

Наноразмерные зонды в биофизике

Результатом сотрудничества российских (НИОХ СО РАН, МТЦ СО РАН) и американских (университеты Огайо, Владосты и Северной Каролины) ученых стало создание наноразмерных зондов для определения кислотности среды (pH) по спектру электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Подобные зонды могут быть использованы для неинвазивного исследования биохимических и физиологических процессов в живом организме. Центральным элементом этих молекулярных зондов являются разработанные в Новосибирском институте органической химии нитроксильные радикалы с pH-зависимым спектром ЭПР.

Нитроксильные радикалы (НР, нитроксиды) – наиболее распространенный класс стабильных радикалов. Небольшие молекулы нитроксидов с легко варьируемой структурой и простым спектром электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), чувствительным к различным параметрам окружения, представляют собой уникальный набор молекулярных зондов для исследования сложных молекулярных систем. Важная область применения таких зондов – биофизика, где НР используются для изучения строения и механизмов

взаимодействия биомолекул и исследования процессов жизнедеятельности клеток, сопровождающихся изменением окислительно-восстановительного статуса, концентрации кислорода и окиси азота NO, кислотности среды и т. д.

Кислотность среды (pH), которая определяется концентрацией ионов водорода (протонов), – один из важнейших, часто измеряемых параметров в биологии, биофизике, медицине. Изменение pH отражает ход различных процессов в организме и может служить признаком развития патологий, таких как ишемия, инфекции, воспаления. Значение межклеточной кислотности играет существенную роль при возникновении опухолей, их росте и терапии.

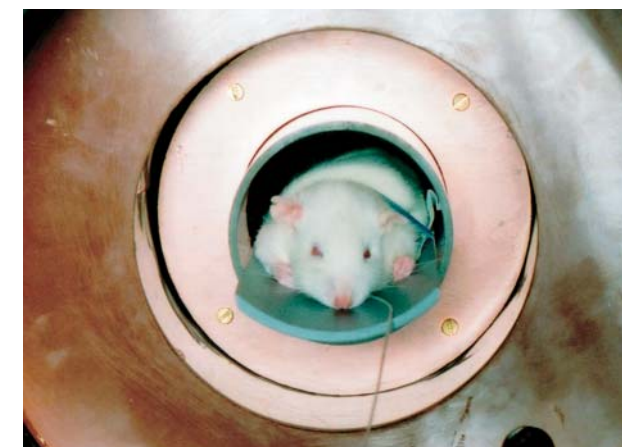
Наиболее эффективными молекулярными ЭПР-зондами для определения кислотности среды на сегодняшний день являются разработанные в НИОХ СО РАН нитроксильные радикалы ряда имидазолина. Но у такого типа зондов есть существенный недостаток – они быстро восстанавливаются в тканях живых организмов. Восстановителями могут быть как низкомолекулярные клеточные антиоксиданты (прежде всего аскорбиновая кислота), так и ферментативные системы. Первичные

продукты восстановления НР в биологических образцах – гидроксиламины, которые не регистрируются с помощью ЭПР.

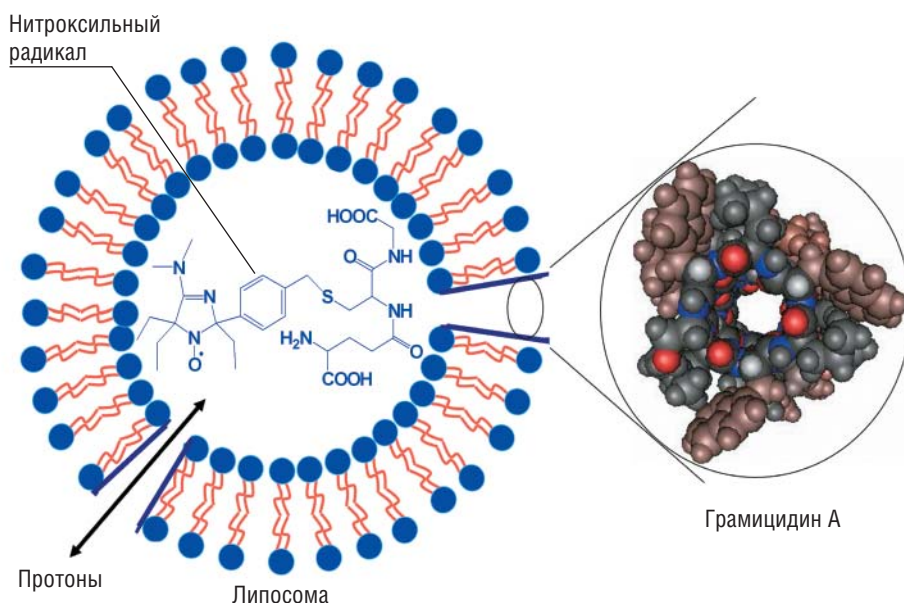
Один из способов стабилизации нитроксильных зондов – заключение их водных растворов в инертные наноразмерные капсулы или пузырьки, состоящие, например, из производных жирных кислот – липидов, являющихся основными компонентами клеточных мембран. Такие пузырьки, в которых маленькие объемы водного раствора отделены от остальной его части липидной мембраной, называют *липосомами*. Благодаря тому, что липидная мембрана полупроницаема, она, с одной стороны, защищает нитроксильный зонд от нежелательного взаимодействия с восстанавливающими компонентами среды, а с другой – сохраняет возможность мониторинга концентрации таких маленьких по размеру частиц, как протон или молекула NO.

Возможность использования липосом для повышения устойчивости НР к восстановлению в биологических объектах и пригодность образующихся при этом наноразмерных ЭПР-зондов для *оксиметрии* (определения концентрации кислорода) были впервые продемонстрированы в начале 1990-х гг. Позднее для защиты от действия биогенных восстановителей высокорекреационноспособных нитронилнитроксильных радикалов, применяющихся для определения окиси азота NO, успешно использовались фосфолипидные липосомы.

Для создания наноразмерных pH-чувствительных ЭПР-зондов в Институте органической химии был осуществлен многостадийный синтез нитроксильных радикалов, не способных проникать через мембрану фосфолипидных липосом. В мембрану внедряли грамицидин А, образующий каналы, проницаемые для протонов. Внутри липосомы помещался высокогидрофильный pH-чувствительный нитроксильный радикал, содержащий остаток трипептида глутатиона. При выдерживании образцов в течение нескольких часов не было обнаружено признаков вытекания НР из липосом. В то же время мембрана липосомы хорошо защищала помещенный во внутреннюю полость нитроксид от восстановления биогенными восстановителями.



Подопытная крыса в резонаторе ЭПР-спектрометра в ходе эксперимента по мониторингу pH в желудке



Схематическое изображение наноразмерного зонда для определения кислотности среды. Во внутренней полости липосомы помещается pH-чувствительный нитроксильный радикал. Внедренный в мембрану липосомы грамицидин А обеспечивает образование каналов, проницаемых для протонов

В присутствии 100-кратного избытка аскорбиновой кислоты наблюдалось лишь незначительное падение интенсивности сигнала ЭПР наноразмерного зонда.

Разработанный зонд на основе нитроксильного радикала был использован для изучения повышения кислотности среды (*ацидоза*) в тканях, извлеченных из сердца крысы с искусственно вызванной ишемией. За 10 минут сигнал ЭПР свободного нитроксильного зонда практически исчезал. Интенсивность же сигнала ЭПР наноразмерного зонда за это время понижалась лишь на 15 %, что позволяло отследить изменение pH.

Таким образом, предложенная концепция позволила впервые создать наноразмерный зонд для определения pH в биологических объектах. Новый зонд значительно превосходит свободный нитроксильный радикал по устойчивости к восстановлению. С учетом той важной роли, которую играет параметр кислотности в различных физиологических процессах, подобные наноразмерные зонды могут стать ценными аналитическими инструментами для биофизических и медико-биологических исследований.

К. х. н. И. А. Кириллюк
(Новосибирский институт органической химии СО РАН)