



5

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 68871

(13) U

(51) МПК

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2011 12552	(72) Винахідник(и):	Посохов Євген Олександрович (UA)
(22) Дата подання заявки:	26.10.2011	(73) Власник(и):	ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	10.04.2012		УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА,
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.04.2012, Бюл.№ 7		пл. Свободи, 4, м. Харків, 61022 (UA)

(54) НАБІР ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ ЗОНДІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІПІДНИХ МЕМБРАН**(57) Реферат:**

Набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран містить шість зондів. Перший зонд являє собою сполуку 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-N(CH₃)₂-феніл)-1,3,4-оксадіазол. Другий зонд являє собою сполуку 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазол, а третій зонд являє собою сполуку 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол. Четвертий зонд являє собою сполуку 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол. П'ятий зонд 2-(2'-ОН-феніл)-9,10-фенантр-1,3-оксазол, а шостий зонд являє собою сполуку 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол.

UA 68871 U

Корисна модель належить до галузі біофізики, біохімії і медичної діагностики й може бути використана для оцінки фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран.

В основі цілого ряду патологічних станів (серцево-судинні захворювання, гормональні порушення, онкозахворювання) лежать зміни фізико-хімічних властивостей клітинних мембран, викликані як факторами зовнішнього середовища (дія хімічних сполук (токсинів), опромінення (іонізуюче і ультрафіолетове), зміна температури і т.і.), так і внутрішніми функціональними розладами (порушення клітинного метаболізму, апоптоз і т.і) [1].

В залежності від типу внутрішнього клітинного процесу або зовнішньої дії, зміни в мембранах можуть відбуватися у різних областях ліпідного бішару. Наприклад, в разі апоптозу відбуваються зміни гідратованості в зовнішній (полярній) частині ліпідного бішару, в той же час, токсична дія циклічних вуглеводнів (ароматичних вуглеводнів, циклоalkanів, терпенів) на мікроорганізми призводять до змін мікрров'язкості внутрішніх (гідрофобних) областей біологічних мембран [1].

Таким чином, для проведення біофізичних і біохімічних досліджень та для медичної діагностики існує необхідність моніторингу фізико-хімічних властивостей в різних областях ліпідного бішару [1].

Метод флуоресцентних зондів дозволяє проводити моніторинг фізико-хімічних властивостей (полярності, в'язкості, гідратованості, заряду поверхні) ліпідних мембран [1]: флуоресцентні зонди є чутливими до параметрів мікросередовища в області їх локалізації в ліпідному бішарі.

Оскільки флуоресцентні зонди різних типів відрізняються по чутливості та селективності до різноманітних параметрів їх мікрооточення (полярності, в'язкості, гідратованості) [1], для вивчення фізико-хімічних властивостей у різних областях ліпідних мембран прийнято застосовувати набори однотипних зондів з різною локалізацією у ліпідному бішарі [1,2].

Існує набір флуоресцентних зондів, який складається з двох зондів: DPH (1,6-дифеніл-1,2,5-гексатрієну) та TMA-DPH (1-(4-триметиламоніумфеніл)-6-дифеніл-1,2,5-гексатрієн, пара-толуол сульфату). Зонд DPH локалізується в ліпофільній частині мембрани (в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран), а TMA-DPH локалізується в більш полярних областях мембрани (в області полярних головок фосфоліпідів і в області гліцеринових залишків фосфоліпідів). Зонди DPH та TMA-DPH є чутливими до в'язкості їх мікросередовища і мають флуоресценцію в діапазоні 360-480 нм [2]. Для кожного з зондів набору (DPH та TMA-DPH) вимірюють поляризацію флуоресценції, обчислюють величину анізотропії флуоресценції, і, з величини анізотропії флуоресценції судять про в'язкість мікрооточення зонда.

До недоліків цього набору флуоресцентних зондів належать:

- низький рівень флуоресценції зонда DPH, пов'язаного з ліпідними мембранами, оскільки зонд DPH слабо й повільно проникає в мембрани і схильний до агрегації у водних розчинах;
- зонди DPH та TMA-DPH не дозволяють здійснювати моніторинг таких важливих фізико-хімічних властивостей мікросередовища як полярність і здатність до утворення міжмолекулярних водневих зв'язків;
- для виміру поляризації флуоресценції на стандартних спектрофлуориметрах потрібна додаткова установка поляризаторів (ціна набору поляризаторів збудження й емісії складає приблизно 5 000 \$);

Існує набір флуоресцентних зондів, який складається з двох зондів: PYRENE (пірену) та ALK-PYRANINE (8-алкоксипірен-1,3,6-трисульфонової кислоти, тринатрієвої солі) [2]. Набір зондів дозволяє здійснювати моніторинг полярності як в гідрофобній, так і в полярній частинах мембран: зонд PYRENE локалізується в ліпофільній частині мембрани (в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран), а ALK-PYRANINE локалізується в більш полярних областях мембрани (в області полярних головок фосфоліпідів і в області гліцеринових залишків фосфоліпідів). Зонди PYRENE та ALK-PYRANINE мають флуоресценцію в діапазоні 350-430 нм [2].

До основних недоліків цього набору зондів можна віднести такі:

- використаний набір зондів не дозволяє здійснювати моніторинг здатності мікросередовища до утворення міжмолекулярних водневих зв'язків;
- зонди PYRENE та ALK-PYRANINE не дозволяють здійснювати моніторинг змін ліпідного бішару в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля карбонільних груп фосфоліпідів.

Існує набір флуоресцентних зондів, який складається з трьох зондів: PRODAN (6-пропіоніл-2-диметиламінонафталіну), LAURDAN (6-лауроїл-2-диметиламінонафталіну), PATMAN (6-гексадеканоїл-2-(((2-(триметиламоніум)етил)метил)аміно)нафталін хлориду) [3]. Набір зондів дозволяє здійснювати моніторинг полярності, в'язкості і гідратованості в полярній області ліпідного бішару: зонд PRODAN локалізується в області полярних головок фосфоліпідів і в області гліцеринових залишків фосфоліпідів; LAURDAN локалізується в області гліцеринових

залишків фосфоліпідів; PATMAN локалізується в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля карбонільних груп фосфоліпідів. Зонди цього набору мають флуоресценцію в діапазоні 360-610 нм [3].

Недоліком цього набору зондів є те, що зонди PRODAN, LAURDAN і PATMAN не дозволяють здійснювати моніторинг в гідрофобній області ліпідного бішару: в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран.

Існує набір флуоресцентних зондів, який складається з п'ятих зондів, ковалентно зв'язаних з різними атомами вуглецю уздовж алкільних ланцюжків п-антроїлокси жирних кислот (зонди п-AS): 2-AS ((2-(9-антроїлокси)стеаринова кислота), 6-AS ((6-(9-антроїлокси)стеаринова кислота), 9-AS ((9-(9-антроїлокси)стеаринова кислота); 12-AS ((12-(9-антроїлокси)стеаринова кислота; 16-AP (9-антроїлокси)пальмітинова кислота)) [2].

Теоретично, зонди цього набору повинні мати локалізацію відповідно до місця приєднання зондів до алкільних ланцюжків жирних кислот (тобто відповідно до довжини алкільного ланцюжка від карбоксильної групи на поверхні бішару до приєднаного зонда): 2-AS - в області полярних головок фосфоліпідів і в області гліцеринових залишків фосфоліпідів; 6-AS - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп фосфоліпідів; 9-AS - в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів; 12-AS - в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів; 16-AS - в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран.

Набір зондів AS має флуоресценцію в діапазоні 380-560 нм і дозволяє здійснювати моніторинг полярності і в'язкості мікросередовища.

Основним недоліком таких наборів зондів є те, що полярний зонд AS, ковалентно зв'язаний з структурно-нежорсткими алкільними ланцюжками жирних кислот, згинаючи ліпідний ланцюжок здатний зсуватися до поверхні ліпідного бішару, і, таким чином, не дозволяє здійснювати моніторинг в гідрофобній області ліпідного бішару: в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран [1].

Найближчим аналогом за сукупністю суттєвих ознак до набору флуоресцентних зондів, що заявляється, є набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран, у якому параметри флуоресценції зондів залежать від таких параметрів їх оточення, як полярність, в'язкість, здатність утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки. Набір складається з чотирьох флуоресцентних зондів на основі похідних 3-гідроксифлавонолу [4]: F (4'-диметиламіно-3-гідроксифлавонолу), F2N8 (N-(4'-N, N-діетиламіно)-3-гідрокси-6-флавонолу)метил-N, N-диметилоктил амоніум броміду), F4N1 (N-[(4'-N, N-дибутиламіно)-3-гідрокси-6-флавонолу]метил-N, N,N-триметил амоніум броміду), PPZ (4-{4-[4'-(3-гідроксифлавонолу)]піперазино}-1-(3-сульфопропіл)піридиніуму). У мембранах зонди F, F2N8, F4N1, PPZ локалізуються відповідно до ліпофільності (гідрофобності) зондів (в залежності від наявності зарядженої групи та довжини алкільних (або фенільних) ланцюжків) [4]: зонд F - в області полярних головок фосфоліпідів і в області гліцеринових залишків фосфоліпідів; зонд F2N8 - в області полярних головок фосфоліпідів, в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп фосфоліпідів; зонд F4N1 - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів; зонд PPZ - в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів. Зонди цього набору є чутливими до таких параметрів мікросередовища, як полярність, в'язкість, здатність утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки, і мають флуоресценцію у А і Б діапазонах, де А знаходиться в межах 480-535 нм, а Б знаходиться в межах 540-650 нм [4].

Основним недоліком цього набору зондів є те, що жоден з зондів набору не локалізуються в центрі ліпідного бішару мембран і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля центру ліпідного бішару мембран, отже, застосування цих зондів не дозволяє проводити моніторинг фізико-хімічних властивостей в найбільш гідрофобних областях ліпідного бішару.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення набору флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран у всіх областях, в тому числі - в центрі ліпідного бішару мембран і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів біля центру ліпідного бішару мембран.

Поставлена задача вирішується тим, що набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран, у якому параметри флуоресценції зондів залежать від таких параметрів їх оточення, як полярність, в'язкість, здатність утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки, згідно з корисною моделлю, складений з шістьох зондів, кожен з яких має відповідні області локалізації в ліпідному бішарі мембрани: перший зонд, що являє

собою сполуку 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-N(CH₃)₂-феніл)-1,3,4-оксадіазол (зонд D7), локалізується в області полярних головок фосфоліпідів і в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, другий зонд, 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазол (зонд D1), - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, третій зонд, 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (зонд O1O), - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп фосфоліпідів, четвертий зонд, 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол (зонд O6O), - в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів, п'ятий зонд, 2-(2'-ОН-феніл)-9,10-фенантр-1,3-оксазол (зонд PH7), - в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран, шостий зонд, 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол (зонд PH1), - у центрі ліпідного бішару мембран.

Крім того, що зонд, який являє собою сполуку 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол, має флуоресценцію в діапазоні 375-450 нм, а зонди ряду орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу мають флуоресценцію в діапазонах А і Б, де діапазон А знаходиться в межах 370-425 нм, а діапазон Б - в межах 450-600 нм.

Використання набору флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран для визначення фізико-хімічних властивостей біомембран дозволяє:

- здійснювати моніторинг фізико-хімічних властивостей у всіх областях ліпідного бішару мембран;

- точніше встановити локалізацію змін у ліпідному бішарі мембран;

- підвищити достовірність визначення фізико-хімічних властивостей в мембранах за рахунок зіставлення даних для зондів із різною локалізацією у ліпідному бішарі мембран;

Суть корисної моделі підтверджено прикладом.

Приклад: Оцінка впливу інгаляцій ацетону на модельні мембрани.

Флуоресцентні зонди набору (ряд орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу) розчиняли в ацетонітрилі до початкової концентрації кожного із зондів $2 \cdot 10^{-4}$ М. 10 мкл ацетонітрильного розчину зонда додавали до 2,0 мл суспензії ліпідних везикул (розмір везикул в межах 40-50 нм), приготованих з яєчного фосфатидилхоліну (із вмістом ліпиду 2,0 мг/мл) і добавкою 25 молярних відсотків холестерину і 5 мкг/л білка (сироваткового альбуміну). Світлорозсіювання суспензії часток, оцінюване за поглинанням на довжині хвилі 400 нм, знаходилося в межах 0,24-0,25. Кінцева концентрація зонда в суспензії досліджуваних мембран складала $2 \cdot 10^{-6}$ М (молярне відношення ліпід/зонд складало 1000:1). Флуоресцентні зонди інкубували з ліпідними везикулами протягом 60 хв. і реєстрували спектри флуоресценції зондів в області 340-600 нм на спектрофлуориметрі Hitachi F4010 (Японія) при ширині щілин монохроматорів збудження і флуоресценції 5 нм і 5 нм, відповідно, та довжині хвилі збудження 330 нм. Після цього, з отриманих спектрів флуоресценції знаходили значення інтенсивності флуоресценції F_{λ} для зонда D7 на довжині хвилі $\lambda=435$ нм, і значення інтенсивності флуоресценції F_{λ} зонда PH1 на довжині хвилі $\lambda=385$ нм і значення інтенсивностей флуоресценції F_{500} та F_{410} інших зондів набору (D1, O1O, O6O, PH7) на довжинах хвиль 500 нм і 410 нм, відповідно. Для зондів D1, O1O, O6O, PH7 обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції F_{500}/F_{410} . Аналогічні виміри проводили для зразків мембран, що перебували під дією ацетону, знаходили значення інтенсивності флуоресценції для D7 на 435 нм, значення інтенсивності флуоресценції для PH1 на 385 нм, значення інтенсивностей флуоресценції інших зондів (D1, O1O, O6O, PH7) при 410 і 500 нм й обчислювали відношення інтенсивностей флуоресценції F_{500}/F_{410} . За різницею відповідних величин інтенсивностей флуоресценції D7, PH1 і відповідних величин відношень F_{500}/F_{410} зондів D1, O1O, O6O, PH7 для контрольних мембран і мембран, що перебували під дією ацетону, оцінювали порушення структури мембран і локалізацію цих змін у ліпідному бішарі мембран. Отримані результати фіксували в табл. 1 і табл. 2. Для оцінки дії пари ацетону використовувалися мембрани, заздалегідь поміщені на 1 годину в насичену пару ацетону в герметичній скляній посудині (2 мл розчинника випарювали в 1 л об'єму з чашки Петрі діаметром 90 мм протягом 15-20 хв.). Суспензія модельних мембран перебувала під дією насиченої пари ацетону протягом однієї години.

Таблиця 1

Інтенсивності флуоресценції (F_λ) зондів D7 і PH1, зв'язаних з модельними мембранами, що перебували під дією ацетону, і з контрольними модельними мембранами

Зонд	λ , нм	F_λ , умовні одиниці	
		контроль	ацетон
D7	435	153	154
PH1	385	2277	2286

Таблиця 2

Відношення F_{500}/F_{410} зондів D1, O1O, O6O, PH7, зв'язаних з модельними мембранами, що перебували під дією ацетону, і з контрольними модельними мембранами

Зонд	F_{500}/F_{410}	
	контроль	ацетон
D1	8,2	8,2
O1O	13,1	6,0
O6O	9,8	9,5
PH7	3,4	3,4

- Зменшення величини відношення F_{500}/F_{410} зонда O1O (2,5-діарил-1,3-оксазолу) для мембран, що перебували під дією полярного, здатного до утворення водневих зв'язків розчинника - ацетону, свідчить про збільшення протоноакцепторної здатності й полярності його мікрооточення в мембрані. Зважаючи на відсутність значних змін величин інтенсивностей флуоресценції зондів D7 і PH1 і величин відношень F_{500}/F_{410} зондів D1, O6O, PH7, зміну мікрооточення зонда O1O було віднесено до накопичення ацетону в зоні локалізації зонда O1O - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп фосфоліпідів.

- Як впливає з прикладу, запропонований набір зондів дозволяє здійснити моніторинг полярності, в'язкості та здатності утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки у всіх областях ліпідного бішару мембран.

Джерела інформації:

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М.: Наука, 1980-320 с
2. Valeur B. Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters, in Molecular Luminescent Spectroscopy, Part 3. Edited by Schulman S.G. Chemical Analysis Series. Springer Verlag: NY, 1993. Vol. 77-p. 25-83.
3. K. Rieber, J. Sykora, A. Olzyska, R. Jelinek, G. Cevc, M. Hof. The use of solvent relaxation technique to investigate headgroup hydration and protein binding of simple and mixed phosphatidylcholine/surfactant bilayer membranes // Biochimica et Biophysica Acta.-2007. - Vol. 1768-P. 1050-1058
4. Klymchenko A.S., Duportail G., Ozturk T., Pivovarenko V.G., Mely Y., Demchenko A.P. Novel two-band ratiometric fluorescence probes with different location and orientation in phospholipid membranes // Chemistry & Biology, -2002. - Vol. 9. - P. 1199-1208.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран, у якому параметри флуоресценції зондів залежать від таких параметрів їх оточення, як полярність, в'язкість, здатність утворювати міжмолекулярні водневі зв'язки, який **відрізняється** тим, що складений з шістьох зондів, кожен з яких має відповідні області локалізації в ліпідному бішарі мембрани: перший зонд, що являє собою сполуку 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-N(CH₃)₂-феніл)-1,3,4-оксадіазол (зонд D7), локалізується в області полярних головок фосфоліпідів і в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, другий зонд, 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3,4-оксадіазол (зонд D1), - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів, третій зонд, 2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол (зонд O1O), - в області гліцеринових залишків фосфоліпідів і в області карбонільних груп фосфоліпідів, четвертий зонд, 2-(2'-ОН-феніл)-5-(4'-феніл-феніл)-1,3-оксазол (зонд O6O), - в області карбонільних груп фосфоліпідів і в області метиленових

ланцюжків фосфоліпідів, п'ятий зонд, 2-(2'-ОН-феніл)-9,10-фенантр-1,3-оксазол (зонд РН7), - в області метиленових ланцюжків фосфоліпідів і в центрі ліпідного бішару мембран, шостий зонд, 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол (зонд РН1), - у центрі ліпідного бішару мембран.

2. Набір за п. 1, який **відрізняється** тим, що зонд, який являє собою сполуку 2-феніл-9,10-фенантр-1,3-оксазол, має флуоресценцію в діапазоні 375-450 нм, а зонди ряду орто-гідроксипохідних 2,5-діарил-1,3,4-оксазолу і 2,5-діарил-1,3,4-оксадіазолу мають флуоресценцію в діапазонах А і Б, де діапазон А знаходиться в межах 370-425 нм, а діапазон Б - в межах 450-600 нм.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601