



Биолог. журн. Армении, 2 (66), 2014

АДСОРБЦИЯ КАТИОННЫХ Со-ПОРФИРИНОВ НА ЛИПОСОМЫ

В.Б. АРАКЕЛЯН¹, А.Л. ТОРОСЯН¹, Р.К. КАЗАРЯН²

¹Ереванский госуниверситет, кафедра молекулярной физики

²Кафедра органической химии, Ереванский государственный медицинский университет
atorosyan@ysu.am

В работе методом электрофореза исследована адсорбция катионных Со-порфиринов на липосомы, сформированные из фосфатидилсерина в водных растворах в разных концентрациях NaCl. Была измерена электрофоретическая подвижность липосом. Результаты описаны в рамках теории Штерна-Грэхема. Определены константы связывания ионов Na⁺ и Cl⁻, а также Со-порфирина с поверхностью липосом и плотности поверхностного заряда при адсорбции Na⁺, Cl⁻ и Со-порфирина.

Липосомы – порфирины – поверхностный потенциал – константа связывания

Աշխատանքում ուսումնասիրված է կատիոնային Со-պորֆիրինների ադսորբցիան լիպոսոմների վրա կազմված ֆոսֆատիդիլսերինից տարբեր կոնցենտրացիաներով NaCl-ի լուծույթներում: Չափվել է լիպոսոմների էլեկտրաֆորետիկ շարժունակությունը: Արդյունքները նկարագրված են Շտերն-Գրահամի տեսության շրջանակներում: Որոշված են լիպոսոմների մակերևույթի հետ Na⁺, Cl⁻ իոնների և Со-պորֆիրինների կապման հաստատունները, ինչպես նաև լիպոսոմի մակերևույթային լիցքի խտությունը Na⁺, Cl⁻ իոնների և Со-պորֆիրինների ադսորբցիայի դեպքում:

Լիպոսոմներ – պորֆիրիններ – մակերևույթային պոտենցիալ – կապման հաստատուն

In this paper the adsorption of cationic Co-porphyrins of the liposomes made of phosphatidylserine was studied in aqueous solutions at various concentrations of NaCl by the method of electrophoresis. Electrophoretic mobility of liposomes was measured. Results were described in the framework of the theory of Stern-Graham. The liposome-binding constants and surface charge density were determined for Na⁺ and Cl⁻ ions, as well as for Co-porphyrins.

Liposomes – porphyrins – surface potential – binding constant

В последнее время интенсивно исследуется адсорбция порфиринов на биослойных липидных мембранах, являющихся моделями клеточных мембран и представляющих в этом отношении значительный интерес. В настоящее время важное значение имеет создание новых лекарственных препаратов на основе порфиринов и изучение их биораспределения, устойчивости, связывания и токсикологии [4, 5, 10, 13, 16, 17]. Исследования с целью нахождения противоопухолевой активности порфиринов, проведенные в лаборатории химиотерапии Института им. Герцена (Москва), показали, что при использовании Zn- и Со-содержащих производных оксиэтил порфирина (ТОЕРУР4) 80% животных, пораженных лейкемией, выживают. Эффективность применения порфиринов в клинико-фармакологическом аспекте можно сравнить с использованием липосом, то есть рассматривать спосо-

бы доставки лекарственного вещества и утилизации его в организме. Во многих работах исследовано взаимодействие разных препаратов с липосомами. В работе [11] оценено связывание заряженных препаратов с липосомами из фосфатидилхолина путем измерения дзета-потенциала в присутствии разных концентраций лекарств. В работе [9] показано, что количество адсорбированных катионов на отрицательно заряженную поверхность липосом и скорость транспорта ионов через отрицательную поверхность липосом линейно зависят от плотности поверхностного заряда. Эти результаты показывают, что электростатическое взаимодействие адсорбатов с поверхностью липосом является определяющим фактором и для адсорбции, и для транспортных процессов заряженных частиц.

Целью данной работы было исследование взаимодействия Со-содержащих производных оксиэтил порфирина (ТОЕРуР4) с большими однослойными везикулами, приготовленными из сериновых фосфолипидов, которые являются наиболее распространенными отрицательно заряженными фосфолипидами в эукариотных мембранах [8]. В работе была исследована подвижность липосом из фосфатидилсерина в растворе NaCl и проанализировано влияние концентрации электролита на коллоидную стабильность этих липосом в присутствии и в отсутствие катионных порфиринов СоТОЕтРуР4.

Материал и методика. Фосфатидилсерин был приобретен из Avanti Polar Lipids. Со-мезо-тетра-[4-N-(2'-оксиэтил) пиридил] порфирины (СоТОЕтРуР4) были синтезированы в отделе фармакологической химии в ЕГМУ [16]. Большие однослойные везикулы, формируемые из фосфатидилсерина, были получены с помощью ультразвука [14].

Используя метод динамического светорассеяния в сочетании с электрофоретическими методами, были оценены такие характеристики липосом, как подвижность и поверхностный заряд [3], а также средний размер липосом. Электрофоретическая подвижность липосом измерена на установке *ZetaPALS, Zeta Potential Analyzer* (Brookhaven Instruments Corporation, USA). Значения дзета-потенциала были рассчитаны непосредственно из уравнения Гельмгольца-Смолуховского:

$$\zeta = \eta u / \epsilon \epsilon_0,$$

где u – электрофоретическая подвижность, ϵ and η – диэлектрическая проницаемость и динамическая вязкость среды соответственно, а ϵ_0 – диэлектрическая проницаемость вакуума.

Для измерения использовались кварцевые ячейки с площадью 1 см^2 . Все эксперименты проводились в трехкратной повторности при температуре 25°C . Для измерения были выбраны 5 разных концентраций NaCl: 10, 15, 25, 40 и 70 мМ с рН 7 в буфере 1 мМ Трис ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$). Для приготовления липосом был выбран 100 мМ Трис буфер с рН 7. Конечная концентрация их в буфере составляла 1 мг/мл. Для исследования воздействия порфирина на дзета-потенциал липосом в маточный раствор последних добавлялся порфирин и инкубировался в течение 1 ч (в концентрации 10^{-3} М) при комнатной температуре (25°C). После добавления липосом+порфирин (10 мкл) в раствор соли (1,5 мл) концентрация порфирина составляла 6×10^{-6} М.

Измерения размера липосом проводились в тех же ячейках, что и измерения дзета-потенциала. Диаметр липосом составлял 300-400 нм.

Результаты и обсуждение. Если поверхность частицы отрицательно заряжена при некоторых условиях раствора, изменение условий раствора может привести к положительному заряду. Знак подвижности, таким образом, является очень важной величиной.

Для количественного описания связывания ионов с липосомами можно использовать теорию Штерна-Грэхема [7,12,18]. В основе этой теории лежит изотерма адсорбции Ленгмюра-Штерна

$$n = \frac{K_I N C_0}{1 + K_I C_0} \quad (1)$$

и уравнение Грэхема

$$\sigma = \left\{ 2\varepsilon_0 \varepsilon RT \sum_i C_i (e^{-z_i x} - 1) \right\}^{1/2}, \quad (2)$$

где n – число адсорбированных ионов на единицу поверхности; K_I – истинная константа связывания; N – число связывающихся мест на единицу поверхности; C_0 – концентрация адсорбирующих ионов у границы раздела мембрана-раствор; σ – плотность поверхностного заряда мембраны; C_i и z_i соответственно концентрация и валентность (с учетом знака) i -го иона в растворе; $x \equiv F\psi_0 / RT$, ψ_0 – поверхностный электростатический потенциал; R , T и F имеют общепринятый смысл.

Для адсорбции ионов Na^+ и Cl^- на липосомы уравнение (2) можно написать в следующем виде:

$$\sigma_0 + \frac{\sigma_{\text{Na}} K_{\text{Na}} C e^{-\psi_0}}{1 + K_{\text{Na}} C e^{-\psi_0}} - \frac{\sigma_{\text{Cl}} K_{\text{Cl}} C e^{\psi_0}}{1 + K_{\text{Cl}} C e^{\psi_0}} = 2(2\varepsilon_0 R T C)^{1/2} \text{sh} \frac{\psi_0}{2}, \quad (3)$$

где σ_0 – плотность заряда без учета адсорбции ионов, σ_{Na} и σ_{Cl} соответственно плотности поверхностного заряда мембраны при адсорбции ионов Na^+ и Cl^- , K_{Na} и K_{Cl} – константы связывания ионов Na^+ и Cl^- с мембраной, а C – концентрация электролита (NaCl).

При малых потенциалах из уравнения (3) можно получить следующее выражение:

$$\psi_0 = 25 \frac{\sigma_0 (1 + K_{\text{Na}} C)(1 + K_{\text{Cl}} C) + K_{\text{Na}} K_{\text{Cl}} C^2 (\sigma_{\text{Na}} - \sigma_{\text{Cl}}) + \sigma_{\text{Na}} K_{\text{Na}} C - \sigma_{\text{Cl}} K_{\text{Cl}} C}{(2\varepsilon_0 R T C)^{1/2} (1 + K_{\text{Na}} C)(1 + K_{\text{Cl}} C) - \sigma_0 C (K_{\text{Cl}} - K_{\text{Na}}) + \sigma_{\text{Na}} K_{\text{Na}} C + \sigma_{\text{Cl}} K_{\text{Cl}} C}, \quad (4)$$

где ψ_0 измеряется в милливольтгах.

В присутствии порфиринов в растворе с липосомами в уравнении (4) также нужно учитывать адсорбцию порфиринов на липосомы. В этом случае оно (4) запишется в следующем виде:

$$\psi_0 = 25 \frac{(\sigma_0 + \frac{\sigma_p K_p C_p}{1 + K_p C_p})(1 + K_{\text{Na}} C)(1 + K_{\text{Cl}} C) + K_{\text{Na}} K_{\text{Cl}} C^2 (\sigma_{\text{Na}} - \sigma_{\text{Cl}}) + \sigma_{\text{Na}} K_{\text{Na}} C - \sigma_{\text{Cl}} K_{\text{Cl}} C}{(2\varepsilon_0 R T C)^{1/2} (1 + K_{\text{Na}} C)(1 + K_{\text{Cl}} C) - (\sigma_0 + \frac{\sigma_p K_p C_p}{1 + K_p C_p}) C (K_{\text{Cl}} - K_{\text{Na}}) + \sigma_{\text{Na}} K_{\text{Na}} C + \sigma_{\text{Cl}} K_{\text{Cl}} C}, \quad (5)$$

где σ_p – плотность поверхностного заряда мембраны при адсорбции порфирина, K_p – константа связывания порфирина с мембраной, σ_0 – концентрация порфирина.

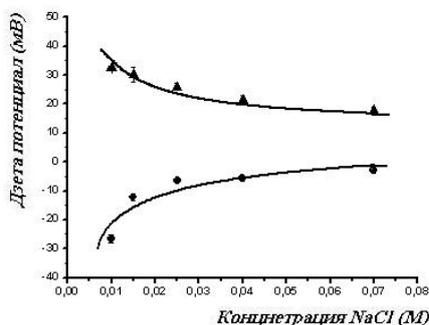


Рис. 1. Зависимость дзета-потенциала липосом из фосфатидилсерина от концентрации соли в отсутствие (●) и в присутствии CoTOEtRup4 порфирина (▲) в концентрации 6×10^{-6} М.

Точки – экспериментальные данные, сплошные линии – теоретические кривые, проведенные по формуле (4,5) методом наименьших квадратов.

На рис. 1 представлена зависимость дзета-потенциала липосом из фосфатидилсерина от концентрации соли в присутствии и в отсутствие катионных порфиринов СоТОЕтРyP4.

При фитировании использовано значение $\sigma_p = -6,42 \times 10^{-3}$ Кл/м² [15]. Были получены следующие значения плотностей поверхностного заряда мембраны при адсорбции ионов Na⁺ и Cl⁻: $\sigma_{Na} = 0,197$ Кл/м² и $\sigma_{Cl} = 8,18 \times 10^{-4}$ Кл/м², а для констант связывания ионов Na⁺ и Cl⁻ с мембраной соответственно $K_{Na} = 0,403$ М⁻¹ М⁻¹ и $K_{Cl} = 0,13$ М⁻¹. Эти данные хорошо согласуются с литературными [2, 6, 15]. Подставив полученные данные в уравнение (5), было получено значение плотности поверхностного заряда мембраны при адсорбции Со-порфирина: $\sigma_p = 0,23$ Кл/м². Для значения константы связывания порфирина с мембраной было выбрано значение $K_p = 1,2 \times 10^{-4}$ М⁻¹, что хорошо согласуется с литературными данными [4, 13, 17].

Как видно из рис. 1, дзета потенциал сериновых липосом в отсутствие порфирин отрицательный, что и следовало ожидать, а в присутствии катионных Со-порфиринов знак дзета потенциала меняется, что свидетельствует о том, что Со-порфирины хорошо адсорбируются на поверхности липосом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Татулян С.А.* Адсорбция ионов на поверхности липосом из фосфатидилхолина. Биолог. журн. Армении, 40, 3, 187-193, 1987.
2. *Татулян С.А.* Электрофоретическое определение адсорбции Ca²⁺ на мембранах из цвиттерионного липида. Структурные дефекты как ион связывающие места. Биологические мембраны, 2, 4, 1985.
3. *Финогенова О.А.* Электрические потенциалы на границах липидных мембран при адсорбции одновалентных катионов и синтетических поликатионов. Автореферат, М., 2009.
4. *Bardos-Nagy I., Galantai R., Fidy J.* Effect of trehalose in low concentration on the binding and transport of porphyrins in liposome-human serum albumin system. Biochimica et Biophysica Acta, 1512, 125-134, 2001.
5. *Gasparyan G., Hovhannisyann G., Ghazaryan R.* In Vitro Testing of Cyto- and Genotoxicity of New Porphyrin Water-Soluble Metal Derivatives. International Journal of Toxicology, 26, 1-6, 2007.
6. *Knecht V., Klasczyk B.* Specific binding of chloride ions to lipid vesicles and implications at molecular scale. Biophysical Journal, 104, 818-824, 2013.
7. *Lau A., McLaughlin A., McLaughlin S.* The adsorption of divalent cations to phosphatidylglycerol bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta., 645, 279-292, 1981.
8. *Leventis P.A., Grinstein S.* The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. The Annual Review of Biophysics, 39, 407-27, 2010.
9. *Liu Y., Yan E.C.Y., Eisenthal K.B.* Effects of bilayer surface charge density on molecular adsorption and transport across liposome bilayers. Biophys. J., 80, 1004-1012, 2001.
10. *Makky A., Michel J.P., Maillard Ph., Rosilio V.* Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. Biochimica et Biophysica Acta, 1808, 656-666, 2011.
11. *Matosetall C.* Zeta-Potential Measurements as a Tool To Quantify the Effect of Charged Drugs on the Surface Potential of Egg Phosphatidylcholine Liposomes. Langmuir, 20, 2, 369-377, 2004.
12. *McLaughlin A., Grathwohl C., McLaughlin S.* The adsorption of divalent cations to phosphatidylcholine bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta, 513, 338-357, 1978.
13. *Neto D.S., Hawe A., Tabak M.* Interaction of meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin in its free base and as a Zn(II) derivative with large unilamellar phospholipid vesicles. Eur. Biophys. J., 42, 267-279, 2013.

14. *Schroedera A., Kost J., Barenholz Y.* Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 162, 1-16, 2009.
15. *Tatulian S.A.* Binding of alkaline-earth metal cations and some anions to phosphatidylcholine liposomes. *Eur. J. Biochem*, 170, 413-420, 1987.
16. *Tovmasyan A.G., Babayan N.S., Sahakyan L.A. et al.* Synthesis and in vitro anticancer activity of water-soluble cationic pyridyl porphyrins and their metallocomplexes. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 12, 1100-1110, 2008.
17. *Veres D.S.* Binding ability of porphyrins in liposomes determined by optical spectroscopic methods. Theses of the doctoral dissertation. Budapest, 2012.
18. *Westman J., Eriksson L.* The interaction of various lanthanide ions and some anions with phosphatidylcholine vesicle membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 557, 62-78, 1979.

Поступила 09.01.2014