и электростатическое взаимодействие анионных и катионных заместителей с заряженными головками липидов. Наряду с методом фотосенсибилизированной инактивации грамицидиновых каналов, разработанным в лаборатории Ю.Н. Антоненко, для изучения взаимодействия сенсбилизаторов с мембраной в работе использован метод измерения электрофоретической подвижности липосом, а также метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS). Этот экспериментальный подход применен для изучения связывания фотосенсибилизаторов впервые. Полученные в работе данные вносят вклад в решение фундаментальной проблемы выяснения механизма взаимодействия фотосенсибилизаторов с биологическими мембранами. Результаты работы продемонстрировали плодотворность использования комбинации биофизических методов для изучения взаимодействия фотодинамических агентов с мембранами и могут стать основой для проведения подобных исследований в других лабораториях.

Публикация и апробация работы. По результатам исследований опубликовано 8 работ, из них: одна в реферируемом научном российском журнале («Биохимия»), две в реферируемом научном зарубежном журнале («Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes») и 5 в тезисах конференций.

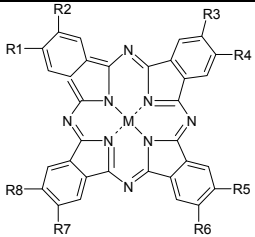
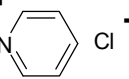
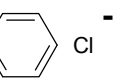
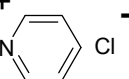
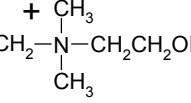
Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста и включает Введение, Литературный обзор, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Выводы и Список цитируемой литературы из 163 ссылок. В работе содержится 52 рисунка и 5 таблиц.

Во **Введении** дано обоснование актуальности диссертационной работы и указаны ее цели и задачи.

В Литературном обзоре проанализированы имеющиеся в литературе данные о структуре и свойствах металлофталоцианинов, влиянии этих свойств на взаимодействие металлофталоцианинов с искусственными и природными мембранами, их фотодинамическую активность.

В Экспериментальной части описаны объекты и методы исследования.

Таблица 1. Структура фталоцианинов, использованных в работе

 <p>R1,R3,R5,R7= SO₃H R2,R4,R6,R8= H</p>	<p>Тетрасульфированные металлофталоцианины (AlPcS₄, ZnPcS₄, NiPcS₄) M = Al, Zn, Ni</p>
<p>+ R1,R3,R5,R7= CH₂N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₃ Cl⁻ R2,R4,R6,R8= H</p>	<p>Тетракис(трибутиламмониометил)гидрокси-фталоцианин алюминия (AlPcN₄)</p>
<p>+ R1,R3,R5,R7=  Cl⁻ R2,R4,R6,R8= H</p>	<p>M-тетракис(пиридиниометил)фталоцианин (AlPcPym₄, ZnPcPym₄) M = Al, Zn</p>
<p>+ R1,R3,R4,R5,R7,R8=  Cl⁻ R2,R6= H</p>	<p>M-гексакис(пиридиниометил)фталоцианин (AlPcPym₆) M = Al</p>
<p>+ R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8=  Cl⁻</p>	<p>M-октакис(пиридиниометил)фталоцианин (AlPcPym₈, ZnPcPym₈) M = Al, Zn</p>
<p>+ R1,R2,R3,R4,R5,R6,R7,R8=  Cl⁻</p>	<p>Октакис[N-(2-гидроксиэтил)-N,N-диметиламмониометил]фталоцианин цинка (ZnPcChol₈)</p>

В работе использованы тетрасульфированные металлофталоцианины, полученные от фирмы «Porphyrin Products» (США), катионный фталоцианин алюминия, синтезированный на кафедре технологии тонкого органического синтеза Ивановского государственного химико-технологического университета, и серия катионных металлофталоцианинов, синтезированных в Научно-исследовательском институте органических полупродуктов и красителей (ГНЦ «НИОПИК»). Все использованные в работе липиды получены от фирмы «Avanti Polar Lipids» (США).

Фотодинамическую активность фталоцианинов измеряли с помощью метода фотосенсибилизированной инактивации грамицидиновых каналов (Антоненко и др.,

2005). Измерения проводили на плоской бислойной липидной мембране, которую формировали по методике Мюллера-Рудина. Для измерения проводимости БЛМ применяли метод фиксации напряжения, в котором на мембрану подавали постоянную разность потенциалов. С одной стороны добавляли фотосенсибилизатор. Освещение производили видимым светом. Измеряли ток, индуцированный грамицидином А.

Для изучения связывания фотосенсибилизаторов был использован метод измерения электрофоретической подвижности липосом, а также метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS). Суть метода измерения электрофоретической подвижности липосом состоит в том, что сорбция молекул фотосенсибилизатора на поверхности липосом приводит к изменению их заряда и выражается в изменении электрокинетического (ζ) потенциала. Метод FCS состоит в измерении флуоресценции от очень малого объема в условиях нахождения в нем небольшого числа флуоресцирующих частиц. Свободные молекулы фотосенсибилизатора в растворе дают лишь короткие всплески флуоресценции малой амплитуды. Добавление липосом приводит к появлению длительных всплесков высокой амплитуды. Для количественной оценки временных характеристик флуоресцентного сигнала вычисляется автокорреляционная функция.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.1 Наличие фосфатной группы в молекуле липида – необходимое условие для фотодинамической активности металлофталоцианинов в липидных мембранах.

Ранее Рокицкой и соавт. (1993, 1996, 2000) было показано, что облучение БЛМ видимым светом в присутствии сульфированного фталоцианина алюминия приводит к падению тока через мембрану, индуцированного грамицидином А, сформированную из дифитаноилфосфатидилхолина (DPhPC). Это явление, опосредованное действием активных форм кислорода, генерируемых при возбуждении молекул фотосенсибилизатора, получило название фотодинамической инактивации грамицидиновых каналов (Антоненко и др., 2005). Нами проведено сравнительное изучение кинетики фотоинактивации грамицидина в БЛМ, сформированных из DPhPC, фосфолипида, несущего два остатка фитановой кислоты, и БЛМ из глицеролмоноолеата – липида, не содержащего фосфатной группы и несущего один остаток олеиновой кислоты.

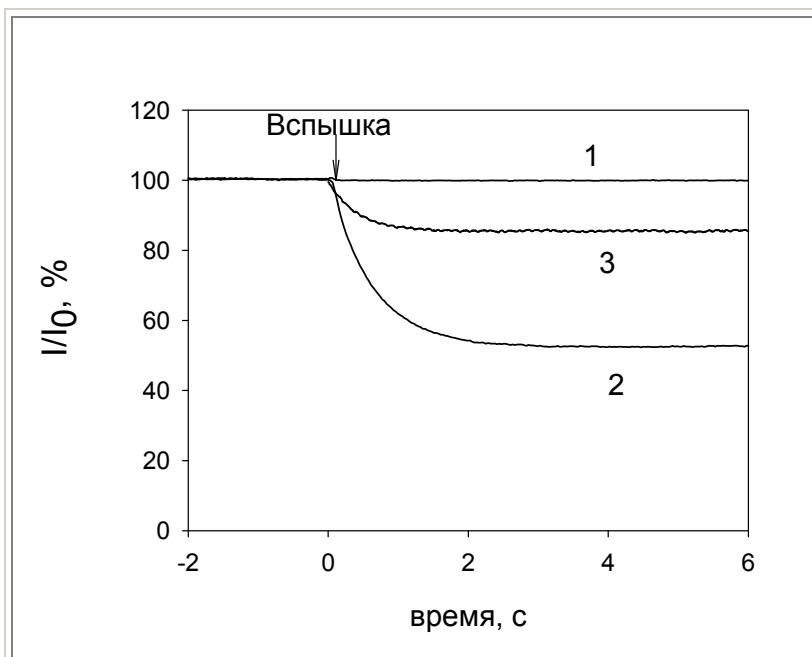


Рис.1. Кинетика фотоинактивации грамицидиновых каналов в БЛМ из DPhPC или глицеролмоноолеата после освещения мембраны фотовспышкой: кривая 1 – в присутствии 1 мкМ AlPcS₄, кривая 2 – в присутствии 1 мкМ бенгальского розового, кривые 1 и 2 – на мембране из глицеролмоноолеата, кривая 3 – в присутствии 6 мкМ AlPcS₄ на мембране из DPhPC .

На Рис.1 представлены кинетики подавления тока через мембрану, сформированную из глицеролмоноолеата (кривые 1 и 2) или DPhPC (кривая 3). С транс-стороны мембраны добавляли фотосенсибилизатор AlPcS₄ (кривые 1 и 3) или бенгальский розовый (кривая 2). После этого в начальный момент регистрации тока производилась вспышка света. Как можно видеть, в случае, когда мембрану формировали из DPhPC,

вспышка света в присутствии AlPcS₄ приводила к подавлению тока на 15% (Рис.1, кривая 3). В случае добавления AlPcS₄ к мембране из глицеролмоноолеата подавления тока после вспышки света не наблюдалось (Рис.1, кривая 1). В присутствии бенгальского розового, напротив, наблюдалось существенное уменьшение тока (на 50%) после вспышки света.

На Рис. 2 освещение мембраны осуществлялось в течение 20 с помощью источника постоянного света. Добавление 1 мкМ AlPcS₄ к БЛМ из DPhPC приводило к повреждению грамицидиновых каналов на A=50 % (Рис.2, кривая 2). Величина A, называемая амплитудой фотоинактивации, отражает долю поврежденных каналов $A = ((I_0 - I) / I_0) \cdot 100 \%$. В отсутствие фотосенсибилизатора освещение не приводило к фотоинактивации грамицидиновых каналов (Рис.2, кривая 1).

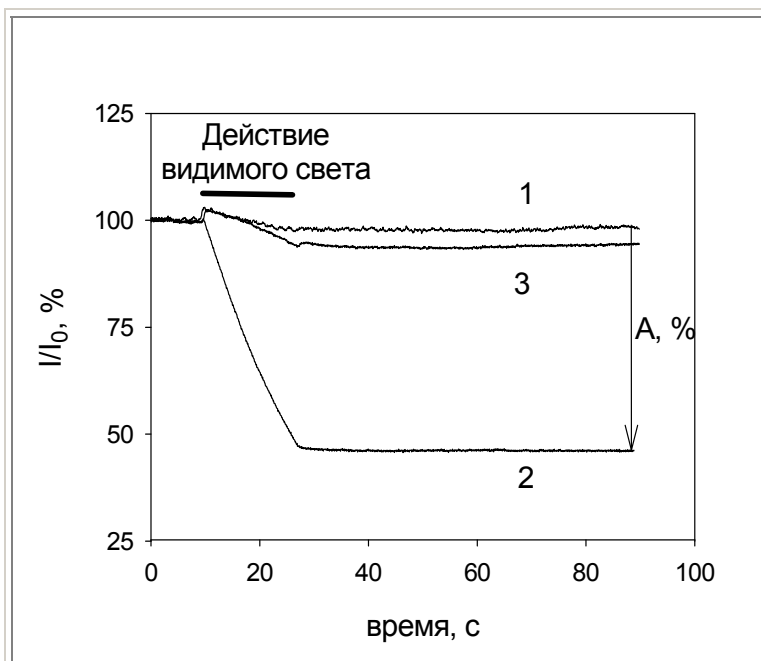


Рис.2. Кинетика фотоинактивации грамицидиновых каналов в БЛМ из DPhPC при освещении источником постоянного света. Кривая 1 – в отсутствие фотосенсибилизатора, кривая 2 – в присутствии 1 мкМ AlPcS₄, кривая 3 – в присутствии 1 мкМ AlPcS₄ и 1 мМ KF. Буферный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ MES, 10 мМ Tris, pH 7.

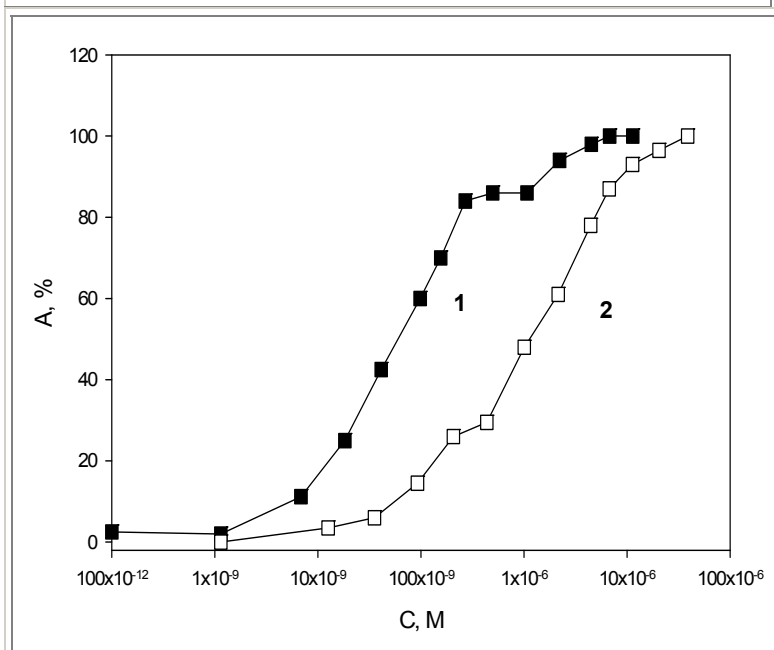


Рис.3. Зависимость амплитуды фотоинактивации грамицидина A в мембране из DPhPC от концентрации AlPcS₄. Кривая 1 – буферный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ MES, 10 мМ Tris, pH=7. Кривая 2 – буферный раствор содержал 100 мМ K₂HPO₄, 10 мМ MES, 10 мМ Tris, pH 7.

Отсутствие фотодинамической активности AlPcS₄ в мембране из глицеролмоноолеата, в совокупности с данными Рокицкой и соавт. (2000) о необходимости связывания фотосенсибилизаторов с липидной мембраной для эффективного фотодинамического воздействия на встроенные в мембрану молекулы грамицидина, позволяет нам предположить, что связывание алюмофталоцианина с фосфолипидной мембраной опосредовано фосфатной группой фосфолипида.

Это предположение было проверено в опытах по влиянию добавления фосфата калия в среду на фотодинамическую активность AlPcS₄. Замена 100 мМ KCl в буферном растворе на 100 мМ K₂HPO₄ приводила к существенному ослаблению фотоинактивации грамицидиновых каналов в мембране из DPhPC в присутствии AlPcS₄ (Рис.3, кривые 1 и 2). Зависимость амплитуды фотоинактивации от концентрации AlPcS₄ в фосфатном буфере сместилась на 2 порядка в сторону больших

концентраций по отношению к таковой в буфере, содержащем KCl. Таким образом,

полученные данные подтвердили нашу гипотезу о важной роли, которую в процессе связывания красителей с фосфолипидной мембраной играет взаимодействие центрального атома металла фталоцианинов с фосфатными группами фосфолипидов.

1.2 Зависимость эффективности фотодинамической инактивации грамицидиновых каналов в присутствии металлофталоцианинов от природы центрального атома металла.

В настоящей работе были изучены тетрасульфированные фталоцианины, содержащие в качестве центрального атома металла атомы алюминия, цинка и никеля. Кроме того, был исследован также положительно-заряженный фталоцианин алюминия, а именно тетра(трибутиламмонийметил)гидрокси-фталоцианин алюминия ($AlPcN_4$). На Рис.4 представлены зависимости амплитуды фотоинактивации грамицидиновых каналов от концентрации $AlPcN_4$, $AlPcS_4$, $ZnPcS_4$ и $NiPcS_4$.

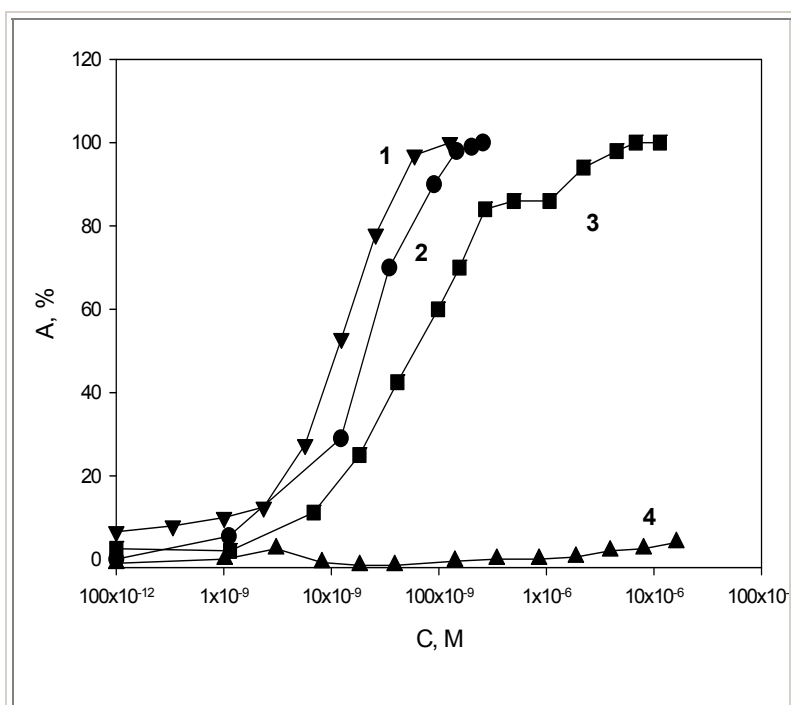


Рис.4. Зависимость амплитуды фотоинактивации грамицидина A в мембране из DPhPC от концентрации фотосенсибилизаторов. Кривая 1 – $AlPcN_4$, кривая 2 – $ZnPcS_4$, кривая 3 – $AlPcS_4$, кривая 4 – $NiPcS_4$. Буферный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ MES, 10 мМ Tris, pH 7.

На Рис.4 видно, что из исследованных фотосенсибилизаторов катионный фталоцианин алюминия, $AlPcN_4$, проявлял наибольшую фотодинамическую активность в данной системе, т.е. вызывал подавление активности грамицидиновых каналов при наиболее низких концентрациях (Рис.4, кривая 1). $NiPcS_4$ фотоинактивацию грамицидина не вызывал (Рис.4, кривая 4). Если сравнивать фотодинамическое действие $ZnPcS_4$ и $AlPcS_4$, то цинкфталоцианин является более эффективным

фотосенсибилизатором в данной системе, чем алюмофталоцианин (Рис.4, кривые 2 и 3).

Различия в фотодинамической активности ряда фталоцианинов могут быть обусловлены различиями в 1) квантовом выходе генерации синглетного кислорода (Φ_{Δ}) и 2) связывании с мембраной. Согласно результатам наших измерений (по кинетике светозависимого падения флуоресценции 9,10-диметилантрацена), Φ_{Δ} для

тетраакатионного фталоцианина алюминия, растворенного в DMSO, несколько меньше Φ_{Δ} для $ZnPcS_4$ в тех же условиях (Таблица 2). Эти данные не соответствуют различиям в фотодинамической активности $AlPcN_4$ и $ZnPcS_4$ (Рис.4).

Таблица 2. Квантовый выход генерации синглетного кислорода (Φ_{Δ}) различными металлофталоцианинами

	Φ_{Δ}
$ZnPcS_4$	0,68
$AlPcN_4$	0,6
$AlPcS_4$	0,1
$NiPcS_4$	0
$AlPcN_4+KF$	0,63

1.3 Связывание с липидной мембраной ряда металлофталоцианинов в сравнении с фотодинамическим воздействием этих сенсibilизаторов на грамицидиновые каналы.

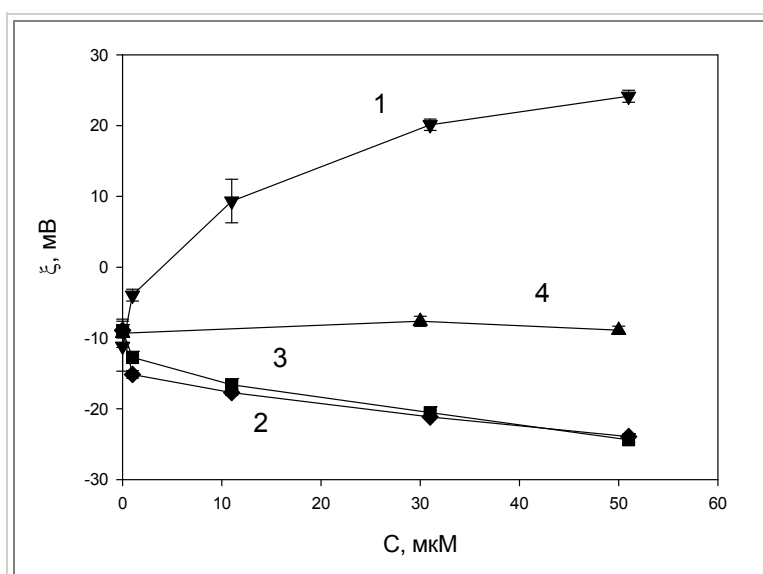


Рис.5. Зависимость ζ -потенциала липосом из яичного фосфатидилхолина от концентрации фталоцианинов. Кривая 1 – $AlPcN_4$, кривая 2 – $ZnPcS_4$, кривая 3 – $AlPcS_4$, кривая 4 – $NiPcS_4$. Буферный раствор содержал 10 мМ KCl, 5 мМ MES, 5 мМ Tris, pH 7.

На Рис.5 представлена зависимость ζ -потенциала липосом из яичного фосфатидилхолина от концентрации фотосенсibilизаторов. Видно, что добавление $AlPcN_4$ (кривая 1) приводит к более значительному росту абсолютной величины электрокинетического потенциала, чем добавление тетрасульфированных фталоцианинов цинка и алюминия (кривые 2 и 3). Это показывает, что $AlPcN_4$

эффективнее связывается с липосомами из фосфатидилхолина, чем $AlPcS_4$ и $ZnPcS_4$. В случае добавления $NiPcS_4$ электрофоретическая подвижность липосом не изменялась (кривая 4), т.е. этот краситель не сорбировался на поверхности липосом.

Таким образом, данные по электрофоретической подвижности липосом в присутствии заряженных фталоцианинов коррелируют с измерениями их фотодинамической активности, позволяя сделать вывод о том, что именно различия в связывании с липидом являются причиной различий в фотодинамическом действии.

В силу важности полученной корреляции были проведены опыты по измерению связывания фталоцианинов с мембраной другим методом, а именно методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS). Экспериментальная установка представляет собой микрофлуориметр, регистрирующий флуоресценцию F лишь от малого объема, по порядку величины составляющего 10^{-15} литра. Для возбуждения флуоресценции применяли He-Ne лазер с длиной волны 633 нм. Для количественной обработки флуктуирующего сигнала $F(t)$ производится вычисление автокорреляционной функции:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

где $\langle F(t) \rangle$ – средняя интенсивность флуоресценции, а $F(t) - \langle F(t) \rangle$ – отклонение от среднего значения. Для случая трехмерной диффузии частиц функция $G(\tau)$ имеет вид:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{w_0^2 \cdot \tau}{z_0^2 \cdot \tau_d}}} \right) \quad (2),$$

где N – среднее число флуоресцирующих частиц в конфокальном объеме, w_0 , z_0 – геометрические характеристики конфокального объема, τ_d – среднее время нахождения в конфокальном объеме, которое определяется размером частиц.

На Рис.6 представлены данные по связыванию AlPcS₄ (правая панель) и AlPcN₄ (левая панель) с мембранами липосом, приготовленных из яичного фосфатидилхолина. Приведены типичные сигналы флуоресценции фотосенсибилизаторов, которые в данной шкале имеют вид прямой линии (панели А и В, кривые 1). Ниже приведены автокорреляционные функции двух красителей, характерное время корреляции которых составляет около 100 мкс (панели Б и Г). Средний ряд графиков соответствует добавлению липосом (панели А и В, кривые 2 и 3). Видно, что в случае AlPcN₄ в записи флуоресценции появляются длительные пики высокой амплитуды (Рис.6, панель А, кривая 2) и происходит сдвиг автокорреляционной функции в область более

продолжительных времен (Рис.6, панель Б, кривая 2). Оба наблюдения свидетельствуют о связывании красителя с мембранами липосом.

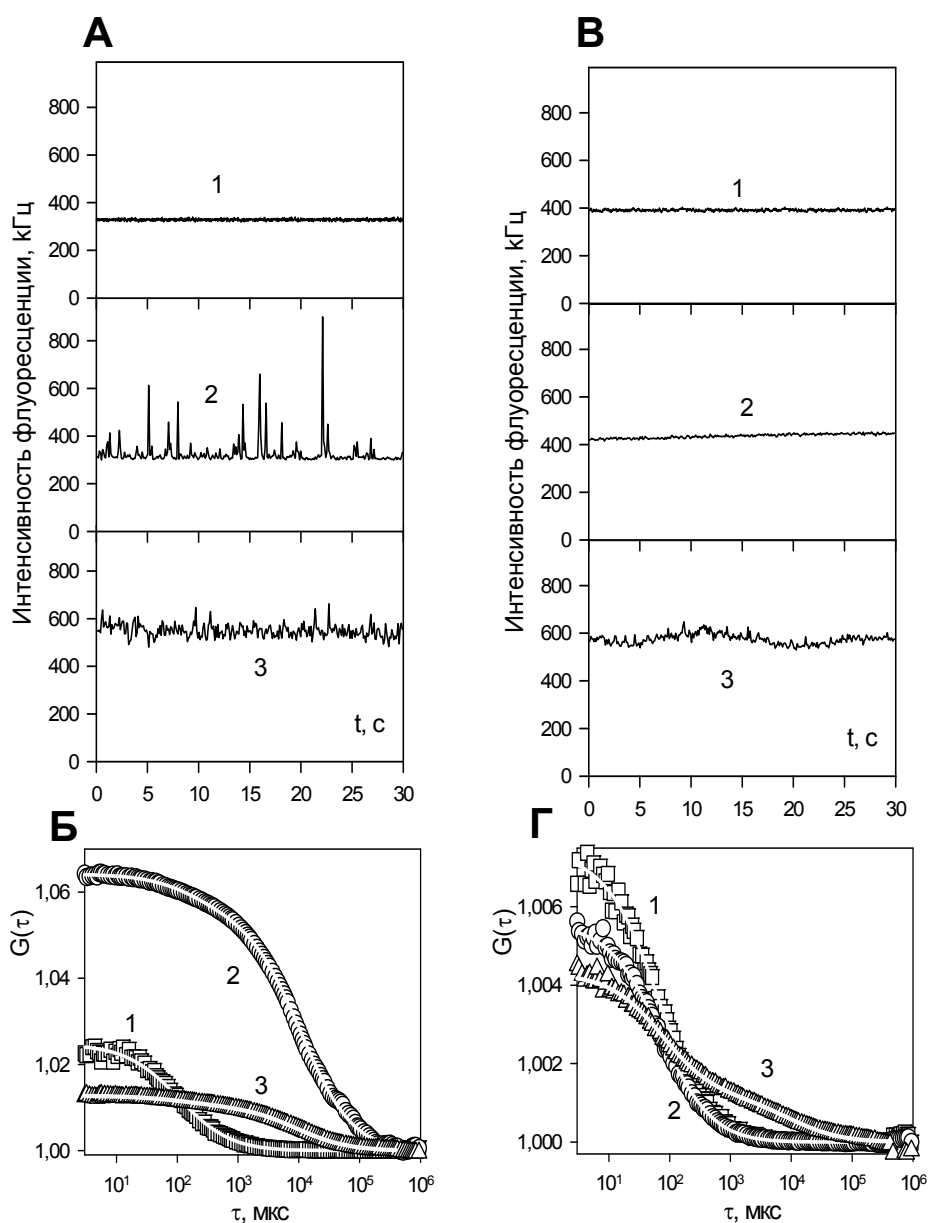


Рис.6. Связывание AlPcN_4 (левая часть, панели А, Б) и AlPcS_4 (правая часть, панели В, Г) с фосфатидилхолиновыми липосомами, измеренное методом FCS. Записи сигнала флуоресценции (панели А, В) и автокорреляционные функции (панели Б, Г). Кривые 1 – контроли, измеренные в отсутствие липосом, в присутствии 300 нМ AlPcN_4 (левая часть) и 300 нМ AlPcS_4 (правая часть); кривые 2 – в присутствии 0,0067 мг/мл липосом; кривые 3 – в присутствии 0,67 мг/мл липосом. Экспериментальные данные хорошо аппроксимируются теоретической кривой (2) со следующими параметрами: панель Б, кривая 1 – 0,103 мс; кривая 2 – 0,20 мс (14 %) и 11 мс (86 %); кривая 3 – 0,126 мс (18 %) и 9,2 мс (82 %); панель Г, кривая 1 – 0,066 мс; кривая 2 – 0,072 мс; кривая 3 – 0,076 мс (72 %) и 9,6 мс (28 %).

1.3 Сравнение действия фторид-иона на фотоинактивацию грамицидиновых каналов, сенсibilизированную положительно и отрицательно заряженными металлофталоцианинами.

Ранее было показано, что добавление фторид-ионов приводит к подавлению фотоинактивации грамицидиновых каналов в присутствии сульфированных фталоцианинов алюминия и десорбции этих фотосенсибилизаторов с поверхности нейтральных липидных мембран (Rokitskaya et al., 2000). Этот результат трактовался как следствие возрастания отрицательного заряда красителя при присоединении аниона фторида к центральному атому алюминия в молекуле алюмофталоцианина. Такая трактовка предполагала, что добавление фторид-ионов должно вызывать возрастание сорбции $AlPcN_4$ на поверхности липосом вследствие уменьшения общего положительного заряда молекулы при связывании аниона фторида, приводящего к повышению липофильности молекулы. Однако поставленные нами опыты не подтвердили данного предположения.

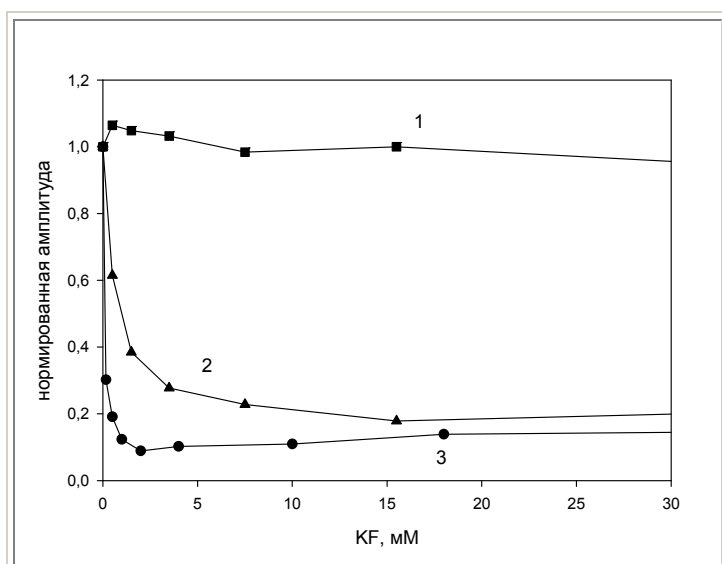


Рис.7. Зависимость амплитуды фотоинактивации грамицидина А в мембране из DPhPC от концентрации фторида калия. Кривая 1 – $ZnPcS_4$, кривая 2 – $AlPcN_4$, кривая 3 – $AlPcS_4$. Буферный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ MES, 10 мМ Tris, pH 7.

Как видно на Рис.2 (кривая 3), добавление 1 мМ KF приводит к почти полному снятию действия света на грамицидиновые каналы в присутствии $AlPcS_4$, в соответствии с данными, полученными Рокицкой и соавт. (2000). На Рис.7 представлена зависимость нормированной амплитуды фотоинактивации грамицидиновых каналов от концентрации фторид-анионов для ряда фотосенсибилизаторов: $ZnPcS_4$, $AlPcS_4$ и $AlPcN_4$.

Согласно полученным данным, фторид калия подавляет фотоинактивацию грамицидиновых каналов в нейтральных мембранах в присутствии $AlPcN_4$ (Рис.7, кривая 2), так же как и в присутствии $AlPcS_4$ (Рис.7, кривая 3) и не действует на фотодинамическую активность $ZnPcS_4$ (Рис.7, кривая 1).

1.4 Сравнение влияния фторид-иона на связывание с мембраной положительно и отрицательно заряженных металлофталоцианинов.

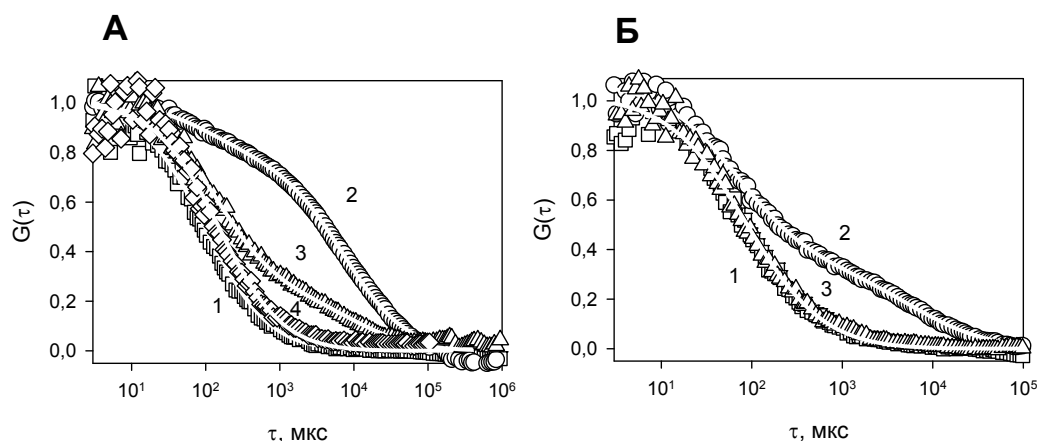


Рис.8 Действие KF на связывание AlPcN₄ (А) и AlPcS₄ (Б) с фосфатидилхолиновыми липосомами, измеренное методом FCS. Кривые 1 – автокорреляционные функции без липосом, в присутствии 300 нМ AlPcN₄ (А) и AlPcS₄ (Б); кривые 2 – в присутствии 0,67 мг/мл липосом; кривые 3 – после добавления 1 мМ KF; кривая 4 – после добавления 10 мМ KF. Экспериментальные данные хорошо аппроксимируются теоретической кривой (2) со следующими параметрами: панель А, кривая 1 – 0,1 мс; кривая 2 – 0,1 мс (22 %) и 7,3 мс (78 %); кривая 3 – 0,14 мс (77 %) и 10,6 мс (23 %); кривая 4 – 0,15 мс. панель Б, кривая 1 – 0,09 мс; кривая 2 – 0,07 мс (69 %) и 6,3 мс (31 %); кривая 3 – 0,08 мс.

На Рис.8 показано влияние фторид-аниона на связывание AlPcN₄ и AlPcS₄ с мембранами липосом из яичного фосфатидилхолина, измеренное методом FCS. В случае AlPcN₄ добавление липосом приводит к появлению плеча на автокорреляционной функции (Рис.8, панель А, кривая 2). Добавление KF вызывает исчезновение этого плеча (Рис.8, панель А, кривая 4). В случае AlPcS₄ добавление липосом приводит к появлению плеча на автокорреляционной функции, но это не так ярко выражено, как в случае катионного алюмофталоцианина (Рис.8, панель Б, кривая 2). Добавление фторида калия к липосомам с тетрасульфированным алюмофталоцианином вызывает исчезновение этого плеча (Рис.8, панель Б, кривая 3). При сравнении кривой 2 (панель А) в отсутствие KF и кривой 4 (панель А) в присутствии 10 мМ KF видно, что как и в случае AlPcS₄ (Рис.8, панель Б, кривые 2 и 3), фторид-ион вызывает десорбцию AlPcN₄ с поверхности мембран липосом.

Таким образом, данные по фотоинаktivации грамицидиновых каналов коррелируют с данными, полученными методом FCS, о том, что фторид-анион вызывает десорбцию AlPcN₄ с поверхности мембраны.

1.5 Действие анионов фторида и фосфата на спектры флуоресценции металлофталоцианинов.

При измерении спектров флуоресценции выявлен коротковолновый сдвиг положения максимума в спектре флуоресценции AlPcN₄ в этаноле под действием фторид-

ионов (Рис. 9), аналогичный сдвигу для $AlPcS_4$, что свидетельствует об образовании комплекса фторида-иона с фталоцианином алюминия. Подобный сдвиг наблюдался в наших экспериментах и под действием фосфат-иона.

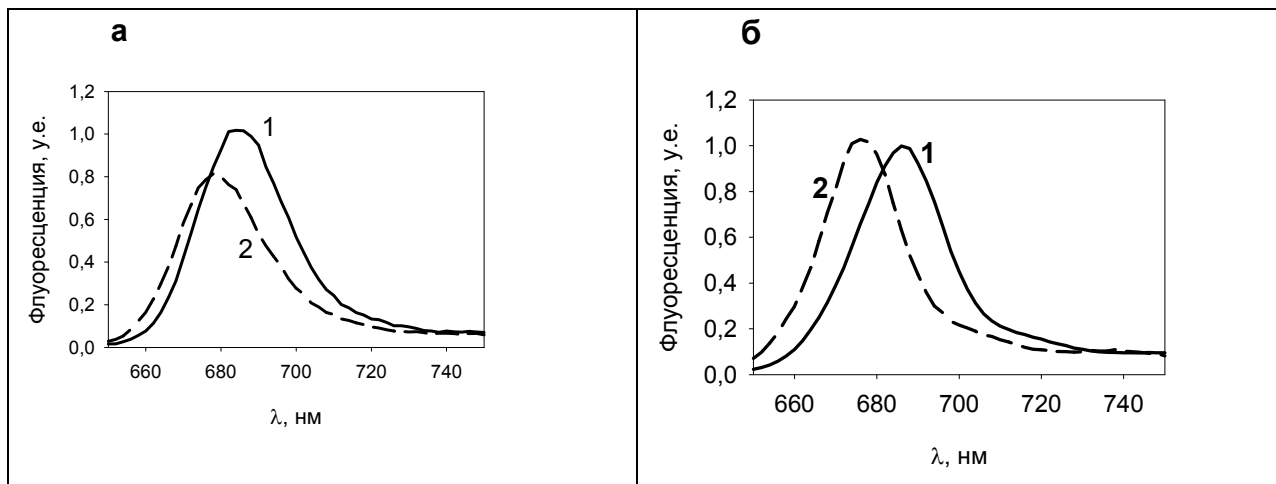


Рис. 9. Спектры флуоресценции $AlPcN_4$ (а) и $AlPcS_4$ (б) в этаноле в отсутствие (сплошные линии) и в присутствии 1 мМ KF (штриховые линии).

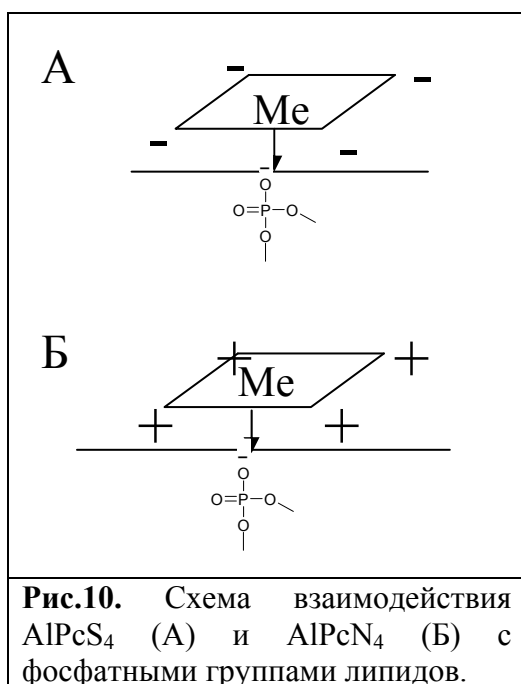


Рис.10. Схема взаимодействия $AlPcS_4$ (А) и $AlPcN_4$ (Б) с фосфатными группами липидов.

На основании полученных данных нами выдвинута гипотеза о важной роли координационного взаимодействия центрального атома металла фталоцианина с фосфатной группой липида в связывании металлофталоцианинов с фосфатидилхолиновой мембраной. Кроме того, мы предполагаем, что на эффективность координационного взаимодействия центрального атома металла фталоцианинов с фосфатной группой липида значительное влияние оказывает электрическое поле, которое создают заряды, расположенные на периферии молекулы фталоцианина. Четыре отрицательных заряда в

случае $AlPcS_4$ существенно препятствуют взаимодействию красителя с фосфатной группой липида, в то время как четыре положительных заряда в случае $AlPcN_4$ такое взаимодействие облегчают (Рис.10).

Эффект фторид-ионов хорошо объясняется в рамках предположения о том, что связывание $AlPcN_4$ с фосфолипидной мембраной, так же как и в случае сульфированных металлофталоцианинов, определяется координационным взаимодействием центрального атома металла с фосфатной группой липида, которая может быть вытеснена из

координационной сферы алюминия вследствие конкурентного замещения фторид-ионом (Рис.11).

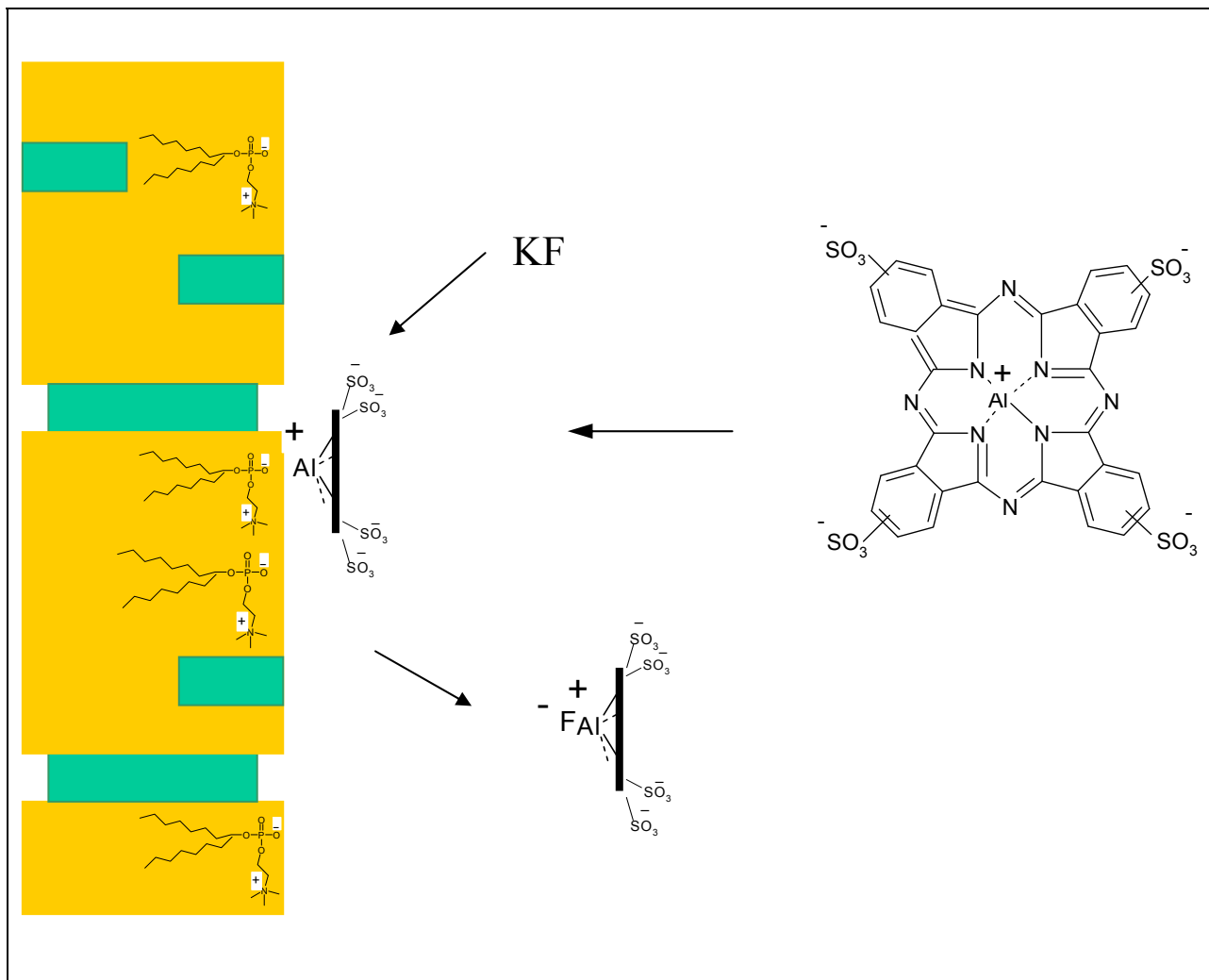


Рис.11. Схема комплексообразования KF с $AlPcS_4$, которое приводит к десорбции $AlPcS_4$ с поверхности мембраны.

2.1 Влияние заряда мембраны на связывание катионных и анионных фталоцианинов.

Для изучения влияния заряда мембраны на эффективность связывания были поставлены опыты с отрицательно заряженными липосомами (из фосфатидилсерина мозга быка) и положительно заряженными липосомами (с добавлением цетилтриметиламмония, СТАВ).

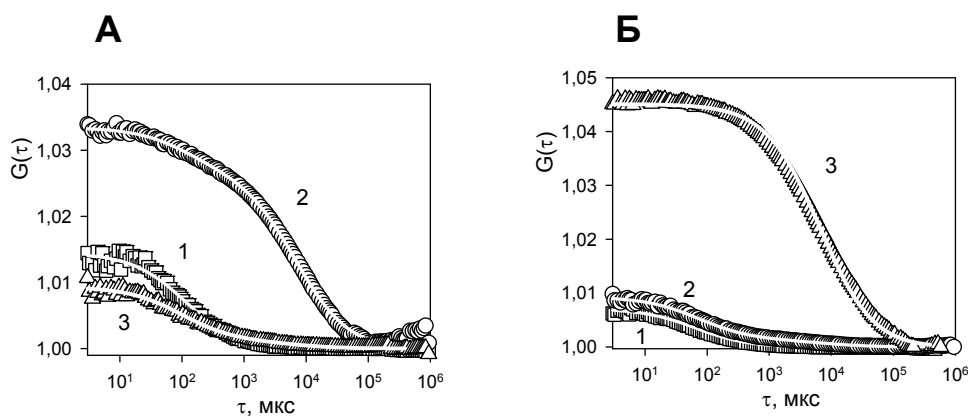


Рис.12. Влияние СТАВ на связывание AlPcN_4 (панель А) и AlPcS_4 (панель Б) с фосфатидилхолиновыми липосомами, измеренное методом FCS. Кривая 1 – автокорреляционная функция в отсутствие липосом, в присутствии 300 нМ AlPcN_4 ; кривая 2 – в присутствии 0,67 мг/мл липосом; кривая 3 – после добавления 200 мкМ СТАВ. Экспериментальные данные хорошо аппроксимируются теоретической кривой (2) со следующими параметрами τ_D : панель А (AlPcN_4) кривая 1 – 114 мкс; кривая 2 – 116 мкс (19 %), 6900 мкс (81 %); кривая 3 – 100 мкс (87 %), 6200 мкс (13 %); панель Б (AlPcS_4) кривая 1 – 66 мкс; кривая 2 – 74 мкс (85 %), 7700 мкс (15 %); кривая 3 – 6600 мкс.

На Рис.12 представлены данные, полученные методом FCS, по влиянию положительно заряженного амфифильного вещества СТАВ на связывание AlPcN_4 (панель А) и AlPcS_4 (панель Б) с липосомами, приготовленными из яичного фосфатидилхолина. В случае AlPcN_4 добавление липосом вызывает сдвиг автокорреляционной функции в сторону больших времен (Рис.12, панель А, кривая 2). Добавление СТАВ приводит к практически полному возвращению автокорреляционной функции к контролю (Рис.12, панель А, кривая 3). В случае AlPcS_4 , в согласии с ранее описанными данными, добавление липосом не вызывает значительных изменений автокорреляционной функции (Рис.12, панель Б, кривая 2), тогда как добавление СТАВ к липосомам из фосфатидилхолина в присутствии AlPcS_4 приводит к значительным изменениям (Рис.12, панель Б, кривая 3). Автокорреляционная функция при этом сдвигается вправо, т.е. введение положительного заряда на поверхность нейтральных липосом увеличивает связывание анионного алюмофталоцианина.

Мы также изучили влияние заряда мембраны на связывание катионных и анионных фталоцианинов другим способом, а именно: методом измерения ζ -потенциала липосом. На Рис.13 представлена зависимость ζ -потенциала отрицательно заряженных липосом, приготовленных из липида *E.coli*, от концентрации фотосенсибилизаторов. Добавление катионного фотосенсибилизатора AlPcN_4 к таким липосомам приводило к резкому изменению электрофоретической подвижности (Рис.13, кривая 1), что выражалось в

изменении знака ζ -потенциала. В случае анионных фотосенсибилизаторов электрофоретическая подвижность липосом изменялась слабо. Можно заключить, что анионные фталоцианины не сорбировались на поверхности отрицательно заряженных липосом (Рис. 13, кривые 2, 3, 4).

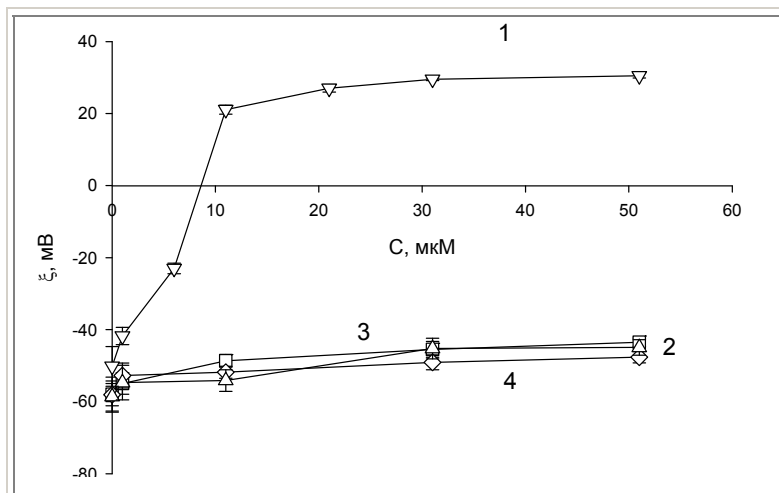


Рис.13. Зависимость ζ -потенциала липосом, приготовленных из липида *E.coli*, от концентрации фталоцианинов. Кривая 1 – AlPcN₄, кривая 2 – ZnPcS₄, кривая 3 – AlPcS₄, кривая 4 – NiPcS₄. Буферный раствор содержал 10 мМ KCl, 5 мМ MES, 5 мМ Tris, pH 7.

Из данных по измерению ζ -потенциала следует, что AlPcN₄ наиболее эффективно из изученного ряда фотосенсибилизаторов связывается как с отрицательно заряженными липосомами из липида *E. coli* (Рис.13), так и с нейтральными липосомами из фосфатидилхолина (Рис.5).

2.2 Значение электростатического взаимодействия с липидной мембраной для фотодинамической активности металлофталоцианинов.

На Рис.14 представлены зависимости амплитуды фотоинактивации грамицидиновых каналов в присутствии AlPcN₄, AlPcS₄ и ZnPcS₄ для мембран, содержащих кислые липиды. Ранее (Рис.4) аналогичные данные были показаны для мембраны из нейтрального липида (DPhPC). Сравнение этих двух рисунков показывает существенно большую разницу в активности изученных фотосенсибилизаторов на отрицательно заряженных мембранах, приготовленных из смеси DPhPC и анионного липида дифитаноилфосфатидилглицерола (DPhPG), чем на нейтральных мембранах.

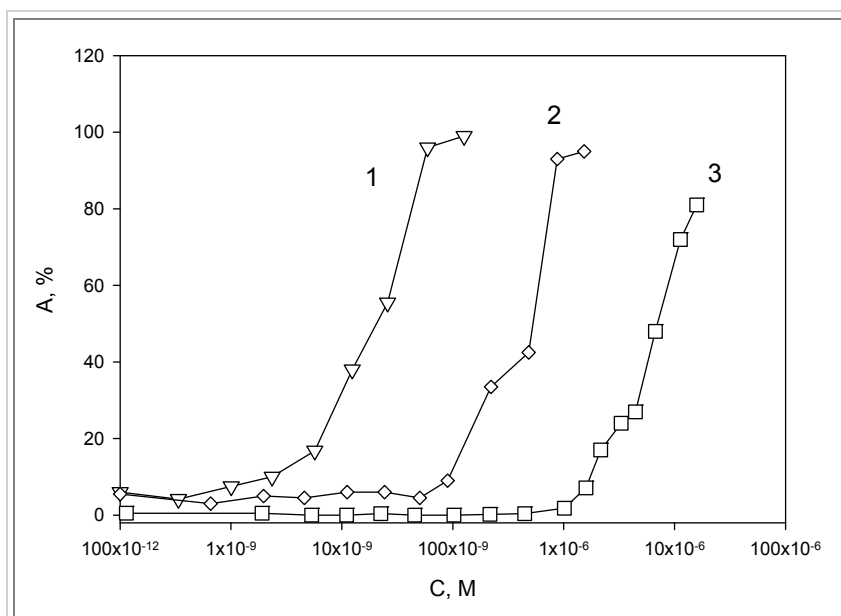


Рис.14. Зависимость амплитуды фотоинактивации грамицидина A в мембране из смеси DPhPC/DPhPG (70/30%) от концентрации фотосенсибилизаторов. Кривая 1 – AlPcN₄, кривая 2 – ZnPcS₄, кривая 3 – AlPcS₄. Буферный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ MES, 10 мМ Tris, pH 7.

Данные по фотоинактивации грамицидиновых каналов хорошо коррелируют с результатами измерений ζ -потенциала. Учитывая данные по квантовому выходу генерации синглетного кислорода для ZnPcS₄, AlPcS₄ и AlPcN₄ (Таблица 2), можно заключить, что существенные различия в фотодинамической активности положительно и отрицательно заряженных

фталоцианинов на липидных мембранах, и в особенности на тех, которые содержат анионные липиды, объясняются различиями в связывании фталоцианинов. Эти результаты свидетельствуют о значительном вкладе электростатического взаимодействия в процесс связывания заряженных фталоцианинов с мембраной.

Мы провели систематическое исследование фотодинамической активности (по фотосенсибилизированной инактивации грамицидиновых каналов) и связывания с фосфолипидной мембраной (по изменению электрофоретической подвижности липосом) целого ряда тетра-, гекса- и октакатионных металлофталоцианинов, полученных из НИОПИК, в сравнении с тетрасульфированными металлофталоцианинами.

Оказалось, что на нейтральной мембране из DPhPC эффективнее действуют тетрасульфированные фталоцианины цинка и алюминия (Рис. 15, кривые 1 и 2), чем октакатионные металлофталоцианины (Рис. 15, кривые 3, 4 и 5).

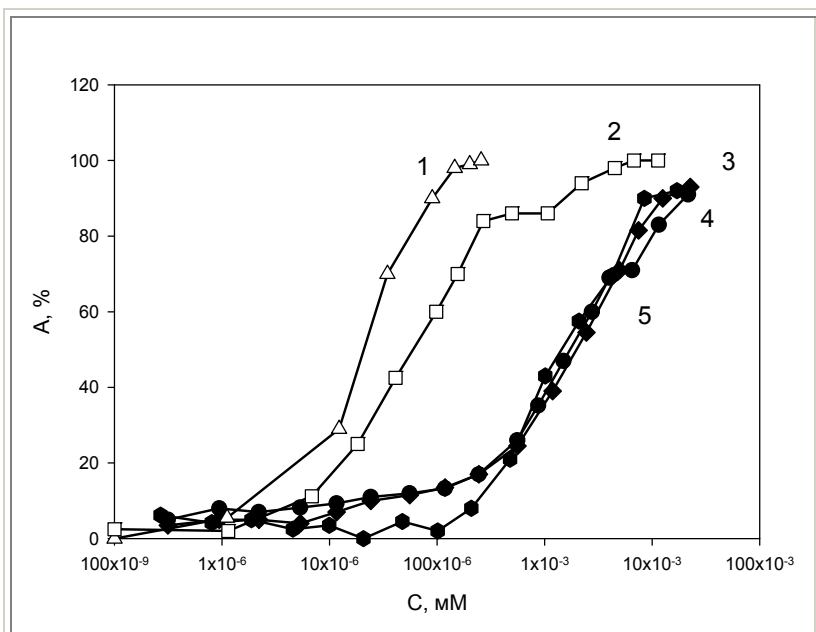


Рис.15. Зависимость амплитуды фотоинактивации грамицидина А в мембране из DPhPC от концентрации фотосенсибилизаторов. Кривая 1 – ZnPcS₄, кривая 2 – AlPcS₄, кривая 3 – ZnPcPum₈, кривая 4 – AlPcPum₈, кривая 5 – ZnPcChol₈. Буферный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ MES, 10 мМ Tris, pH 7.

На отрицательно заряженной мембране наблюдаются более значительные различия в фотодинамической активности катионных и анионных фотосенсибилизаторов, причем катионные фталоцианины действуют при гораздо меньших концентрациях (Рис.16, кривые 1, 2 и 3), чем анионные фталоцианины (Рис.16, кривые 4 и 5).

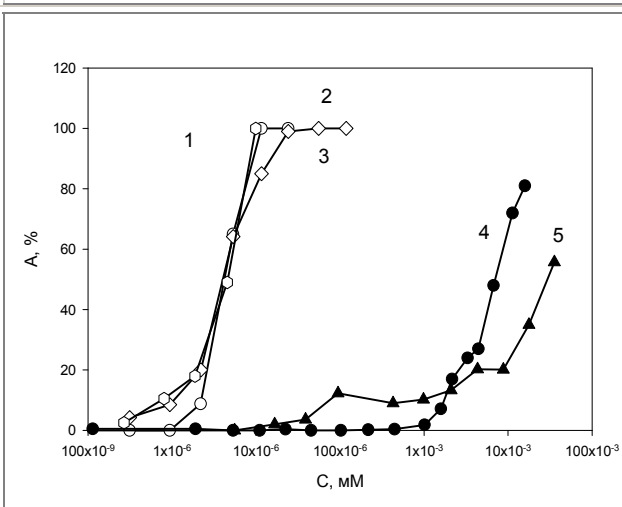


Рис.16. Зависимость амплитуды фотоинактивации грамицидина А в мембране из смеси DPhPC/DPhPG (70/30%) от концентрации фотосенсибилизаторов. Кривая 1 – ZnPcChol₈, кривая 2 – AlPcPum₈, кривая 3 – ZnPcPum₈, кривая 4 – AlPcS₄, кривая 5 – ZnPcS₄. Буферный раствор содержал 100 мМ KCl, 10 мМ MES, 10 мМ Tris, pH 7.

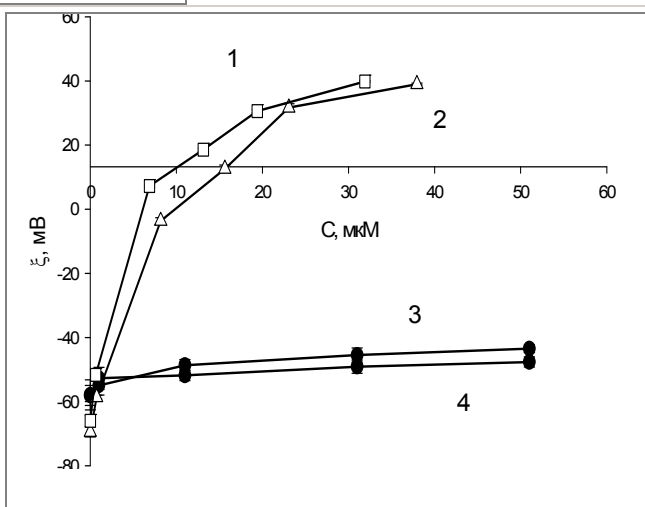


Рис.17. Зависимость ζ-потенциала липосом, приготовленных из липида *E.coli*, от концентрации фталоцианинов. Кривая 1 – AlPcPum₈, кривая 2 – ZnPcPum₈, кривая 3 – AlPcS₄, кривая 4 – ZnPcS₄. Буферный раствор содержал 10 мМ KCl, 5 мМ MES, 5 мМ Tris, pH 7.

На Рис.17 видно, что добавление AlPcPum₈ и ZnPcPum₈ вызывает значительно больший рост абсолютной величины электрокинетического потенциала в случае липосом,

образованных из липида *E.coli* (кривые 1 и 2), чем добавление тетрасульфированных алюмо- и цинкфталоцианинов (кривые 3 и 4). Следовательно, $AlPcPym_8$ и $ZnPcPym_8$ эффективнее связываются с липосомами из *E.coli*, чем $AlPcS_4$ и $ZnPcS_4$.

Эти данные позволяют нам заключить, что значительно большая эффективность октакатионных фталоцианинов по сравнению с анионными фталоцианинами в фотоинактивации грамицидиновых каналов в отрицательно заряженной мембране связана с различным сродством этих фотосенсибилизаторов к мембране.

Одним из основных результатов настоящей работы явилось доказательство корреляции между связыванием фталоцианинов с мембраной и эффективностью их фотодинамического воздействия. Эта корреляция, уже отмеченная ранее (Rokitskaya et al., 2000), находится в соответствии с локальным характером действия генерируемых сенсибилизатором активных форм кислорода. Другим значительным результатом работы стало выявление нового фактора, определяющего процесс связывания металлофталоцианинов с мембранами, а именно координационной связи центрального атома металла с фосфатной группой фосфолипида. Особенно важным этот вид взаимодействия становится в случае многозарядных гидрофильных фталоцианинов, которые нашли применение как при фотодинамической терапии рака (сульфированные фталоцианины), так и в качестве антибактериальных агентов (поликатионные фталоцианины). Ранее в литературе было показано, что для связывания некоторых ионов металлов с липидными мембранами необходимо наличие на их поверхности фосфатных групп (Ермаков и др., 1992). Однако, большое значение координационного взаимодействия с фосфатными группами фосфолипидов в случае металлофталоцианинов было установлено впервые. Из литературы было также известно, что связывание с мембранами заряженных молекул существенно зависит от поверхностного потенциала мембраны (McLaughlin, 1989). Однако не было данных об электростатическом взаимодействии фталоцианинов с мембранами, имеющими различный поверхностный заряд. В настоящей работе не только изучено такое взаимодействие, но и продемонстрирована его значительная роль в фотодинамическом действии фталоцианинов.

ВЫВОДЫ:

1. Фотодинамическая активность металлокомплексов фталоцианинов, несущих различные анионные и катионные заместители, изучена в модельной системе на примере фотодинамической инактивации грамицидиновых каналов в плоских бислойных мембранах различного липидного состава. Показано, что фталоцианины алюминия и цинка, имеющие от 4 до 8 положительно заряженных заместителей, так же как и сульфированные фталоцианины с такими же центральными атомами, проявляют высокую активность в данной системе.
2. Продемонстрировано ингибирующее влияние фторид-анионов на фотодинамическую активность как анионных, так и катионных фталоцианинов алюминия.
3. С помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии, а также измерения электрофоретической подвижности липосом исследовано связывание замещенных металлофталоцианинов с бислойными липидными мембранами. Полученные концентрационные зависимости связывания изученных фталоцианинов коррелируют с соответствующими зависимостями их активности, измеренной по фотоинактивации грамицидиновых каналов.
4. Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу того, что связывание замещенных металлофталоцианинов с фосфолипидной мембраной определяется в значительной степени координационным взаимодействием центрального атома металла с фосфатной группой липида.
5. Обнаружена существенная зависимость фотодинамической активности замещенных фталоцианинов цинка и алюминия от заряда липидной мембраны. Качественные различия в этой зависимости для фталоцианинов с катионными и анионными заместителями свидетельствуют о значительном вкладе электростатического взаимодействия в процесс связывания металлофталоцианинов с мембраной.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Pashkovskaya A.A., Sokolenko E.A., Sokolov V.S., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Photodynamic activity and binding of sulfonated metallophthalocyanines to phospholipid membranes: contribution of metal-phosphate coordination. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1768 (10), 2459-2465, 2007.
2. Pashkovskaya A.A., Maizlish V.E., Shaposhnikov G.P., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Role of electrostatics in the binding of charged metallophthalocyanines to neutral and charged phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1778 (2), 541-548, 2008.
3. Пашковская А.А., Перевощикова И.В., Майзлиш В.Е., Шапошников Г.П., Котова Е.А., Антоненко Ю.Н. Взаимодействие тетразамещенного катионного фталоцианина алюминия с искусственными и природными мембранами. *Биохимия*, 74 (9), 1252-1259, 2009.
4. Пашковская А.А., Котова Е.А., Дурантини Э.Н., Антоненко Ю.Н. Сравнение фотосенсибилизирующего действия отрицательно и положительно заряженных фталоцианинов в модельной мембранной системе. IV Съезд фотобиологов России, 2005, С. 155.
5. Pashkovskaya A.A., Sokolenko E.A., Sokolov V.S., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Metal-phosphate coordination determines the adsorption and photodynamic activity of sulfonated metallophthalocyanines on phospholipid membranes. XII Congress of the European Society for Photobiology, 2007, P. 150.
6. Sokolenko E.A., Pashkovskaya A.A., Kotova E.A., Sokolov V.S., Antonenko Y.N. Interaction of sulfonated metallophthalocyanines with bilayer lipid membranes: photochemical activity versus adsorption on the membrane surface. 51st Biophysical Society Annual Meeting, 2007, P.239a.
7. Пашковская А.А., Котова Е.А., Майзлиш В.Е., Антоненко Ю.Н. Фотосенсиблизированное повреждение ионных каналов грамицидина А в бислойной липидной мембране в присутствии катионных металлофталоцианинов: роль связывания фотосенсибилизатора с мембраной. V Съезд Российского фотобиологического общества, 2008, С. 173.
8. Pashkovskaya A., Kotova E., Strakhovskaya M., Kireev V., Kuznetsova N., Yuzhakova O., Antonenko Y. Impact of electrostatic interactions with membranes on photodynamic activity of cationic phthalocyanines. V International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, 2008, P. 508.