

УДК 541.64:539.2:532.72

СВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ СОЕДИНЕНИЙ И ВЛИЯНИЕМ ПЛЮРОНИКА L61 НА ИХ ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ¹

© 2007 г. В. С. Бугрин, Н. С. Мелик-Нубаров

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.

Химический факультет

119992 Москва, Ленинские горы

Поступила в редакцию 22.11.2006 г.

Принята в печать 19.02.2007 г.

Ранее было показано, что встраивание плюроников в липидные мембранны способствует увеличению их проницаемости по отношению к различным лекарствам. Исследована взаимосвязь между структурой переносимого через мембрану соединения и ускорением его мембранного транспорта, вызываемого плюроником. Степень ускорения, определяемая как соотношение наблюдаемых констант скорости транспорта в присутствии и в отсутствие плюроника k/k_0 , была определена для 21 слабой кислоты и основания. Построены многопараметрические корреляции полученных данных с различными структурными параметрами переносимых через мембрану веществ. Проанализировано 12 структурных параметров транспортируемых соединений и показано, что наилучшая корреляция k/k_0 наблюдалась с линейной комбинацией трех параметров: мак-говановского объема соединения V , его протонодонорной способности A и проекции дипольного момента молекулы на нормаль к поверхности мембранны μ_z . $\ln(k/k_0) = -0.87 - 0.44\mu_z + 0.31V + 0.28A$, $R = 0.90$. Это означает, что плюроник в наибольшей степени ускоряет транспорт крупных соединений, содержащих протонодонорные группы, и тех веществ, которые встраиваются в липидный бислой таким образом, что вектор их дипольного момента сонаправлен с дипольным потенциалом мембранны.

ВВЕДЕНИЕ

Триблок-сополимеры этиленоксида (ЭО) и пропиленоксида (ПО), известные под торговой маркой Pluronics® (плюроники) или Poloxamers® (полоксамеры) [1], представляют собой семейство амфифильных сополимеров, широко востребованных в технологии добычи нефти [2], эмульсионной полимеризации [3], создании моющих средств [4] и т.д. В конце 1980-х годов было обнаружено, что плюроники обладают относительно низкой токсичностью. Это открыло широкие перспективы использования этих полимеров в качестве биосовместимых ПАВ [5]. Дальнейшие исследования поведения плюроников в биологическом окружении показали, что они способны усиливать иммунный ответ [6], влиять на

метаболизм холестерина [7], ингибиовать белковые насосы, обусловливающие множественную лекарственную устойчивость раковых клеток [8, 9].

Физиологические эффекты плюроников в основном определяются их взаимодействием с липидными компонентами биологических мембран [9]. Поэтому в настоящей работе было исследовано взаимодействие сополимеров этого класса с модельными липидными структурами. Ранее было показано, что встраивание плюроников в липидные мембранны вызывает уменьшение микропривязки бислоя [10], увеличивает скорость трансбислойной миграции липидов [11] и ускоряет мембранный транспорт противоопухолевого антибиотика доксорубицина [11–13]. Оказалось, что эффект полимеров на перенос лекарств через биологические мембранны зависит как от структуры самого полимера [11, 13], так и от липидного состава мембранны [14]. Наиболее эффективностью обладают гидрофобные плюроники, содержащие около 10% ЭО-звеньев [11]. Эти факты

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 06-03-32403) и гранта Государственной поддержки ведущих научных школ (НШ 5899.2006.3).

E-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru (Мелик-Нубаров Николай Сергеевич).

хорошо согласуются с ранее опубликованными данными о взаимосвязи между составом плюроников и их способностью усиливать противоопухолевую активность лекарств по отношению к клеткам, обладающим множественной лекарственной устойчивостью [8, 9]. Однако до настоящего времени совершенно не исследованным остается вопрос о том, в какой степени химическая структура переносимого через мембрану вещества определяет эффект полимера на скорость его проникновения. В настоящей работе впервые предпринята попытка исследовать количественные корреляции между структурными параметрами переносимых через мембрану веществ и степенью воздействия плюроника на этот процесс. В качестве характерного представителя полимеров такого типа мы использовали плюроник L61, который характеризуется оптимальным соотношением между токсичностью и степенью воздействия на накопление лекарств в раковых клетках [8, 9].

Для решения поставленной задачи был использован подход, основанный на построении корреляций между вызываемым плюроником ускорением транспорта низкомолекулярных соединений через липидную мембрану и структурными параметрами переносимых веществ. В качестве таких параметров мы рассмотрели объем, гидрофобность, поляризумость, индекс мольной рефракции соединений, их способность к образованию водородных связей и предполагаемую ориентацию во внутримембранном электрическом поле. Все параметры рассчитаны исходя из структуры веществ.

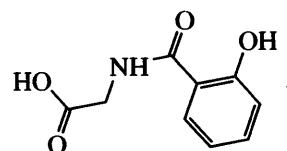
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали плюроник L61 производства "BASF Corp." (США). По данным ГПХ, для этого сополимера $M_n = 1655$ и $M_w = 1890$ (индекс полидисперсности $M_w/M_n = 1.14$). Средний состав полимера, определенный методом ИК-спектроскопии, соответствовал 10 мас. % звеньев ЭО, а его структура отвечала заявляемой фирмой-производителем ($\text{EO}_2\text{PO}_{30}\text{EO}_2$). В работе использовали хроматографически чистый яичный леци-

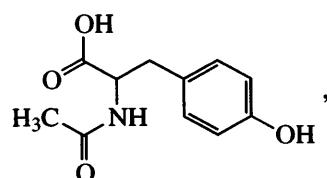
тин, пиранин производства "Sigma-Aldrich Co." (США).

Соединения, мембранный транспорт которых был исследован в этой работе, также были приобретены у "Sigma-Aldrich Co." (США):

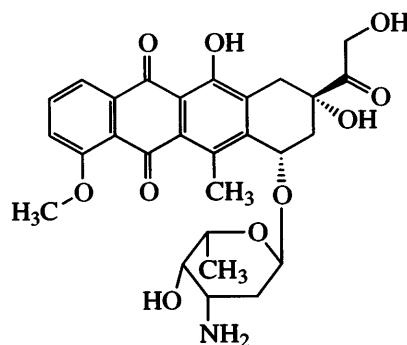
гидроксигиппуровая кислота (HHA)



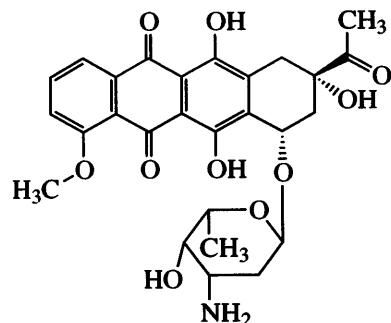
N-ацетил-L-тироzin (Ac-Tyr)



доксорубицина гидрохлорид (DOX)

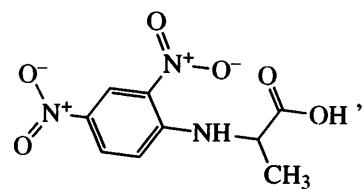
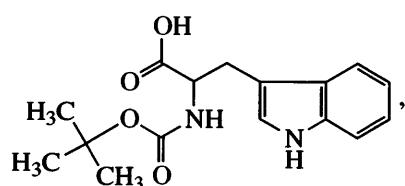


и дауномицин гидрохлорид (DNM)

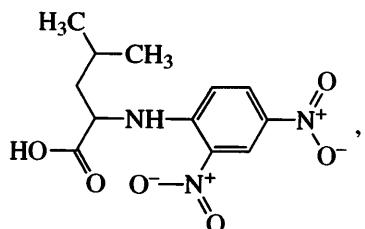
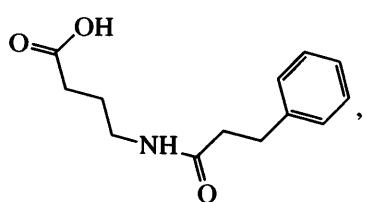


Некоторые оксикислоты и N-замещенные производные аминокислот были производства "Reanal" (Венгрия):

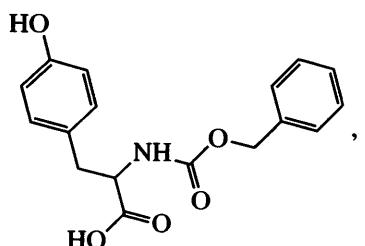
N-*трет*-бутил-оксикарбонил-L-триптофан (Boc-Trp) **N-динитрофенил-L-аланин (DNP-Ala)**



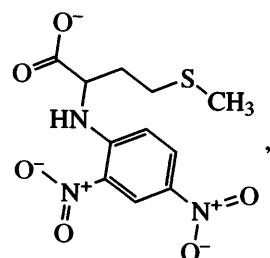
N-карбобензокси-γ-аминомасляная кислота (Cbz-GABA) **N-динитрофенил-L-лейцин (DNP-Leu)**



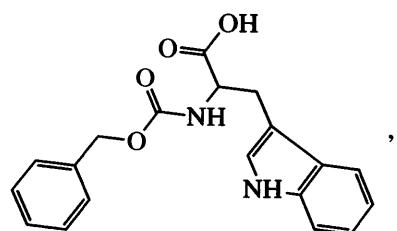
N-карбобензокси-D,L-тирозин (Cbz-Tyr)



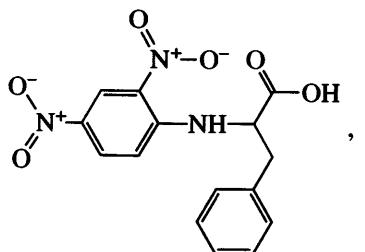
N-динитрофенил-L-метионин (DNP-Met)



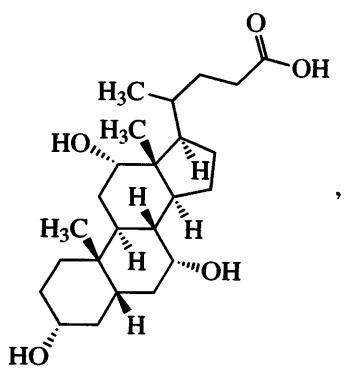
N-карбобензокси-L-триптофан (Cbz-Trp)



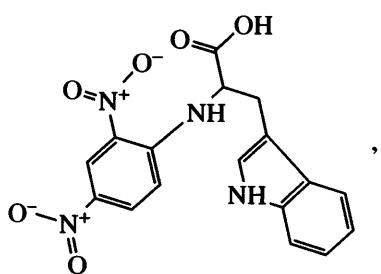
N-динитрофенил-L-фенилаланин (DNP-Phe)

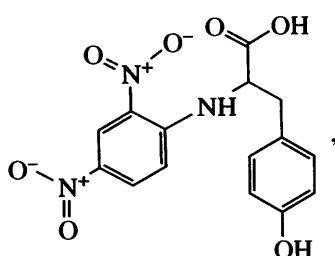
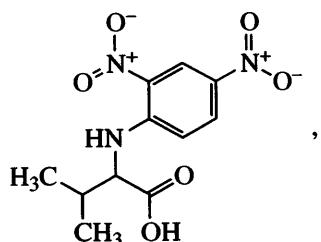
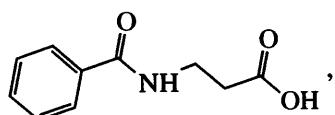
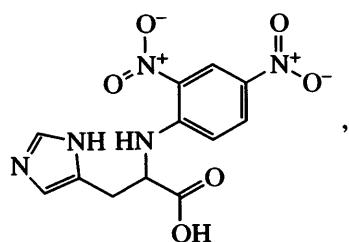
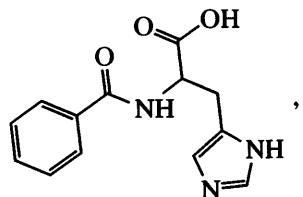
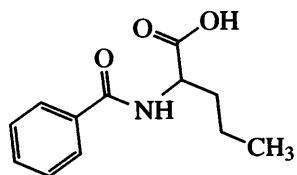


холевая кислота (ChA)

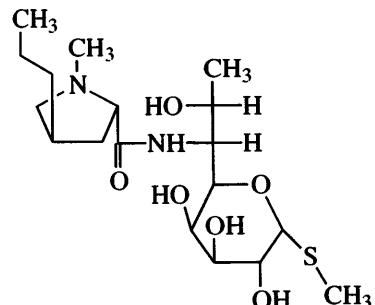


N-динитрофенил-L-триптофан (DNP-L-Trp)



N-динитрофенил-L-тироzin (DNP-Tyr)**N-динитрофенил-L-валин (DNP-Val)****N-бензоил-β-аланин (Benz-β-Ala)****N-динитрофенил-L-гистидин (DNP-His)****N-бензоил-L-гистидин (Benz-His)****N-бензоил-L-норвалин (Benz-Norval)**

Антибиотик линкомицин (Linco) – производства “Верафарм” (Россия)



Растворители и компоненты буферных растворов квалификации ч.д.а. применяли без дополнительной очистки.

Получение pH-градиентных липосом. Кинетику мембранных транспорта флуоресцирующих соединений, DOX и DNM изучали с помощью липосом с заранее сформированным градиентом pH между внутренней средой и внешним раствором. Моноламellarные липосомы размером 70–100 нм получали по ранее описанной методике [15] и использовали в течение 10 ч после получения.

Изучение кинетики транспорта антрациклических антибиотиков в pH-градиентные липосомы (рис. 1а). Растворы DOX или DNM смешивали с предварительно термостатированной суспензией pH-градиентных липосом (конечная концентрация антибиотиков 5×10^{-5} моль/л) и изменение флуоресценции во времени регистрировали при $\lambda_{\text{возб}} = 480$ нм и $\lambda_{\text{фл}} = 555$ нм.

Получение липосом, заполненных флуоресцентным pH-индикатором пиранином (рис. 1в). Раствор 20 мг яичного лецитина в 0.2 мл этанола тщательно упаривали на роторном испарителе “Heidolph” (модель “Rotavapor”, 120 мин⁻¹, 40°C). Липидную пленку суспендировали в 1 мл 5×10^{-4} моль/л раствора пиранина в 0.1 М буферном растворе HEPES (гидроксиэтил-пипиразин-этансульфокислота)/KOH, pH 8.2. Липидную суспензию подвергали трем циклам замораживания–оттаивания ($-196^{\circ}\text{C}/+40^{\circ}\text{C}$), после чего обрабатывали ультразвуком в токе азота с помощью ультразвукового генератора “Cole Parmer” (модель 4700, 200 с, 22 кГц, 30 Вт), охлаждая образец в ледяной воде. Полученные липосомы отделяли от титановой пыли центрифугированием (микроцентрифуга “Beckman”, 10 мин, 9400g). Согласно данным динамического светорассеяния (спектро-

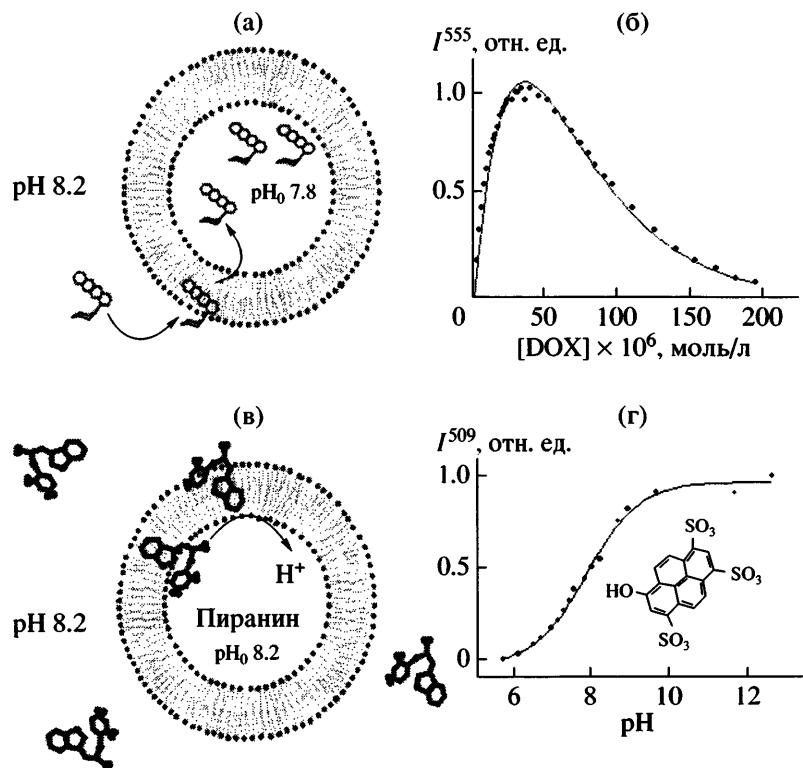


Рис. 1. Схема модельных систем, использованных для изучения транспорта антрациклических антибиотиков (а) и нефлуоресцирующих соединений (в) в липосомы, а также зависимости флуоресценции доксорубицина от его концентрации (б) и pH-индикатора пиранина от pH (г). На рис. (г) показана формула пиранина.

метр фирмы “Malvern”, модель Autosizer 2c), полученные липосомы имели средний гидродинамический диаметр 70–100 нм. Липосомы отделяли от свободного пиранина с помощью ГПХ на колонке (1.1 × 18 см) с полисахаридным носителем Sepharose CL-4B (“Amersham”), уравновешенной буфером 0.1 М HEPES/KOH, pH 8.2.

Кинетика проникновения слабых кислот и оснований через мембранные липосомы, заполненные раствором пиранина (рис. 1в). Кинетику изучали согласно модифицированному методу, ранее предложенному Kamp и Hamilton [16]. 1 мл 10⁻⁴ моль/л раствора слабой кислоты или 2 × 10⁻⁵ моль/л раствор Linco терmostатировали во флуоресцентной кювете. После установления стабильной температуры образца в раствор добавляли 0.2 мл суспензии липосом, заполненных пиранином (5 мг/мл), и регистрировали изменения флуоресценции ($\lambda_{возб} = 455$ нм, $\lambda_{фл} = 509$ нм) с помощью спектрофлуориметра “Hitachi” (модель 650-10S). Проникновение слабых кислот и оснований в липосомы по механизму распределения–диффузии приводило к изменению pH внутренней среды везикул, вызы-

вая изменения флуоресценции пиранина. Чтобы определить абсолютное количество слабой кислоты, проникшей в липосомы, концентрацию протонов внутри везикул рассчитывали из текущих значений интенсивности флуоресценции по экспериментальной pH-зависимости флуоресценции пиранина. Для ее получения использовали нагруженные пиранином липосомы, к которым добавляли 2 × 10⁻⁷ моль/л грамицидина А и 5 × 10⁻⁶ моль/л валиномицина, обеспечивающие свободное проникновение протонов через липосомальную мембрану. Затем внешний раствор титровали кислотой или щелочью и регистрировали флуоресценцию пиранина, включенного внутрь везикул. Полученную зависимость (рис. 1г) аппроксимировали функцией Больцмана (1) и далее использовали для расчета значения pH внутри липосом (pH_{in}):

$$I = \left(1 + \exp\left(\frac{pH_{in} - 7.91}{0.67}\right) \right)^{-1} \quad (1)$$

Количество кислоты $[A]_0$, проникшей во внутреннюю полость везикул, рассчитывали из значений pH_{in} , учитывая буферную емкость раствора внутри липосом, согласно уравнению:

$$\begin{aligned} [A]_0 \approx & -[H_0 - T_0 K_1 [H_{in}^+]] - \\ & -(H_0 K_1 K_2 + K_1 + T_0 K_1 K_2) [H_{in}^+]^2 \times \\ & \times \frac{1 + K_1 [H_{in}^+]}{1 + K_1 [H_{in}^+] + K_1 K_2 [H_{in}^+]}, \end{aligned} \quad (2)$$

где $[H_{in}^+]$ – концентрация протонов внутри липосом, определяемая из значений флуоресценции по уравнению (1), H_0 и T_0 – концентрации НЕПЕС и КОН, а $K_1 = 3.39 \times 10^{-9}$ и $K_2 = 2.69 \times 10^{-4}$ моль/л – константы кислотности НЕПЕС [17].

Расчет молекулярных дескрипторов. Мак-говановский объем молекул V , коэффициенты распределения между газовой фазой и гексадеканом L , между водой и октанолом $\lg P_{\text{октанол/вода}}$, поляризумость S , избыточную мольную рефракцию E , Н-кислотность веществ A и Н-основность B рассчитывали с помощью демонстрационной версии программы ADME Boxes[©], версия 2.0 (“Sirius Analytical Instruments”). Алгоритм данной программы основан на суммировании вкладов отдельных функциональных групп, входящих в молекулу [18]. Площадь гидрофобной поверхности молекул рассчитывали с помощью программы HyperChem[©] 7.0 (“Hypercube, Inc.”), проводя поиск наиболее энергетически выгодных конформаций молекулы в вакууме с помощью встроенного программного модуля “Conformational search”, используя алгоритмы молекулярной механики. При этом разрешалось вращение вокруг всех одинарных связей. Далее площадь гидрофобной поверхности определяли, удаляя из структуры полярные гетероатомы и вычисляя площадь оставшихся фрагментов с помощью модуля “QSAR properties”.

Дипольные моменты всех конформеров рассчитывали с помощью полуэмпирического метода РМЗ, а затем определяли их проекции на нормаль к поверхности мембранны. Для этого молекулу ориентировали в мемbrane согласно следующим правилам: ионизуемые группы располагаются снаружи мембранны; обеспечивается максимальное погружение гидрофобных фраг-

ментов в бислой; неионизуемые полярные группы, такие как С=О и NH, локализуются в водном окружении; фенильные кольца стремятся расположиться вблизи поверхности раздела паралельно плоскости мембранны.

Проекцию дипольного момента на нормаль к поверхности мембранны рассчитывали как произведение модуля дипольного момента на синус угла между вектором дипольного момента и поверхностью мембранны. Положительный знак приписывали вектору, направленному своим положительным концом из липидного бислоя наружу, а отрицательный знак – направленному внутрь мембранны. Эти расчеты проводили для всех возможных $i = 1\dots n$ энергетически значимых конформаций и из полученных значений μ_{zi} рассчитывали средневзвешенное значение μ_z как

$$\langle \mu_z \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \mu_{zi} \exp\left(-\frac{E_i}{RT}\right)}{\sum_{i=1}^n \exp\left(-\frac{E_i}{RT}\right)} \quad (3)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для выявления того, какие структурные особенности соединений существенны для ускорения их мембранных транспорта в присутствии плюроника, мы исследовали действие плюроника на проникновение 21 соединения. Эти вещества различались по своей гидрофобности, размеру и наличию протонодонорных и протоноакцепторных групп. Все исследованные соединения были слабыми кислотами и основаниями. Известно, что в отсутствие специфических каналов или переносчиков проникновение низкомолекулярного вещества через липидный бислой возможно лишь в незаряженной форме [19, 20]. Транспорт слабых кислот и оснований через мембранны по механизму распределения–диффузии включает в себя быструю стадию распределения вещества между водной фазой и бислой, скорость лимитирующую стадию переноса соединения в незаряженной форме с внешнего монослоя мембранны на внутренний и быстрое установление равновесия между внутренним монослоем и водной фазой.

Мембранный транспорт слабых кислот и оснований исследовали с использованием малых моноламеллярных липосом как модельных биологи-

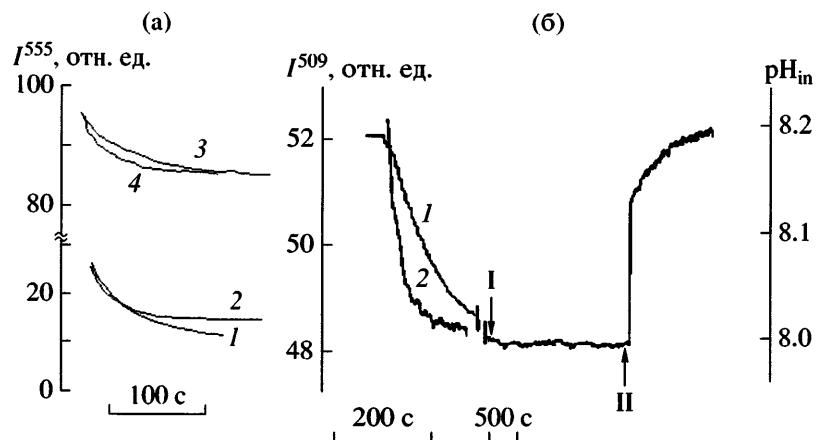


Рис. 2. Кинетика транспорта DOX (1, 2) и DNM (3, 4) (а) в липосомы из яичного лецитина в отсутствие (1, 3) и в присутствии $4 \times 10^{-3}\%$ плюроника L61 (2, 4). Кинетика изменений флуоресценции (б) при добавлении холевой кислоты к липосомам в отсутствие (1) и в присутствии $2 \times 10^{-3}\%$ плюроника L61 (2). а: Липосомы (1 мг/мл) были заполнены 0.53 моль/л Трис, 0.05 моль/л НЕРЕС буфером с pH 7.76. Внешний раствор содержал 20 ммоль/л Трис, 2 ммоль/л НЕРЕС, 0.64 моль/л сахараозы, pH 8.2, $T = 21^\circ\text{C}$. б: Липосомы (1 мг/мл) были заполнены 0.1 моль/л НЕРЕС/КОН буфером, содержащим 0.5 ммоль/л пиразина, pH 8.2, $T = 14^\circ\text{C}$. Правая ось ординат – значение pH внутри липосом. Стрелками показано добавление к образцу $3 \times 10^{-3}\%$ плюроника L61 (I) и смеси 200 нмоль/л грамицидина A и 5 мкмоль/л валиномицина (II).

ческих мембран. За проникновением соединений через липидный бислой следили с помощью флуоресцентных методов. При этом транспорт флуорофоров и нефлуоресцирующих соединений исследовали с помощью различных подходов.

Влияние плюроника на проницаемость липидных мембран подробно изучали ранее в нашей лаборатории на примере противоопухолевого антибиотика DOX [11–14]. В настоящей работе мы сравнили действие плюроника L61 на мембранный транспорт двух антрациклических антибиотиков DOX и DNM, обладающих флуоресценцией в красной области спектра. Накопление антибиотиков в липосомах вызывалось градиентом pH между внешним раствором и содержимым липидных везикул (рис. 1а). Скорость проникновения антибиотиков в липидные везикулы определяли по тушению их флуоресценции во внутренней полости липосом за счет эффекта “внутреннего фильтра” (рис. 1б) [15]. Кинетика транспорта DOX и DNM (рис. 2а, кривые 1 и 3) подчиняется закону первого порядка, и константа скорости k может быть рассчитана из экспериментальных кривых при аппроксимации моноэкспоненциальным уравнением

$$I = I_\infty + \Delta I \exp(-kt), \quad (4)$$

где I_∞ соответствует стационарному уровню, ΔI – амплитуда тушения флуоресценции и k – константа скорости первого порядка.

Добавление плюроника приводило к увеличению скорости проникновения обоих антибиотиков (рис. 2а, кривые 2 и 4). Видно, что плюроник ускорял проникновение DOX в большей степени, чем DNM.

За транспортом слабых кислот и оснований, не обладающих флуоресценцией в видимой области спектра, следили по изменению концентрации протонов внутри липосом, pH_{in} . Для измерения pH_{in} везикулы заполняли раствором флуоресцентного индикатора пиразина, локализующегося в водной полости везикул [16]. Встраивание слабой кислоты или основания в мембрану и ее перенос на внутренний монослой приводят к сдвигу pH внутри липосомы (рис. 1в) и, как следствие, к изменению флуоресценции индикатора (рис. 1г).

Действительно, добавление к таким липосомам слабых кислот, способных встраиваться в липидный бислой, вызывало уменьшение флуоресценции пиразина. На рис. 2б показана кинетическая кривая этого процесса на примере холевой кислоты. Введение в суспензию липосом слабого основания Linco, напротив, приводило к увеличе-

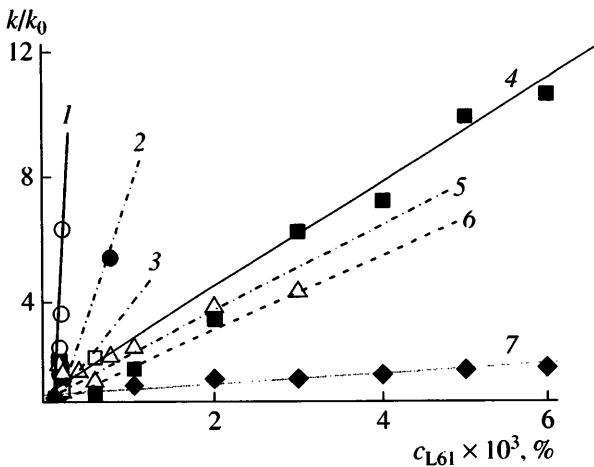


Рис. 3. Концентрационная зависимость вызываемого плюроником L61 ускорения трансмембранных переноса DNP-Tyr (1), DNP-Met (2), ChA (3), DNP-L-Trp (4), Cbz-Trp (5), DNP-Phe (6) и DOX (7). Концентрация липосом 1 мг/мл, $T = 21^\circ\text{C}$.

нию флуоресценции (данные не показаны). Если бы плюроник образовывал в мембране поры, проницаемые для протонов или компонентов буферного раствора, то в его присутствии происходило бы выравнивание градиента рН. Однако оказалось, что этого не наблюдается: добавление плюроника после выхода кривой на стационарный уровень флуоресценции пирамина не приводило к изменению флуоресценции (рис. 3б). Последующее введение ионофорного антибиотика валиномицина (5×10^{-6} моль/л) и каналаформера грамицидина А (2×10^{-7} моль/л) резко увеличивало интенсивность флуоресценции до уровня, соответствующего начальному значению рН (рис. 2б). Аналогичные результаты были получены и в липосомах с заранее сформированным трансмембранным градиентом рН, использовавшихся для исследования транспорта антрациклических антибиотиков DOX и DNM (данные не приведены). Эти результаты показывают, что плюроник не вызывал образования в мембране каналов или пор, проницаемых для протонов или компонентов буфера.

Если плюроник добавлялся к липосомам одновременно с проникающим через мембрану соединением, скорость транспорта заметно увеличивалась, причем конечный уровень флуоресценции практически не менялся. Так, например, добавление $2 \times 10^{-3}\%$ плюроника L61 вызывало почти

двукратное ускорение транспорта холевой кислоты при 14°C (рис. 2б, кривая 2).

Эффект плюроника, выраженный как соотношение эффективных констант скорости транспорта в присутствии и в отсутствие полимера (k/k_0), линейно возрастал с повышением концентрации сополимера, причем наклон этой зависимости характеризовал степень ускорения транспорта, вызываемого плюроником (рис. 3). Видно, что наклон полученных зависимостей сильно зависел от структуры транспортируемого вещества. Так, в концентрации $10^{-4}\%$ плюроник вызывает шестикратное ускорение транспорта DNP-Tyr, в то время как скорость транспорта DNP-Phe в аналогичных условиях увеличивается только на 10%.

Наибольшее ускорение транспорта наблюдали для холевой кислоты и производных триптофана, тирозина, метионина. При этом оказалось, что транспорт антрациклических антибиотиков и производных фенилаланина ускоряется плюроником в значительно меньшей степени.

Влияние $2 \times 10^{-3}\%$ плюроника L61 на скорость проникновения упомянутых ранее кислот и оснований исследовано при 14°C . Результаты представлены в табл. 1. Даже поверхностный анализ данных, приведенных в этой таблице, показывает, что в наибольшей степени плюроник ускоряет транспорт веществ, самопроизвольный перенос которых сам по себе довольно медленный.

Чтобы выяснить, какие структурные особенности соединений существенны для ускорения их транспорта через липидные мембранные в присутствии плюроника, были изучены корреляции между кинетическими константами, представленными в табл. 1, и различными структурными параметрами низкомолекулярных соединений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для получения информации о том, какие структурные особенности переносимого через мембрану соединения способствуют ускорению его транспорта под действием плюроника, использован метод корреляционного анализа. Для всех исследованных соединений было рассчитано 12 молекулярных дескрипторов, значения которых даны в табл. 2. Их можно условно разделить на четыре группы. В первую группу входят де-

скрипторы, описывающие в основном размер молекулы и ее гидрофобность: мак-говановский объем V , рассчитываемый из инкрементов отдельных атомов с учетом их степени гибридизации и деленный на 100 [21], коэффициент распределения в системе октанол–вода $\lg P_{\text{октанол}/\text{вода}}$ [22]; площадь гидрофобной поверхности $S_{\text{гфб}}$ (нм^2) [23] и коэффициент распределения между газовой фазой и гексадеканом L [24]. Вторая группа состоит из дескрипторов, учитывающих способность молекулы к образованию диполь–дипольных и наведенных дипольных взаимодействий с участием кратных связей и полярных групп (поляризуемость S [25] и избыточная мольная рефракция E [25]). Третья группа дескрипторов учитывает способность молекулы к образованию водородных связей (протонодонорная A и протоноакцепторная B способности (H -кислотность и H -основность соответственно [26])) и количество протонодонорных и протоноакцепторных групп nA и nB . Наконец, четвертая группа включает 3D-дескрипторы – топологическую площадь полярной поверхности, деленную на 40 ($TPSA/40$ [27]) и проекцию дипольного момента на нормаль к поверхности мембранны (μ_z). Эта группа дескрипторов учитывает пространственное расположение гидрофильных областей в молекуле проникающего соединения ($TPSA/40$) и его ориентацию в мемbrane. Последний дескриптор был предложен нами впервые на основании представлений об анизотропности липидного бислоя и ориентации слабых кислот и оснований на границе раздела фаз мембрана–вода.

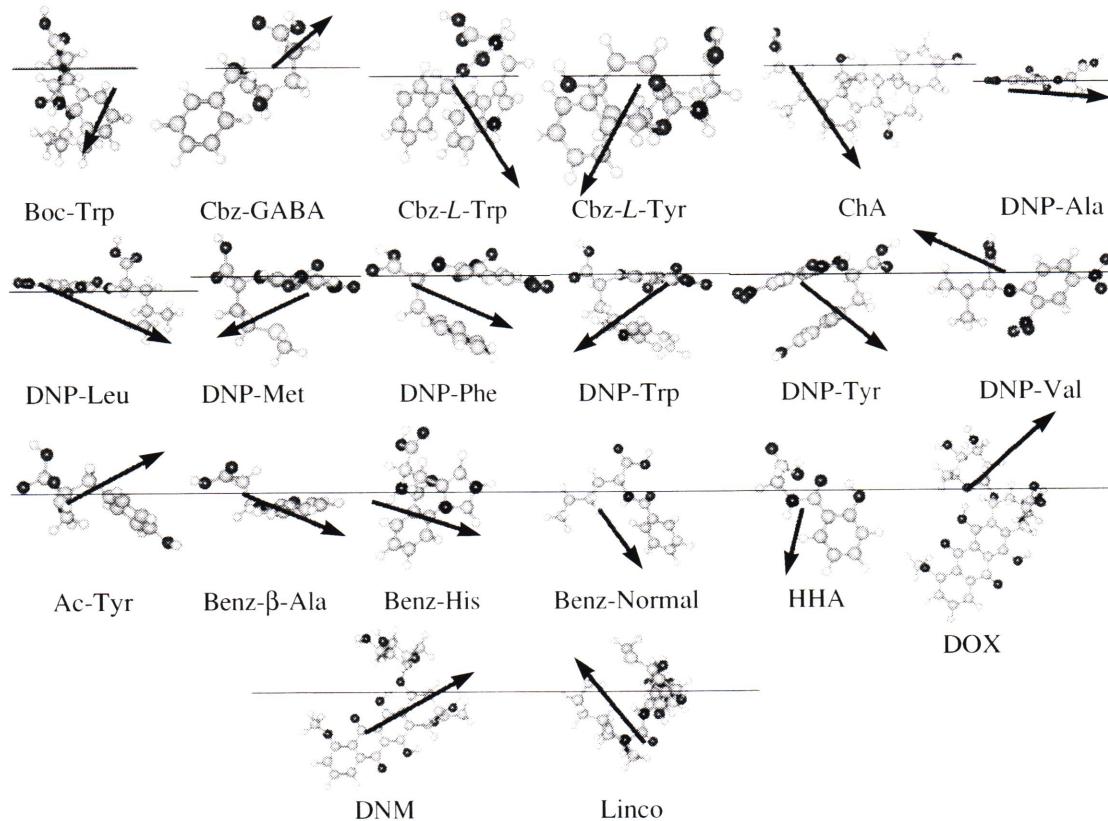
Известно, что соединение, которое проникает через липидную мембрану, подвергается влиянию дипольного потенциала мембранны. Оно обусловлено наличием сильно поляризованных сложноэфирных групп в молекулах фосфолипидов, а также ориентированными диполями воды вблизи ее поверхности [28]. Дипольный потенциал липидного бислоя был открыт Либерманом и Топалым в конце 60-х годов XX века при сравнении коэффициентов проницаемости гидрофобных катионов и анионов [29] и, очевидно, является важным фактором, определяющим проницаемость мембран. Известно, что внутримембранные поля не распространяются за пределы бислоя [28]. Поэтому ориентация молекулы слабой кислоты или основания при адсорбции на поверхности мембранны не зависит от направленности вектора

Таблица 1. Влияние плюроника на трансмембранный перенос соединений (k/k_0) (температура 14°C, pH 8.2, концентрация плюроника L61 $2 \times 10^{-3}\%$)

Образец, №	Соединение	k/k_0	$\ln(k/k_0)$
1	Boc-Trp	2.80 ± 0.20	1.04 ± 0.073
2	Cbz-GABA	0.75 ± 0.70	-0.27 ± 0.51
3	Cbz-L-Trp	1.90 ± 0.20	0.73 ± 0.068
4	Cbz-L-Tyr	0.95 ± 0.20	-0.05 ± 0.02
5	ChA	4.61 ± 0.15	1.50 ± 0.10
6	DNP-Ala	2.05 ± 0.20	0.70 ± 0.05
7	DNP-His	$k \times 10^2 =$ $= 2.20 \pm 0.10 \text{ c}^{-1}$	–
8	DNP-Leu	1.85 ± 0.20	0.60 ± 0.04
9	DNP-Met	4.50 ± 0.20	0.65 ± 0.05
10	DNP-Phe	1.25 ± 0.15	0.17 ± 0.01
11	DNP-L-Trp	5.00 ± 0.22	1.60 ± 0.10
12	DNP-Tyr	4.65 ± 0.20	1.55 ± 0.10
13	DNP-Val	0.90 ± 0.20	-0.07 ± 0.02
14	Ac-Tyr	$k_0 \times 10^2 =$ $= 7.9 \pm 0.2 \text{ c}^{-1}$	–
15	Benz-β-Ala	1.11 ± 0.12	0.105 ± 0.007
16	Benz-His	4.04 ± 0.31	1.40 ± 0.10
17	Benz-Norval	$k_0 = 2.8 \pm 0.2 \text{ c}^{-1}$	–
18	HHA	1.76 ± 0.16	0.57 ± 0.05
19	DOX	1.63 ± 0.06	0.49 ± 0.05
20	DNM	1.26 ± 0.05	0.23 ± 0.016
21	Linco	1.06 ± 0.03	0.051 ± 0.005

ее дипольного момента, а определяется взаимным расположением гидрофобных и гидрофильных частей молекулы. Дипольный момент молекулы транспортируемого вещества может быть как сонаправленным, так и противоположно направленным с вектором внутримембранныго поля.

Расчет энергетически оптимальных конформаций и их размещение в мемbrane проводили, согласно правилам, приведенным в экспериментальной части. Ниже показаны примеры расположения оптимальных конформаций всех исследованных соединений на поверхности мембранны, которая представлена на рисунках как горизонтальная линия, а векторы дипольных моментов – стрелками. Атомы углерода обозначены серым цветом, водорода – белым, кислорода – темно-серым, азота – черным, серы – светло-серым.



Следуя этим правилам, получили, что ориентация молекулы доксорубицина соответствует опубликованной ранее [30], что подтверждает справедливость использованных алгоритмов. Полученные таким образом значения μ_z использовали в качестве дескрипторов соединений (табл. 2).

Прежде всего были исследованы однопараметрические корреляции всех дескрипторов с экспериментальными значениями $\ln k_0$ и $\ln(k/k_0)$. Оказалось, что оба параметра обнаруживали значимые коэффициенты корреляции с объемом переносимого соединения, равные -0.52 и 0.6 соответственно. Возрастание объема соединения приводило к снижению скорости его транспорта в отсутствие полимера ($\ln k_0$) и сопровождалось увеличением эффекта, оказываемого плюроником ($\ln(k/k_0)$). Приведенные результаты согласуются с ранее опубликованными закономерностями [31, 32].

Коэффициенты корреляции дескрипторов $\lg P_{\text{октанол/вода}}$, L , S , E , $S_{\text{рфб}}$, A , B , nA , nB и $TPSA/40$ с обоими параметрами не превышали 0.3, т.е. ни один из этих параметров не вносит решающего вклада в наблюдаемую в эксперименте скорость

транспорта соединений. В то же время параметр μ_z коррелировал с $\ln(k/k_0)$ с коэффициентом 0.6, что свидетельствует о заметном влиянии ориентационных факторов на транспорт соединений через мембрану.

Чтобы учесть вклад различных факторов в эффект плюроника на транспорт соединений через липидные мембранны, были построены много-параметрические корреляции измеренных параметров с различными сочетаниями дескрипторов из приведенного выше набора. Важнейшим требованием к дескрипторам, входящим в корреляционное уравнение, является их взаимная независимость. Анализ парных корреляций между дескрипторами показал, что объем V , подвижность веществ в газожидкостной распределительной хроматографии L , поляризуемость S , топологическая площадь полярной поверхности $TPSA/40$ и избыточная мольная рефракция E сильно зависят друг от друга, поэтому в одном корреляционном уравнении нельзя использовать более одного из указанной группы дескрипторов. Все параметры данной группы количественно выражают размеры молекулы. В дальнейшем в качестве основно-

Таблица 2. Молекулярные дескрипторы соединений, транспорт которых через липосомальные мембранны был исследован

Образец, №	Соединение	$\lg P_{\text{октанол/вода}}$	$S_{\text{гфб}}$	L	$TPSA/40$	V	S	E	A	B	nA	nB	μ_z
1	Boc-Trp	1.82	4.73	11.88	2.28	2.32	2.19	1.79	1.04	1.58	3	6	-2.23
2	Cbz-GABA	2.01	4.43	8.657	1.89	1.81	1.86	1.1	0.73	1.22	2	5	0.612
3	Cbz-L-Trp	2.71	4.70	13.89	2.28	2.503	2.69	2.41	1.07	1.59	3	6	-1.29
4	Cbz-L-Tyr	2.01	4.53	11.88	2.39	2.33	2.48	1.93	1.08	1.6	3	6	-0.51
5	ChA	2.59	5.80	13.92	2.45	3.30	2.66	1.84	1.07	1.84	4	5	-2.12
6	DNP-Ala	-0.21	3.02	9.186	3.67	1.66	2.44	1.52	0.70	1.08	2	9	-1.06
7	DNP-His	-0.63	3.86	12.68	4.39	2.09	3.08	2.09	1.06	1.58	3	11	3.29
8	DNP-Leu	1.01	4.07	10.46	3.67	2.08	2.41	1.52	0.67	1.13	2	9	-1.15
9	DNP-Met	0.25	3.87	11.38	4.30	2.11	2.61	1.88	0.68	1.28	2	9	-1.52
10	DNP-Phe	1.4	3.93	12.32	3.67	2.27	2.89	2.17	0.7	1.17	2	9	-0.36
11	DNP-D-Trp	1.48	4.16	15.11	4.07	2.49	3.31	2.82	1.07	1.42	3	10	-2.38
12	DNP-Tyr	0.78	4.34	13.11	4.18	2.32	3.09	2.34	1.08	1.41	3	10	-2.15
13	DNP-Val	0.53	3.77	9.97	3.67	1.94	2.41	1.52	0.58	1.13	2	9	-0.43
14	Ac-Tyr	-1.2	3.68	8.727	2.16	1.66	1.92	1.28	1.13	1.34	3	5	-0.15
15	Benz- β -Ala	0.84	3.64	7.684	1.66	1.47	1.74	1.1	0.78	1.04	2	4	-0.52
16	Benz-His	-0.75	3.90	10.98	2.38	1.89	2.35	1.67	1.1	1.57	3	6	-3.19
17	Benz-Norval	0.72	4.32	8.471	1.66	1.75	1.71	1.1	0.75	1.08	2	4	-1.49
18	HHA	-0.34	3.28	7.971	2.16	1.39	1.95	1.28	1.16	1.28	3	5	-1.39
19	DOX	0.32	6.32	21.14	5.15	3.73	4.1	3.63	1.56	3.74	7	12	0.5
20	DNM	1.01	6.74	20.34	4.646	3.67	3.87	3.47	1.21	3.48	6	11	0.86
21	Linco	0.72	6.31	11.88	3.69	3.10	2.64	2.08	1.48	2.9	5	8	1.3

го параметра указанной группы применялся макговановский объем V .

Группа дескрипторов, описывающая способность веществ к образованию водородных связей, также не свободна от взаимных корреляций в пределах использованного набора соединений. Оказалось, что параметр B сильно коррелирует с объемом V , подвижностью в газожидкостной хроматографии L и поляризумостью S . При этом параметр A обнаруживал значительно меньшую зависимость от указанных параметров, однако в свою очередь зависел от B , поскольку любой донор протонов (Н-кислота) является также и акцептором протонов.

Параметр B обнаружил также значительную корреляцию с μ_z , что не дает возможность использовать эти два дескриптора в одной многопараметрической модели. В то же время с другими параметрами μ_z не коррелировал.

Для исследования способности перечисленных выше дескрипторов описывать процесс транспорта через мембрану изучали их возможные двойные и тройные комбинации для построения корреляций с экспериментальным параметром $\ln(k/k_0)$. Корреляционные уравнения при этом искали в виде

$$\ln(k/k_0) = c_0 + z_1 Z_1 + z_2 Z_2 + z_3 Z_3, \quad (5)$$

где прописные буквы обозначают молекулярные дескрипторы использованных соединений, приведенные в табл. 2, а строчные – коэффициенты в корреляционном уравнении, получаемые из регрессионного анализа экспериментальных данных [25, 26].

После исключения из рассмотрения комбинации взаимно зависимых дескрипторов было проанализировано 15 двух- и 25 трехпараметрических корреляций экспериментальных параметров

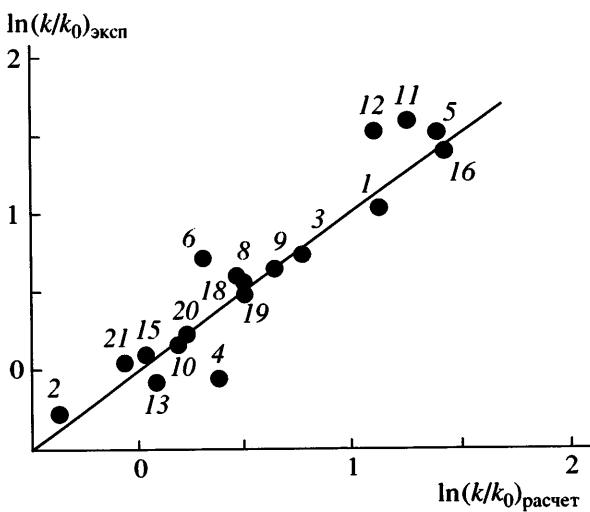


Рис. 4. Взаимосвязь между экспериментальными значениями $\ln(k/k_0)$ и рассчитанными по уравнению (6). Номера точек соответствуют номерам соединений в табл. 1.

с различными сочетаниями дескрипторов, представленных в табл. 2. Оказалось, что влияние плюроника на скорость транспорта слабых кислот и оснований наилучшим образом описывается трехкомпонентным набором дескрипторов, включающим μ_Z , A и V , согласно следующему уравнению:

$$\begin{aligned} \ln(k/k_0) = & (-0.87 \pm 0.25) - (0.44 \pm 0.05)\mu_Z + \\ & + (0.28 \pm 0.10)A + (0.31 \pm 0.08)V, \quad (6) \end{aligned}$$

$R = 0.90, \quad N = 19, \quad F = 24.5$

На рис. 4 показана взаимосвязь между экспериментальными значениями $\ln(k/k_0)$ и рассчитанными по уравнению (6). Небольшой разброс точек указывает на то, что данный набор дескрипторов наиболее полно отражает действие плюроника.

Таким образом, корреляционный анализ данных по влиянию плюроника на транспорт слабых кислот и оснований показал, что плюроник в большей степени ускоряет транспорт крупных молекул, веществ, содержащих протонодонорные группы (OH , COOH , NH), и соединений, положительный конец вектора дипольного момента которых при встраивании в поверхностный монослои мембранны направлен к ее центру.

Перечисленные требования к структуре веществ, транспорт которых должен ускоряться в

присутствии плюроников, можно интерпретировать и с точки зрения механизма действия полимера на транспорт. Так, известно, что трансбислойная диффузия молекул ограничивается скоростью перестройки структуры липидной мембраны, и крупные молекулы переносятся через мембрану медленнее, чем молекулы небольшого размера. Тот факт, что плюроник в большей степени ускоряет мембранный транспорт крупных молекул, свидетельствует о том, что существенный вклад в механизм действия полимера вносят возмущения в упаковку бислоя, вызываемые встраиванием в него полимера. Этот вывод хорошо согласуется с более ранними наблюдениями, сделанными в нашей лаборатории, касающимися влияния плюроника на скорость флип-флопа [11–14] и мембранный микровязкость, измеренную с помощью анизотропии флуоресценции [10].

Способность плюроника в большей степени ускорять транспорт соединений, содержащих протонодонорные группы, указывает на возможность образования комплексов между плюроником и переносимым через мембрану веществом, стабилизованных водородными связями между группами $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ полимера и протонодонорными группами переносимого вещества. Этот механизм согласуется с отмечавшейся ранее способностью плюроников и других полиалкиленоксидов образовывать водородные связи с Н-кислотными соединениями [33]. В то же время коэффициенты в корреляционном уравнении (6) показывают, что вклад данного процесса не является основным.

Наконец, действие плюроника на подвижность молекул в мембране может способствовать преодолению барьера, обусловливаемого внутримембранным электрическим полем. Мы наблюдали, что плюроник в наибольшей степени ускоряет перенос соединений, самопроизвольный транспорт которых относительно медленный, таких как холевая кислота или DNP-L-Trp. Похожие закономерности были описаны для влияния плюроников на транспорт производных малоновой кислоты [12]. Можно предположить, что плюроник способствует переориентации соединения во внутримембранным электрическом поле и, таким образом, способствует его переносу через гидрофобную область бислоя.

Авторы благодарны Е.С. Гариной за проведение анализа плюроника L61 методом ГПХ и Л.А. Казарину за помощь в исследовании полимеров методом ИК-спектроскопии. Авторы выражают свою благодарность Dr. G. Cimpan из Sirius Analytical Instruments Ltd. за предоставление демонстрационной версии пакета программ ADME Boxes 2.0. Авторы также благодарны И.И. Баскину за помощь в расчете дипольных моментов, А.В. Левашову за предоставленные производные аминокислот, Ю.Н. Антоненко и Л.С. Ягужинскому за плодотворное обсуждение результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmolka I.R., Lundsted I.G. The Synthesis and Properties of Block Copolymer Polyol Surfactants. Block and Graft Copolymerization. New York: Wiley, 1986.
2. Mansur C.R. E., Barboza S.P., Gonzalez G., Lucas E.F. // J. Colloid Interface Sci. 2004. V. 271. № 1. P. 232.
3. Дудукин И.А., Медведев С.С., Грицкова И.А. // Докл. АН СССР. Физика. Химия. 1966. Т. 17. № 22. С. 133.
4. Talmage S.S. Environmental and human safety of major surfactants: Alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates. Boca Raton: Lewis Publ., 1994. P. 51.
5. Moghimi S.M., Hunter A.C. // Trends Biotechnol. 2000. V. 18. № 10. P. 412.
6. Anthony P., Lowe K.C., Davey M.R., Power J.B. // Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. 1998. V. 26. № 1. P. 27.
7. Pool C., Nutting D.F., Simmonds W.J., Tso P. // Am. J. Physiol. 1991. V. 261. № 2. Pt 1. P. 256.
8. Kabanov A.V., Okano T. // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 519. P. 1.
9. Kabanov A.V., Batrakova E.V., Alakhov V.Yu. // Adv. Drug Del. Rev. 2002. V. 54. P. 759.
10. Melik-Nubarov N.S., Pomaz O.O., Dorodnych T.Yu., Badun G.A., Ksenofontov A.L., Schemchukova O.B., Arzhakov S.A. // FEBS Lett. 1999. V. 446. № 1. P. 194.
11. Demina T., Grozdeva I., Krylova O., Zhirmov A., Istratov V., Frey H., Kautz H., Melik-Nubarov N. // Biochemistry. 2005. V. 44. № 10. P. 4042.
12. Erukova V.Yu., Krylova O.O., Antonenko Yu.N., Melik-Nubarov N.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1468. № 1–2. P. 73.
13. Жирнов А.Е., Павлов Д.Н., Демина Т.В., Бадун Г.А., Гроздова И.Д., Мелик-Нубаров Н.С. // Высокомолек. соед. А. 2006. Т. 48. № 11. С. 2023.
14. Zhirnov A.E., Demina T.V., Krylova O.O., Grozdeva I.D., Melik-Nubarov N.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1720. № 1–2. P. 73.
15. Harrigan P.R., Wong K.F., Redelmeier T.E., Wheeler J.J., Cullis P.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1149. № 2. P. 329.
16. Kamp F., Hamilton J.A. // Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. № 23. P. 11367.
17. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 352.
18. Abraham M.H., Ibrahim A., Zissimos A.M., Zhao Y.H., Comer J., Reynolds D.P. // Drug Discovery Today. 2002. V. 7. № 20. P. 1056.
19. Gutknecht W.A.J. // J. Membr. Biol. 1984. V. 77. № 3. P. 255.
20. Saparov S.M., Antonenko Y.N., Pohl P. // Biophys. J. 2006. V. 90. № 11. P. 86.
21. Abraham M.H., McGowan J.C. // Chromatographia. 1987. V. 23. № 3. P. 243.
22. Leo A., Hansch C., Elkins D. // Chem. Rev. 1971. V. 71. № 6. P. 525.
23. Aquino A.J.A., Tunega D., Haberhauer G., Gerzabek M.H., Lischka H. // J. Phys. Chem. A. 2002. V. 106. № 9. P. 1862.
24. Abraham M.H., Ibrahim A., Zissimos A.M. // J. Chromatography A. 2004. V. 1037. № 1. P. 29.
25. Kamlet M.J., Doherty R.M., Abraham M.H., Veith G.D., Abraham D.J., Taft R.W. // Environ. Sci. Technol. 1987. V. 21. № 2. P. 149.
26. Abraham M.H. // Chem. Soc. Rev. 1993. V. 22. № 1. P. 73.
27. Ertl P., Rohde B., Selzer P. // J. Med. Chem. 2000. V. 43. № 20. P. 3714.
28. Clarke R.J. // Adv. Colloid Interface Sci. 2001. V. 89–90. № 3. P. 263.
29. Либерман Ю.А., Топалы В.П. // Биофизика. 1969. Т. 14. № 3. С. 452.

30. Heywang C., Chazalet S.-P.M., Masson C.M., Bolland J. // Biophys. J. 1998. V. 75. № 5. P. 2368.
31. Xiang T.X., Anderson B.D. // Biophys. J. 1998. V. 75 № 6. P. 2658.
32. Hou T.J., Zhang W., Xia K., Qiao X.B., Xu X.J. // J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2004. V. 44. № 5. P. 1585.
33. Антипина А.Д., Барановский В.Ю., Паписов И.М., Кабанов В.А. // Высокомолек. соед. А. 1972. Т. 14. № 4. С. 941.

Relation between the Structure of Compounds and the Effect of Pluronic L61 on Their Permeation Through Lipid Membranes

V. S. Bugrin and N. S. Melik-Nubarov

*Faculty of Chemistry, Moscow State University,
Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia
e-mail: melik.nubarov@genebee.msu.ru*

Abstract—In view of the earlier observation that the incorporation of Pluronics in lipid membranes facilitates their permeability to various drugs, the relationship between the structure of a permeant and the Pluronic-induced acceleration of its membrane transport was studied. The extent of acceleration defined as the ratio of the apparent permeation rate constants in the presence and in the absence of Pluronic, k/k_0 , was determined for 21 weak acids and bases. Multiparameter correlations of the obtained data with various structural characteristics of solutes transferable across a membrane were constructed. Twelve structural parameters of the permeants were examined. The best correlation was achieved with a linear combination of the three parameters: the McGowan volume V of a compound, its proton-donating ability A , and the projection of the dipole moment of the molecule onto the normal to the membrane surface μ_Z : $\ln(k/k_0) = -0.87 - 0.44\mu_Z + 0.31V + 0.28A$, $R = 0.90$. This means that Pluronic preferably accelerates the permeation of large molecules containing proton-donating groups and molecules incorporated in the lipid bilayer in such a manner that the vector of their dipole moment is aligned with the dipole potential of the membrane.