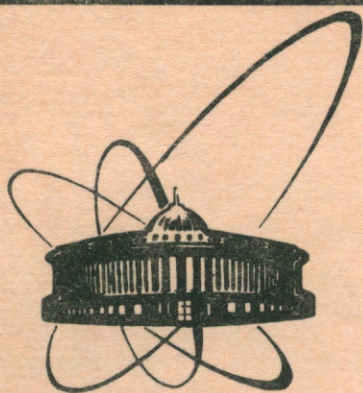


91-387



сообщения  
объединенного  
института  
ядерных  
исследований  
дубна

14-91-387

П.Балгави\*, В.И.Горделий, А.Г.Сырых

ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНЫХ АНЕСТЕТИКОВ:  
ГЕПТАКАИН-ГИДРОХЛОРИДА  
И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ - НА СТРУКТУРУ МЕМБРАН  
ИЗ 1,2-ДИПАЛЬМИТОИЛ-SN-ГЛИЦЕРО-3-ФОСФОХОЛИНА

---

\*Университет им.Я.Коменского, Братислава

1991

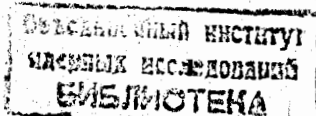
## 1. Введение

Механизм влияния биологически активных веществ на функционирование клетки является открытым вопросом биофизики. Одна из обсуждаемых возможностей - это воздействие локальных анестетиков на клетку через изменение функционирования ее мембраны. Здесь есть две возможности. Первая - локальный анестетик, например, взаимодействует со специфическим рецептором, состоящим из белков [1], или за счет неспецифического связывания с его гидрофобной частью [2]. Вторая - локальные анестетики, взаимодействуя с липидным блоком, изменяют его свойства и таким образом влияют на структуру и функционирование мембран [3].

Данная работа посвящена изучению влияния локальных анестетиков - гептакаин-гидрохлорида и его производных - на структуру мембран из дипальмитоиллецитина (DPPE). Дифракция нейтронов - наиболее прямой метод изучения структуры липидных мембран [4].

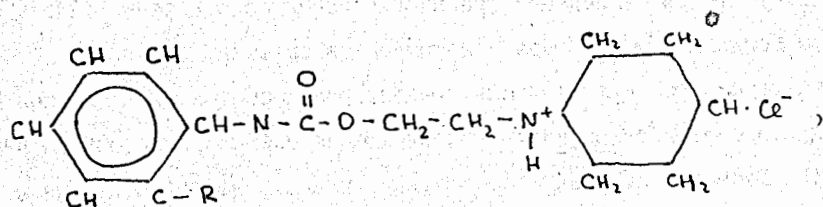
Изучено влияние гептакаина на взаимодействие мембран в зависимости от его мольной концентрации в мембране, как в геле-, так и в жидкой фазах. Определены температуры фазовых переходов геле-жидкий кристалл для гептакаина и его производных, а также изучена зависимость периода повторяемости  $d$  от температуры при двух мольных концентрациях липид/анестетик: 1/1 и 5/1.

И, наконец, с использованием дейтерий-меченного анестетика IV (радикал  $R=OCD_3$ ) определена локализация радикала в области бензольного кольца молекулы анестетика.



## 2. Материалы и методы

Для приготовления образцов использовался 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) производства фирмы SERVA. Гептакаин и его производные были синтезированы на фармакологическом факультете Университета им. Я. Коменского, г. Братислава. Использовались следующие соединения:



где R-радикал, для которого далее используются обозначения:

номер радикала	химическая формула радикала
0	H
R	$O(CH_2)_{2(k-d)} \cdot CH_3$

Молекула с  $R = 4$  соответствует гептакаину, а с  $R = 1$  - его производной. В последнем случае использовалась также дейтерий-меченная молекула с полностью дейтерированным радикалом ( $R=OCD_3$ ). Далее этот анестетик обозначался индексом IV.

### а. Ориентированные образцы из DPPC+IV (мольные соотношения 1:1) на кварцевых подложках

Эти образцы получались путем медленного испарения 0.2 мл 5% раствора DPPC и VI в этаноле, нанесенного на полированную кварцевую подложку размером 25x25 мм<sup>2</sup>. При этом температура образца была 55°C - выше таковой для фазового перехода гель-жидкий кристалл [5].

Образец помещался в алюминиевый контейнер, при  $T = 22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Относительная влажность паров воды задавалась насыщенным раствором соли  $K_2SO_4$  и составляла  $\psi = 97\%$ . Время установления равновесия было не меньше двух часов.

Измерения проводились на нейтронном дифрактометре по времени пролета [6] на импульсном реакторе ИБР-2 ОИЯИ (Дубна) при средней мощности  $W = 2$  мВт, частоте импульсов 5 Гц и среднем потоке нейтронов на образец  $1.3 \times 10^7 \text{ н} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$  [6,7]. Средний угол Брэгга был  $7.5^\circ$  и время измерения одного спектра - 2 часа, при этом статистическая точность наиболее сильных рефлексов была ~1 - 3%, а более слабых - несколько процентов. Регистрировались первые четыре дифракционных отражения, остальные были значительно слабее. Для определения фаз структурных факторов и распределения воды в мембране измерения проводились в парах  $H_2O$ ,  $H_2O : D_2O = 1:1$  и  $D_2O$ . Фазы структурных факторов определялись, как изложено в работе [8].

Определение плотностей амплитуд рассеяния в направлении нормали плоскости мембран определялось по формуле

$$P(x) \sim \sum_h F(h) \cdot \cos\left(\frac{2\pi hx}{d}\right), \quad (1)$$

где  $F(h)$  - структурный фактор  $h$ -го дифракционного рефлекса,  $d$  - период повторяемости. Определение положения дейтерированных меток и положения воды производилось с помощью разностного фурье-синтеза:

$$P_D(x) \sim \sum_h \{F_D(h) - F_H(h)\} \cdot \cos\left(\frac{2\pi hx}{d}\right), \quad (2)$$

где  $F_D(h)$  и  $F_H(h)$  - структурные факторы мембран с дейтерированной и обычной компонентами. Кроме того, пользуясь тем, что структурные факторы обладают свойством аддитивности: т.е. структурный фактор всей мембраны есть сумма структурных факторов всех ее компонент, аналогично работе [8], можно вычислить из экспериментальных структурных факторов структурные факторы воды и бислая.

Положение дейтерированной метки определялось двумя способами. В первом случае - путем минимизации  $R$ -фактора:

$$R = \sum_h \frac{|F(h) - F_H(h)|}{|F(h)|}, \quad (3)$$

где  $F_H(h)$  - структурный фактор от теоретического распределения метки

$$P_H(x) = t_N \left[ \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2}{\nu^2}\right] + \exp\left[-\frac{(x+x_0)^2}{\nu^2}\right] \right], \quad (4)$$

равный

$$F_H = 2 t_N \exp\left[-\frac{\pi^2 \nu^2 h^2}{d^2}\right] \cdot \cos\left(\frac{2\pi h x_0}{d}\right). \quad (5)$$

Выше мы предположили, как и в работе [9], что распределение дейтериевой метки гауссово, с дисперсией, равной  $\nu^2/2$ , положением метки  $x_0$  и амплитудой распределения  $t_N$ .

#### б. Неориентированные мембраны в воде

Мультислойные дисперсии получались путем растворения 30 мг смеси DPPC с соответствующим анестетиком в этаноле (10 % раствор) в кварцевом капилляре с внутренним диаметром  $\approx 2.5$  мм с последующим испарением растворителя при  $T = 50^\circ\text{C}$  и дальнейшей откачкой в форвакууме в течение одного часа. После чего добавлялось необходимое количество тяжелой воды и осуществлялась процедура гомогенизации в течение  $\sim 1$ -го дня.

Дифракционные спектры измерялись при среднем угле Брэгга

$\theta = 5^\circ$  для мембран из DPPC, а также DPPC с гептакаином и его производными при двух мольных отношениях липид/анестетик: 1:1 и 1:5 в избытке воды (весовое соотношение липид/вода 1:1). Измерения проводились при различных температурах в интервале от 5 до  $65^\circ\text{C}$ . Кроме того, изучена зависимость периода повторяемости мультислойных мембранных структур DPPC от мольной концентрации гептакаина при весовом соотношении липид/вода 1:1. Период повторяемости  $d$  вычислялся из положений максимумов дифракционных пиков первого порядка отражения в соответствии формулой Брэгга:

$$2d \sin \theta = \lambda. \quad (6)$$

где  $\lambda$  - длина волны нейтронов, соответствующая максимуму дифракционного пика первого порядка отражения. Время измерения одного дифракционного спектра составляло 5 - 10 минут.

### 3. Результаты и обсуждения

Вычисленные из экспериментальных интегральных интенсивностей, аналогично работе [8], структурные факторы для распределения воды, плотности амплитуд рассеяния для бислоев с дейтериевой меткой (обозначается DPPC + IV (D)) и без (обозначается DPPC + IV) для мембран из DPPC с анестетиком IV ( $R = 1$ ) в мольном соотношении 1:1 приведены в таблице

Таблица. Структурные факторы для бислоев DPPC с анестетиком IV с дейтериевой меткой и без, а также для метки и воды при  $T = 23^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $\Psi = 97\%$ . Период повторяемости равен  $52.5 \pm 1.0 \text{ \AA}$

	$F_1$	$F_2$	$F_3$	$F_4$
DPPC+IV(D) (бислой)	-3.28	-5.54	1.87	-2.72
DPPC+IV (бислой)	-2.36	-4.96	1.99	-3.25
LAB (метка)	-0.92	-0.58	-0.12	0.52
вода	-18.8	7.38	-1.77	1.68

На рис. 1 показаны плотности амплитуд рассеяния для бислоев с дейтерированным и недейтерированным анестетиком IV, а также разностная кривая, соответствующая распределению метки в мембране, вычисленные по формулам (1) и (2). Из рисунка можно видеть, что фурье-профиль для бислоя вместе с анестетиком существенно отличается от такового для мембран из DPPC. Это говорит о том, что анестетик (или его часть) находится в бислое. Более того, учитывая, что

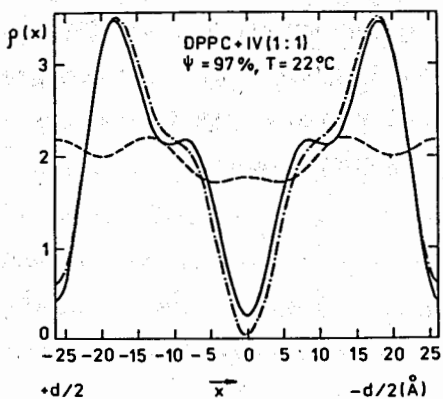


Рис. 1 Плотность амплитуды рассеяния нейтронов в направлении нормали плоскости мембран для бислоев DPPC+IV(D) (1:1) (штрихпунктир) и DPPC+IV (1:1) (сплошная линия). Пунктирной линией показана разность двух распределений. Относительная влажность  $\Psi = 97\%$  и температуры  $T = 22^\circ\text{C}$ .

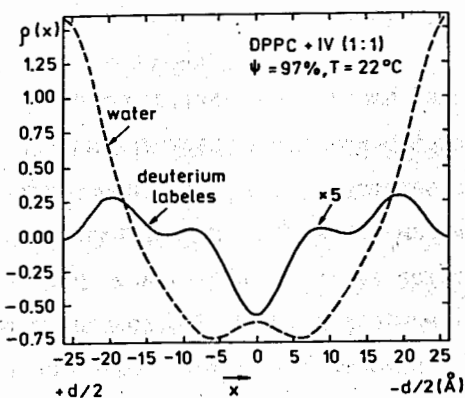


Рис. 2. Фурье-профили распределения воды в мембране (пунктир) и дейтерированной метки (сплошная линия). В последнем случае - увеличение в 5 раз.

плотность амплитуд рассеяния велика для области анестетика возле бензольного кольца, включающего собственно само кольцо и NH-C=O группу, можно предположить, что именно эта часть находится в бислое. На рис. 2 показаны плотности амплитуд рассеяния для метки, которая прямо подтверждает приведенные выше соображения. Определение с помощью минимизации R - фактора дает положение метки  $x = 11.0 \pm 0.4 \text{ \AA}$  и при этом  $R = 29\%$ . Этот результат не может быть удовлетворительным из-за большого значения R - фактора, а также и потому, что модельные структурные факторы третьего и четвертого порядков отражения существенно отличаются от соответствующих экспериментальных значений. Мы предположили, что есть два равновероятных места локализации дейтериевой метки, что достаточно хорошо видно из рис. 2. Обработка экспериментальных структурных факторов с помощью программы FUMILI с использованием формулы (5), адаптированной к двум меткам в мембране, дала следующие значения: два положения меток  $x_1 = 12.8 \text{ \AA}$  и  $x_2 = 21.8 \text{ \AA}$ , ширина распределения меток  $\Delta = 1.2 \text{ \AA}$  и при этом  $\chi^2 = 2.2$  на одну точку.

Учитывая, что СНС1 - группа легко диссоциирует, можно предположить, что углеводородное кольцо находится в самой полярной области мембраны, а бензольное кольцо погружено достаточно глубоко в мембрану ( $x_1 = 12.8 \text{ \AA}$ ), т.е. находится в области C - 2(1) углерода, вблизи соответствующей карбонильной группы. Второе положение метки ( $x_2 = 21.8 \text{ \AA}$ ) означает, что часть молекулы просто находится в области полярных голов липидов, скорее всего часть молекулы находится на поверхности мембраны.

## 6. Неориентированные мембраны

На рис. 3 представлена зависимость периода повторяемости образцов DPPC и DPPC с гептакаином в мольном отношении 1:1 (нижняя кривая) и 5:1 (верхняя кривая) при соотношении липид/вода ( $D_2O$ ) 1:1 (w/w). Для мембран мы видим типичную, известную из литературы [9] зависимость  $d(T)$  с характерным фазовым переходом из  $L_{\beta'}$  в  $P_{\beta}$  фазу при  $\sim 36^\circ C$ , а из  $P_{\beta}$  в  $L_{\alpha}$  при  $43^\circ C$ . Присутствие гептакаина существенно изменяет зависимость  $d(T)$ . При мольном соотношении 1:1 период повторяемости в гель-фазе равен  $\sim 50 \text{ \AA}$ , и наблюдается только один фазовый переход при  $T = 27^\circ C$  во всем интервале температур от  $5^\circ C$  до  $65^\circ C$ . Столь малый период повторяемости (на  $14 \text{ \AA}$  меньше, чем у DPPC), по-видимому, означает, что мембрана находится в гель-фазе со взаимным "проникновением" цепей ("interdigitated" phase). При мольном соотношении 5:1 поведение  $d(T)$  аналогично предыдущему случаю, фазовый переход наблюдается в районе  $30^\circ C$ , но при этом период повторяемости значительно больше (в гель-фазе  $d = 73 \text{ \AA}$ ). Была также изучена зависимость  $d(T)$  от концентрации гептакаина (рис. 4). В гель-фазе зависимость  $d(T)$  ведет себя аналогично таковому для мембран в присутствии двухвалентных катионов  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , для которых характерна специфическая сорбция на мембранах. Т.е. период повторяемости большой при малых концентрациях анестетика и уменьшается при увеличении концентрации за счет дебаевского экранирования заряда на поверхности мембраны противоионами  $Cl^-$ . Это означает, что молекулы гептакаина связаны с бислоем. Действительно, если примерно половина молекул IV "заякорена" в бислое, то су-

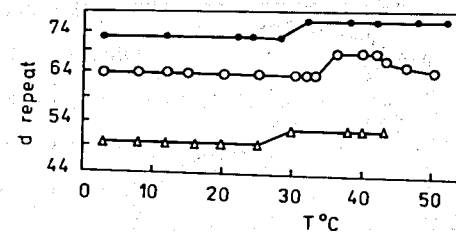


Рис. 3. Зависимость периода повторяемости для мембран из DPPC (○), DPPC + гептакаин (● - мольное отношение липид /анестетик равно 5:1, ▲ - 1:1) от температуры при концентрации вода /липид 1:1 (w/w).

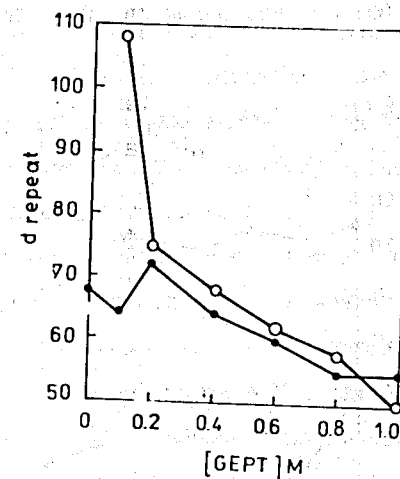


Рис. 4. Зависимость периода повторяемости DPPC от концентрации гептакаина в гель-фазе (○) и жидкой фазе (●). Вода/липид 1:1 (w/w).

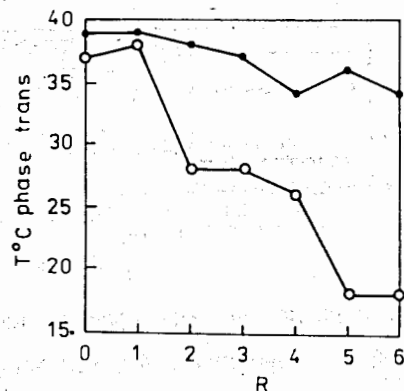


Рис. 5. Зависимость температуры фазового перехода мембран из DPPC для двух мольных концентраций липид/анестетик - 5:1 (●) и 1:1 (○) от типа радикала. Вода/липид - 1:1 (w/w)

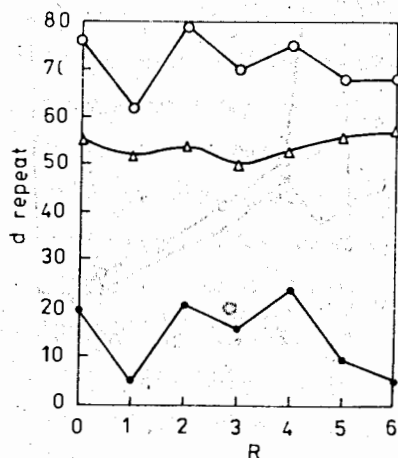


Рис. 6. Зависимость периода повторяемости мембран из DPPC в жидкой фазе от типа анестетика при двух мольных отношениях липид/анестетик 5:1 (○) и 1:1 (Δ). Нижняя кривая - разность. Вода /липид = 1:1 (w/w).

существенно более гидрофобная часть молекулы гептакаина тем более будет находиться в бислое. То, что гептакаин и его производные встраиваются в бислой, подтверждает сильное их влияние на температуру фазового перехода гель-жидкий кристалл. На рис. 5 показана зависимость температуры этого фазового перехода мембран из DPPC в присутствии гептакаина и его производных в зависимости от типа анестетика для двух мольных отношений липид/анестетик 1:1 и 5:1. Зависимость периода повторяемости этих же мембран от типа радикала (анестетика) в жидкой фазе при тех же мольных отношениях, приведенная на рис. 6, подтверждает сильное их влияние на структуру мембран.

Таким образом, гептакаин и его производные, встраиваясь в мембраны, при малых концентрациях существенно изменяют межмембранные взаимодействия за счет электростатического отталкивания, возникающего в результате диссоциации  $Cl^-$ . При больших же концентрациях анестетиков в мембранах происходит дебаевское экранирование поверхностного заряда противоионами  $Cl^-$ , в результате чего электростатическое отталкивание уменьшается. Однако при этих концентрациях наблюдается существенное изменение структуры и взаимодействий в плоскости мембраны. Количественный характер взаимодействий зависит от типа анестетика. При различных концентрациях в мембранах DPPC гептакаина, наиболее биологически активного соединения из рассмотренного ряда [3], наблюдается его существенное влияние на структуру и взаимодействие мембран.



## Литература

1. Hill B. Theories of anesthesia: General perturbations versus specific receptors. In: *Molecular Mechanisms of Anesthesia: Progress in Anesthesiology*, 1980, v.2 (Ed. B. R. Fink), p. p. 1-5. , Raven Press, New York.
2. Richards C. D., Keightly C. A., Hesketh T. R., Metcalfe J. C. A critical evaluation of the lipid hypotheses of anesthetic action. *Ibid.*, p. p. 337-351.
3. Naroda J., Balgavy P., Gawrisch K. and Cizmarik J. - *Gen. Physiol. Biophys.*, 1983, v. 2, pp. 457-471.
4. Worcester D. L. Neutron scattering studies of biological materials. , *Transactions ACA*, 1983, v. 19, p. 37-46.
5. Powers L., Pershar P. S. - *Biophys. J.* , 1977, v. 20, p. 137- 152.
6. Балагуров А. М., Бескровный А. И., Горделий В. И., Датт И. Д., Домославский Я., Тьонг Ле Тхи Кат, Миронова Г. М., Назаров В. М., Попа Н., Савенко Б. Н., Шibaев В. Д. - *Сообщения ОИЯИ*, 1984, 3-84-291, с. 1-12
7. Frank I. M., Pacher P. - *Physica*, 1983, 120B, p. 37
8. Василенко И. А., Тонконог Л. А., Балагуров А. М., Горделий В. И., Боровягин В. Л. - *Биологические мембраны*, 1988, т. 5, N4, с. 428-438.
9. Inoko Y., Mitsui T. - *J. Phys. Soc. Japan*, 1978, 44, 1918-1924.

Рукопись поступила в издательский отдел  
21 августа 1991 года.