

Μελέτη Δυναμικών Ιδιοτήτων Βιοδραστικών Μορίων σε Μεμβράνες με Χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Υψηλής Διαχωριστικότητας

Θωμάς Μαυρομούστακος*, Ευθυμία Θεοδωροπούλου, Αλέξανδρος Μακρουγιάννης

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας,
Βασιλέως Κωνσταντίνου 48, Αθήνα 11653

Περίληψη: □ Στη δημοσίευση αυτή γίνεται χρήση των τεχνικών Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) υψηλής διαχωριστικότητας με περιστροφή δείγματος υπό μαγική γωνία (MASS-Magic Angle Sample Spinning) και συνδυασμός διασταυρωμένης πολικότητας (Cross Polarization) με MASS για τη μελέτη δυναμικών ιδιοτήτων μορίων σε φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν οι δυναμικές ιδιότητες του αναισθητικού στεροειδούς αλφαξαλόνη, το οποίο στη συνέχεια συγκρίθηκε με το χημικά συγγενές του Δ^{16} -αλφαξαλόνη που στερείται τέτοιων ιδιοτήτων στη λιπιδική διπλοστοιβάδα της διπαλμιτικής φωσφατιδυλ-γλυκερινοφωσφοχολίνης (DPPC). Τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής είναι τα ακόλουθα: Αρχικά, τα δύο στεροειδή εισέρχονται μέσα στη μεμβράνη DPPC και αλληλεπιδρούν μ' αυτή. Το δραστικό όμως στεροειδές τη ρευστοποιεί περισσότερο από ότι το μη δραστικό σε όλο το υδροφοβικό της μέρος τόσο στη στερεή όσο και στην υγρή κρυσταλλική φάση. Τα δύο μόρια αυξάνουν την περιοχή θερμοκρασιών όπου συνυπάρχουν οι δύο φάσεις (στερεά και υγρή κρυσταλλική). Τέλος, το βιολογικά δραστικό μόριο της αλφαξαλόνης σε αντίθεση με το μη δραστικό μόριο της Δ^{16} -αλφαξαλόνης, προκαλεί σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στη δομή της DPPC.

1. Εισαγωγή

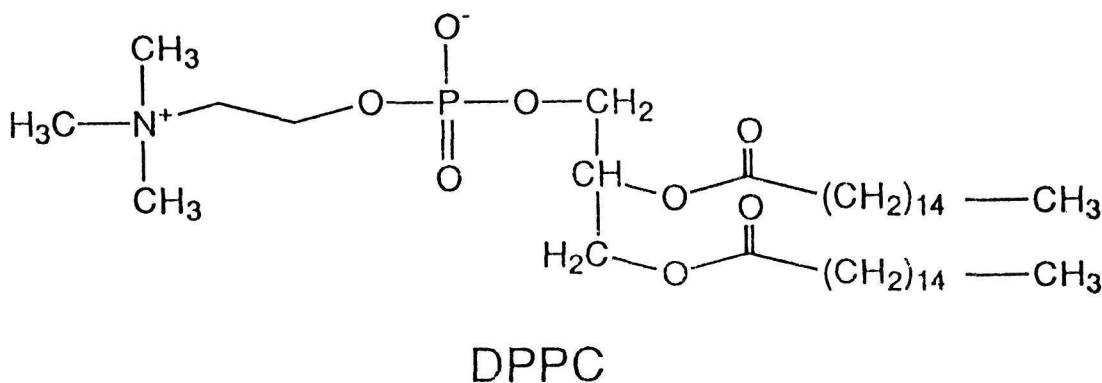
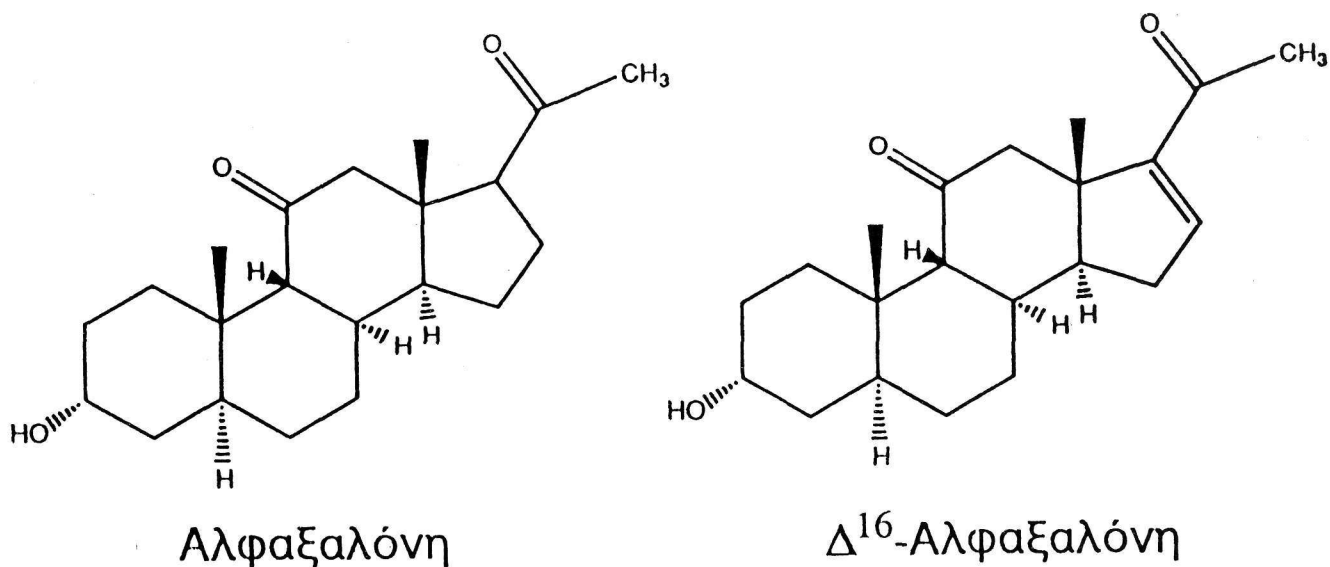
Η λήψη φασμάτων ^{13}C -NMR στερεής φάσης υψηλής διαχωριστικότητας παρουσιάζει δύο κύρια προβλήματα: (α) χαμηλή διαχωριστικότητα λόγω της χημικής ανισοτροπίας (chemical anisotropy) που είναι υπεύθυνη για την διεύρυνση του φασματικού εύρους

(linewidth) των κορυφών, το οποίο είναι της τάξεως αρκετών KHz και (β) χαμηλή ευαισθησία λόγω της μικρής φυσικής αφθονίας του πυρήνα ^{13}C (~1%). Η πρώτη μέθοδος, MASS, χρησιμοποιεί παλμικό NMR σε συνδυασμό με περιστροφή του δείγματος με υψηλή συχνότητα και υπό γωνία $54^\circ 44'$ σχετικά με το μαγνητικό πεδίο. Η γωνία αυτή καλείται «μαγική» γιατί εξαιλεί τη «χημική ανισοτροπία».

Συνδυασμός MASS με την τεχνική «διασταυρωμένης πολικότητας» (Cross Polarization) αυξάνει περισσότερο την ευαισθησία λήψης φάσματος γιατί με την τεχνική αυτή μεταφέρεται η πολικότητα του σε αφθονία πυρήνα του ^1H , στον πυρήνα ^{13}C που βρίσκεται σε λιγότερη αφθονία. Η τεχνική που χρησιμοποιεί συνδυασμό MASS και CP ονομάζεται CP/MASS^{1,2}.

Το εργαστήριο μας είναι εξοπλισμένο με Φασματογράφο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού τύπου MSL 400 MHz της εταιρείας Bruker που φέρει μονάδα για πειράματα MASS σε στερεά δείγματα. Τα δείγματα που μελετήσαμε ήταν λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Σε αυτές ενσωματώσαμε αναισθητικά στεροειδή μόρια που πιστεύεται ότι δρουν σε επίπεδο μεμβρανών³. Συγκεκριμένα μελετήσαμε την αλφαξαλόνη και τη Δ^{16} -αλφαξαλόνη που η δομή τους δείχνεται στο Σχήμα 1. Η αλφαξαλόνη είναι ένα αναισθητικό στεροειδές του οποίου ο πενταμελής δακτύλιος εκτείνεται ελαφρά έξω από το επίπεδο των άλλων τριών κυκλοεξανικών δακτυλίων. Η Δ^{16} -αλφαξαλόνη, είναι βιολογικά αδρανές μόριο και έχει ένα διπλό δεσμό στην 16 θέση, με αποτέλεσμα, ο πενταμελής της δακτύλιος να είναι συνεπίπεδος με τους υπόλοιπους τρεις κυκλοεξανικούς δακτυλίους^{4,5}.

*Αλληλογραφία



Σχήμα 1. Χημικές δομές της DPPC, αλφαξαλόνης και Δ^{16} -αλφαξαλόνης.

Τα προαναφερθέντα μόρια επιλέχθηκαν για δύο λόγους: (α) Έχουμε ήδη χρησιμοποιήσει αρκετές μεθόδους για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων αυτών των μορίων σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Συνεπώς χρήση CP/MASS θα επιβεβαίωνε και θα συμπλήρωνε προηγούμενα μας αποτελέσματα⁷⁻¹³. (β) Η έλλειψη αρκετών βιβλιογραφικών δεδομένων για φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις μορίων σε επίπεδο μεμβρανών με χρήση τη συγκεκριμένης τεχνικής θα δυσχέραινε την επεξήγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων με χρήση άγνωστων μορίων που δεν έχουν μελετηθεί με άλλες βιοφυσικές μεθόδους.

Η εισαγωγή των φαρμάκων στις λιπιδικές μεμβράνες προκάλεσε τις ακόλουθες αλλαγές στο φάσμα ^{13}C της λιπιδικής διπλοστοιβάδας: (α) Μεταβολές στις εντάσεις και στο φασματικό εύρος των κορυφών και

(β) Εμφάνιση νέων κορυφών λόγω της παρουσίας τους και (γ) Μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων των κορυφών⁶.

Αυτές οι αλλαγές μπορούν να ερμηνευθούν σαν (α) αλλαγές των θερμοτροπικών ιδιοτήτων των λιπιδίων που προκαλούνται παρουσία φαρμάκων (β) ευελιξία των φαρμάκων μέσα στις μεμβράνες και (γ) αλλαγές στη διαμόρφωση του λιπιδίου λόγω της παρουσίας του φαρμακευτικού μορίου.

Σαν τεχνητές μεμβράνες χρησιμοποιήσαμε τις διπλοστοιβάδες DPPC (Σχήμα 1), φωσφολιπίδιο που έχει μελετηθεί εκτεταμένα με βιοφυσικές μεθόδους. Σε υδατικό περιβάλλον σχηματίζει αυθόρμητα διαλυτοποιημένες μεμβράνες και συναντάνται σε δύο μεσομορφικές φάσεις γνωστές σαν Lβ' και La. Η φάση Lβ' καλείται στερεή φάση και αναφέρεται σε χαμηλές

θερμοκρασίες, όπου τα φωσφολιπίδια διατάσσονται σε ημικρυσταλλικό πήκτωμα (gel) και είναι σχετικά ακίνητα. Η La (υγρή κρυσταλλική φάση) προκύπτει όταν το λιπίδιο βρίσκεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες, όπου γίνεται ένας μετασχηματισμός (θερμοκρασία μετασχηματισμού = Tc) κατά τον οποίο το υδρόφοβο μέρος της, δύο αλκυλικές μη πολικές αλυσίδες, αποκτούν μεγαλύτερη κινητικότητα. Στην DPPC ο μετασχηματισμός αυτός γίνεται στους 41.2°C όπως μελετήθηκε από Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC - Differential Scanning Calorimetry) και συνοδεύεται από δημιουργία ισομερών λόγω περιστροφής γύρω από τους C-C δεσμούς (trans: gauche)¹⁴⁻¹⁶. Σύμφωνα με τα δεδομένα φασματοσκοπίας στην περιοχή των 35°C, όπου στην Διαφορική Θερμιδομετρία παρουσιάζεται ένα μικρής ενθαλπίας ενδοθερμικό γεγονός, συνυπάρχουν και οι δύο φάσεις^{17,18}.

Πειραματικό Μέρος

Η παρασκευή των φωσφολιπιδικών τεχνητών μεμβρανών με ή χωρίς το στεροειδές έγινε ως εξής. Κατάλληλη ποσότητα φωσφολιπιδίου της DPPC (με ή χωρίς την προσθήκη μοριακής αναλογίας $\chi=0.20$ στεροειδούς) διαλύθηκε σε χλωροφόρμιο υψηλής καθαρότητας. Ο διαλύτης μετά εξατμίστηκε με ρεύμα N₂ απαλλαγμένου από οξυγόνο στους 50° C. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα όπου εφαρμόστηκε με αντλία υψηλό κενό για 12 ώρες. Στο ξηρό μίγμα προστέθηκε απεσταγμένο και απιονισμένο 50% (w / w) νερό για να παραχθούν φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες. Αυτές στροβιλίσθηκαν (vortex) για την καλύτερη διάχυση του νερού. Τέλος, εισήχθησαν σε περιστροφείς ZrO₂.

Τα φάσματα ¹³C-NMR των μεμβρανών ελήφθησαν στη συχνότητα των 100.63 MHz με χρήση φασματογράφου Bruker MSL 400 MHz ικανού για υψηλής ισχύος αποσύζευξη (high power decoupling) των πρωτονίων και εφοδιασμένου με μονάδα MASS. Ο ρυθμός περιστροφής των δειγμάτων ήταν 2.9 KHz και διατηρήθηκε σταθερός στους 25-43° C. Οι κυριότερες πειραματικές παράμετροι λήψης φάσματος ήταν: Παλμός 90° για τα πρωτόνια = 5.3 μs, χρόνος παρατήρησης φθίνουσας επαγόμενης ταλάντωσης (FID) 30 ms, χρόνος αποδιέγερσης (recycle delay), 4s, αριθμός δεδομένων (data points) 832 W, μέγεθος δεδομένων (size) 16 K και χρόνος επαφής (contact time) = 1ms για τα πειράματα ¹³CP/MASS.

Το φάσμα ¹³C-NMR της DPPC σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ελήφθη επίσης σε φασματογράφο Bruker 400 MHz. Το φάσμα της Δ¹⁶ - αλφαξαλόνης λήφθηκε σε φασματογράφο AC 300 MHz στην συχνότητα των 75.47 MHz. Οι κυριότερες παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Παλμός 90° άνωθακα 6.0 μs,

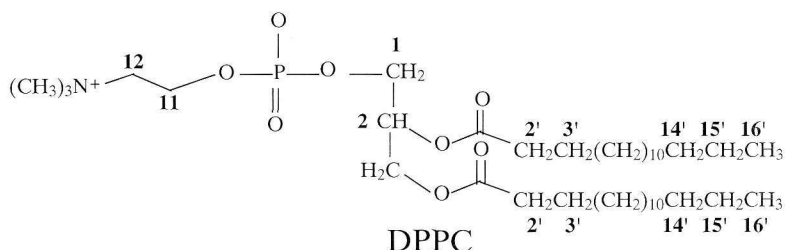
ισχύς αποσύζευξης = 21 dB, χρόνος αποδιέγερσης = 1s, αριθμός δεδομένων 16 K και μέγεθος δεδομένων 16 K. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με πολλαπλασιασμό της FID με εκθετική συνάρτηση σταθεράς 1.2 Hz (line broadening).

Για την εκτέλεση όλων των προαναφερθέντων πειραμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα που συμπεριλαμβάνονται στο λογισμικό των φασματογράφων.

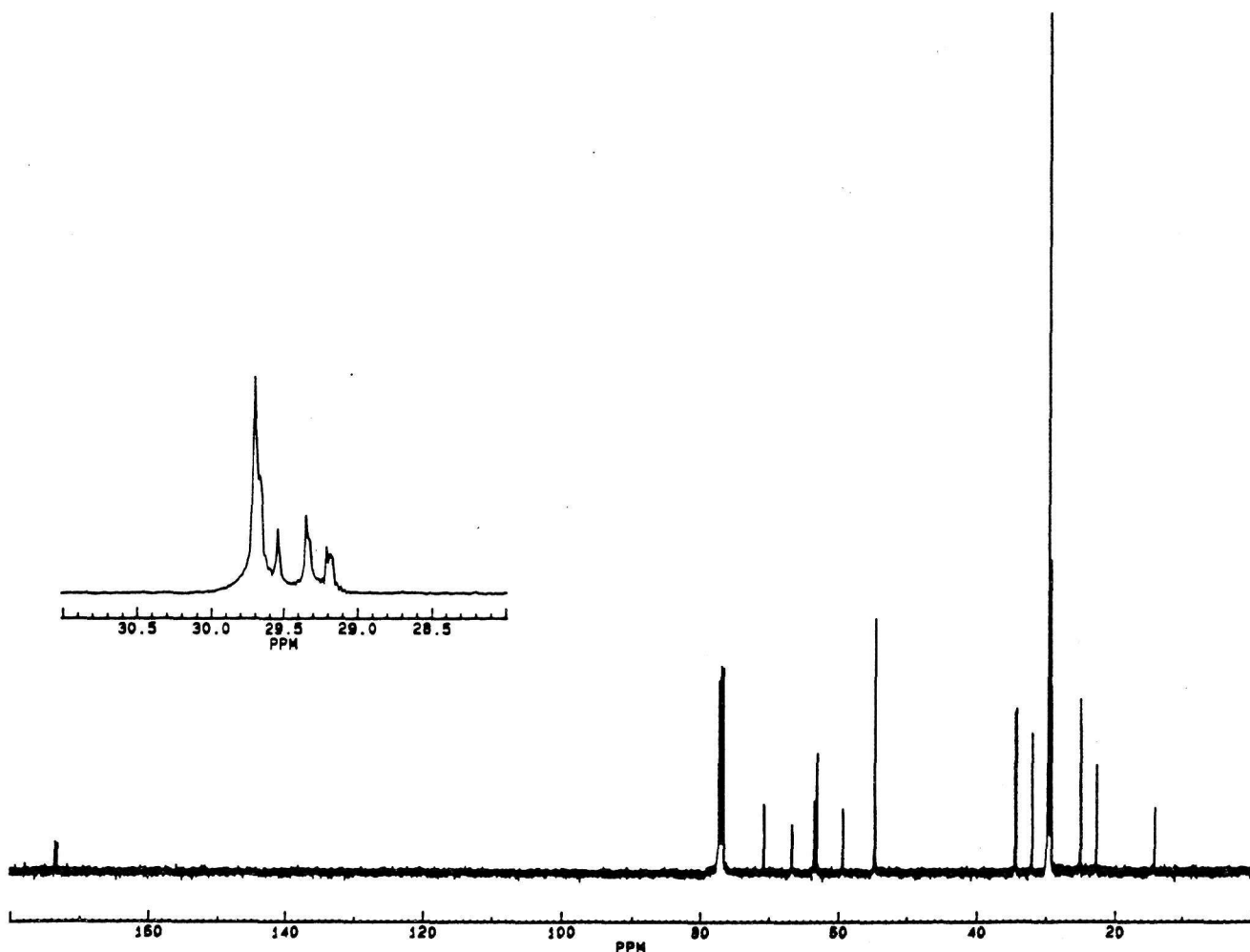
Μέθοδοι και Αποτελέσματα

Στο Σχήμα 2 εμφανίζεται το φάσμα ¹³C της DPPC σε διαλύτη CDCl₃. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε συχνότητα 400 MHz. Η ταυτοποίηση των κορυφών της που δείχνεται στον Πίνακα 1 έγινε με σύγκριση βιβλιογραφικών δεδομένων του ίδιου λιπιδίου¹⁹. Λόγω του υψηλότερου χρησιμοποιημένου πεδίου έχουν παρατηρηθεί περισσότερες κορυφές στην υδροφοβική περιοχή. Αυτές ταυτοποιήθηκαν κατ' αναλογία με άλλα λιπίδια από βιβλιογραφικά δεδομένα^{20,21}.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΟΡΥΦΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ¹³C-NMR ΤΗΣ DPPC ΣΕ CDCl₃ ΣΤΟΥΣ 298 K



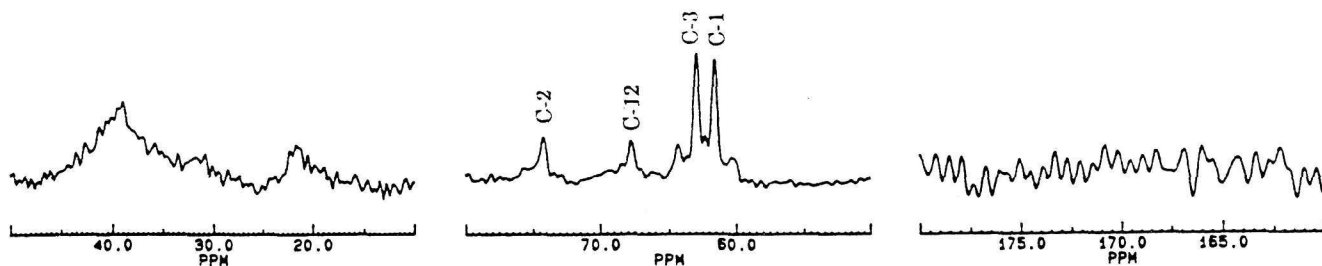
Ατομο C	Χημική μετατόπιση (ppm)
C=O (OCH)	173.5
C=O (OCH ₂)	173.2
C-1	63.1
C-2	70.7
C-3	63.5
C-11	56.3
C-12	66.7
N(CH ₃) ₃	54.6
(CH ₂) ₇	29.7
2'-CH ₂	34.2
3'-CH ₂	25.0
5'-CH ₂	29.2
6'-CH ₂	29.5
13'-CH ₂	29.4
14'-CH ₂	31.9
15'-CH ₂	22.7
16'-CH ₃	14.0



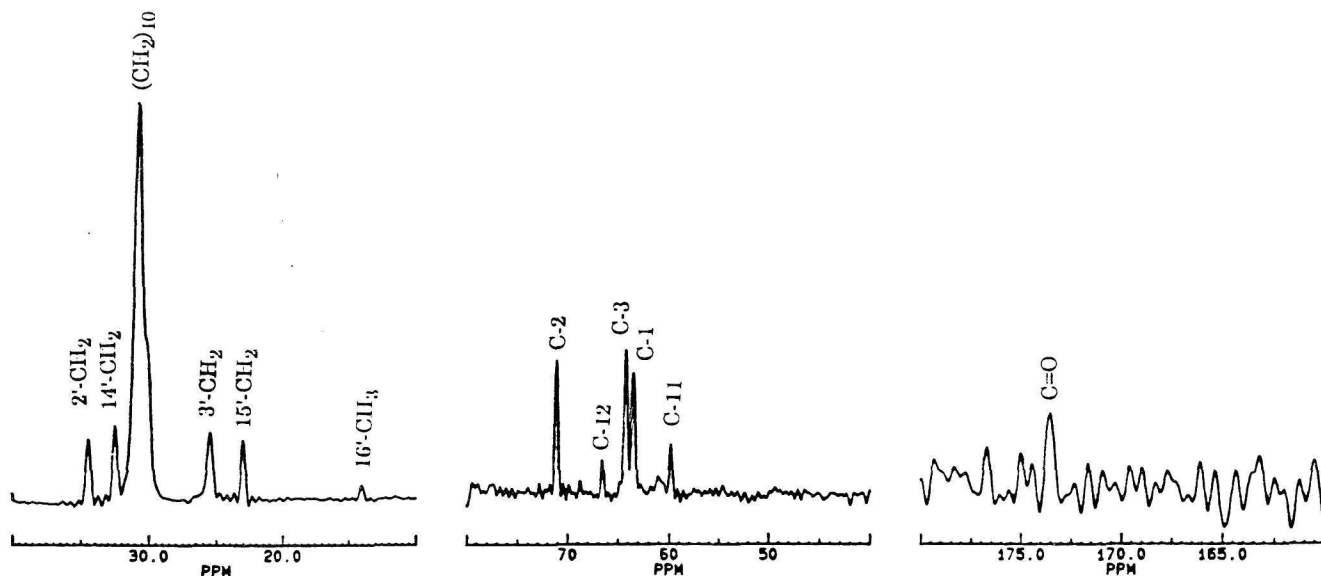
Σχήμα 2: Φάσμα ^{13}C της DPPC σε CDCl_3 που λήφθηκε στους 25°C .

Στο Σχήμα 3 δείχνεται φάσμα ^{13}C στους 43°C διπλοστοιβάδας DPPC που ελήφθη με την τεχνική MASS. Επειδή οι εντάσεις των κορυφών ποικίλλουν στις διάφορες περιοχές του μορίου, τις έχουμε χωρίσει σε τρεις περιοχές. Από 10-40 ppm (υδροφοβική περιοχή), 40-80 ppm (γλυκερολικός σκελετός, πολική κεφαλή), 160-190 ppm (περιοχή καρβονυλικών ομάδων). Το ίδιο έχουμε κάνει για το φάσμα ^{13}C στους 43°C της διπλοστοιβάδας DPPC που ελήφθη με την τεχνική CP/MASS και δείχνεται στο Σχήμα 4. Μια απλή σύγκριση μεταξύ των τριών φασμάτων δείχνει ότι:

(α) Συνδυασμός των δύο τεχνικών CP/MASS σε ένα ανισοτροπικό περιβάλλον όπως αυτό των μεμβρανών δίνει φάσματα χαμηλότερης διαχωριστικότητας συγκριτικά με αυτή που επιτυγχάνεται σε υγρούς διαλύτες. (β) Σαφώς η χρήση CP αυξάνει την ευαισθησία και δίνει μεγαλύτερο αριθμό κορυφών στην περίπτωση της DPPC. Θα δείξουμε όμως παρακάτω ότι αυτός δεν είναι ο κανόνας και πολλές φορές είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν και οι δύο μέθοδοι γιατί δίνουν συμπληρωματικά αποτελέσματα.



Σχήμα 3: Φάσμα λιπιδικής διπλοστοιβάδας της DPPC που λήφθηκε στους 43.5°C με την τεχνική MASS.

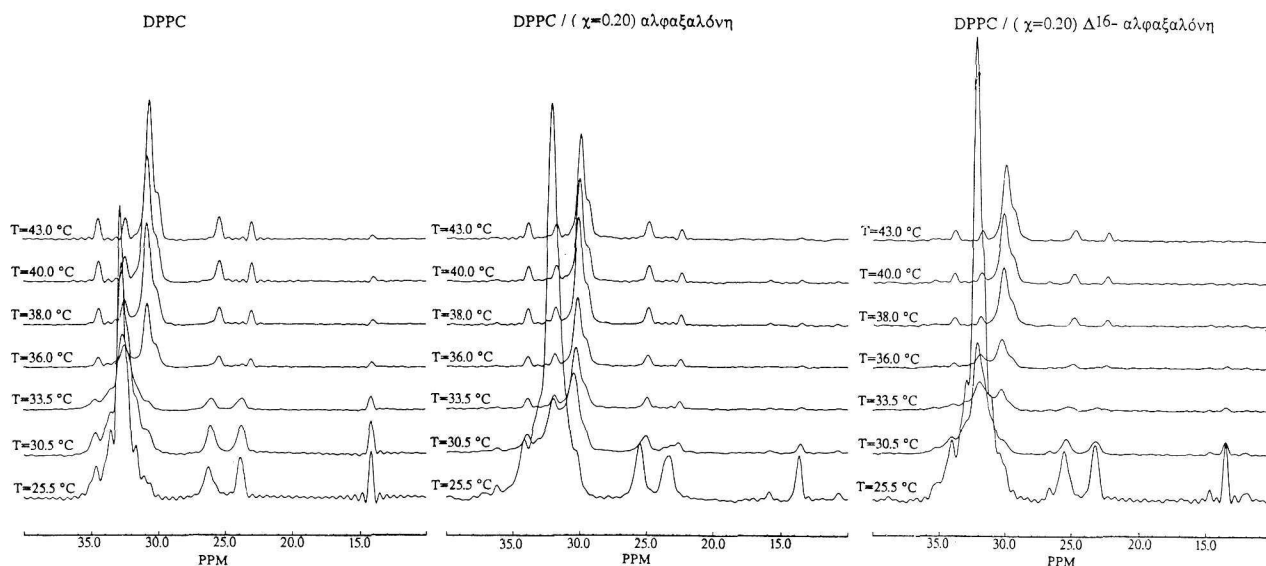


Σχήμα 4: Φάσμα λιπιδικής διπλοστοιβάδας της DPPC που λήφθηκε στους 43 °C με την τεχνική CP/MAS.

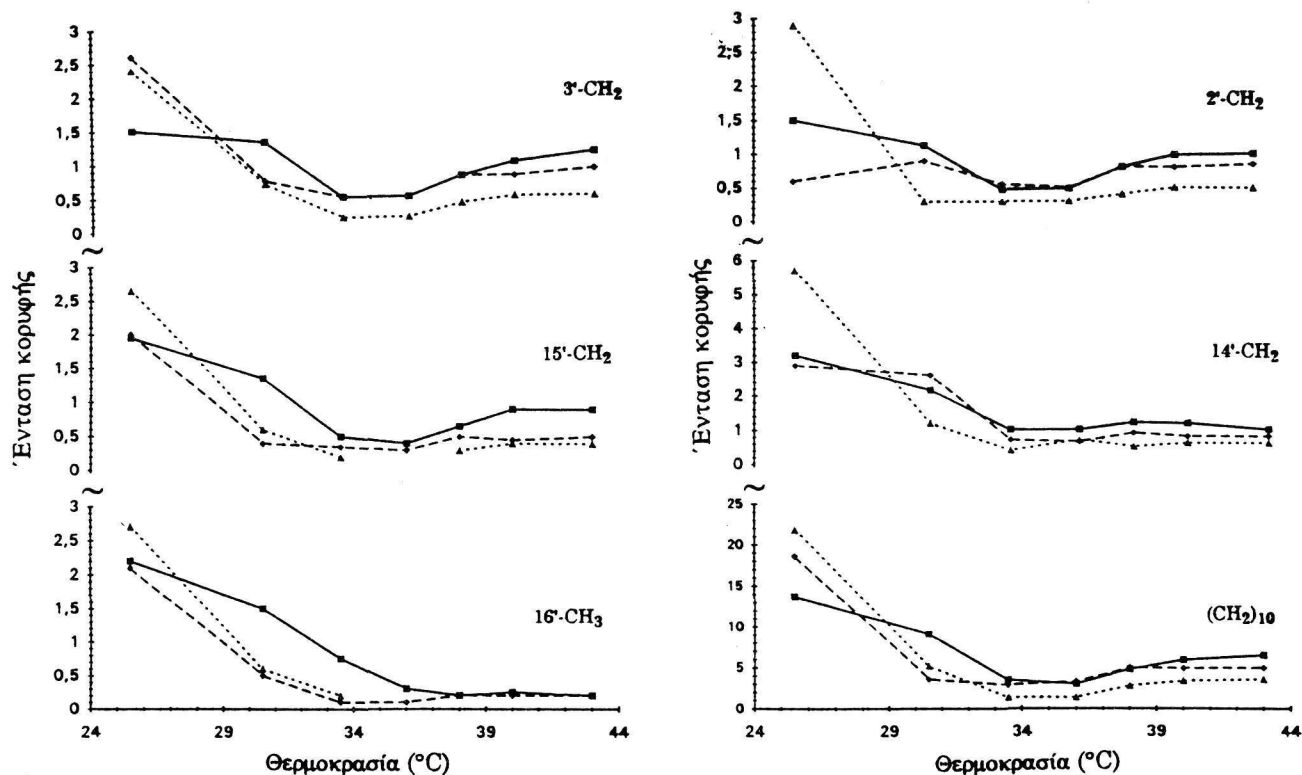
Στο Σχήμα 5 συγκρίνεται η υδροφοβική περιοχή των φασμάτων των παρασκευασμάτων DPPC, DPPC + αλφαξαλόνη σε μοριακή αναλογία ($\chi=0.20$) και DPCC + Δ^{16} -αλφαξαλόνη σε μοριακή αναλογία ($\chi=0.20$) στην περιοχή θερμοκρασιών 25°C-43°C. Η παρουσία στεροειδούς μέσα στις μεμβράνες προκαλεί σημαντικές μεταβολές στις (α) εντάσεις κορυφών (β) στις χημικές μετατοπίσεις και πλάτος των φασματικών γραμμών και (γ) εμφάνιση νέων κορυφών λόγω της παρουσίας τους⁶.

(I) Μεταβολές στις Εντάσεις Κορυφών

Οι εντάσεις των κορυφών της DPPC ελαττώνονται αισθητά στους 33,5°C και επανακτούν την ένταση τους μερικώς πάνω από τους 38°C. Η παρουσία στεροειδούς επιδρά έτσι, ώστε οι εντάσεις της DPPC να ελαττώνονται στη χαμηλότερη θερμοκρασία των 30,5°C. Το παραπάνω αποτέλεσμα ισχύει για όλη την υδροφοβική περιοχή όπως δείχνονται στα διαγράμματα του Σχήματος 6.



Σχήμα 5. Σύγκριση ^{13}C -CP/MAS φασμάτων των DPCC, DPPC/($\chi=0.20$) αλφαξαλόνη, DPCC / ($\chi=0.20$) Δ^{16} -αλφαξαλόνη, της υδροφοβικής περιοχής σε περιοχή θερμοκρασιών 25,5 °C-43°C



Σχήμα 6. Σύγκριση εντάσεων των κορυφών των φασμάτων DPPC (■), DPPC / ($\chi=0.20$) αλφαξαλόνη (◆), και DPPC / ($\chi=0.20$) Δ^{16} -αλφαξαλόνη (▲), των ανθράκων της υδροφοβικής περιοχής του φωσφολιπιδίου σε περιοχή θερμοκρασιών 25,5°C-43°C.

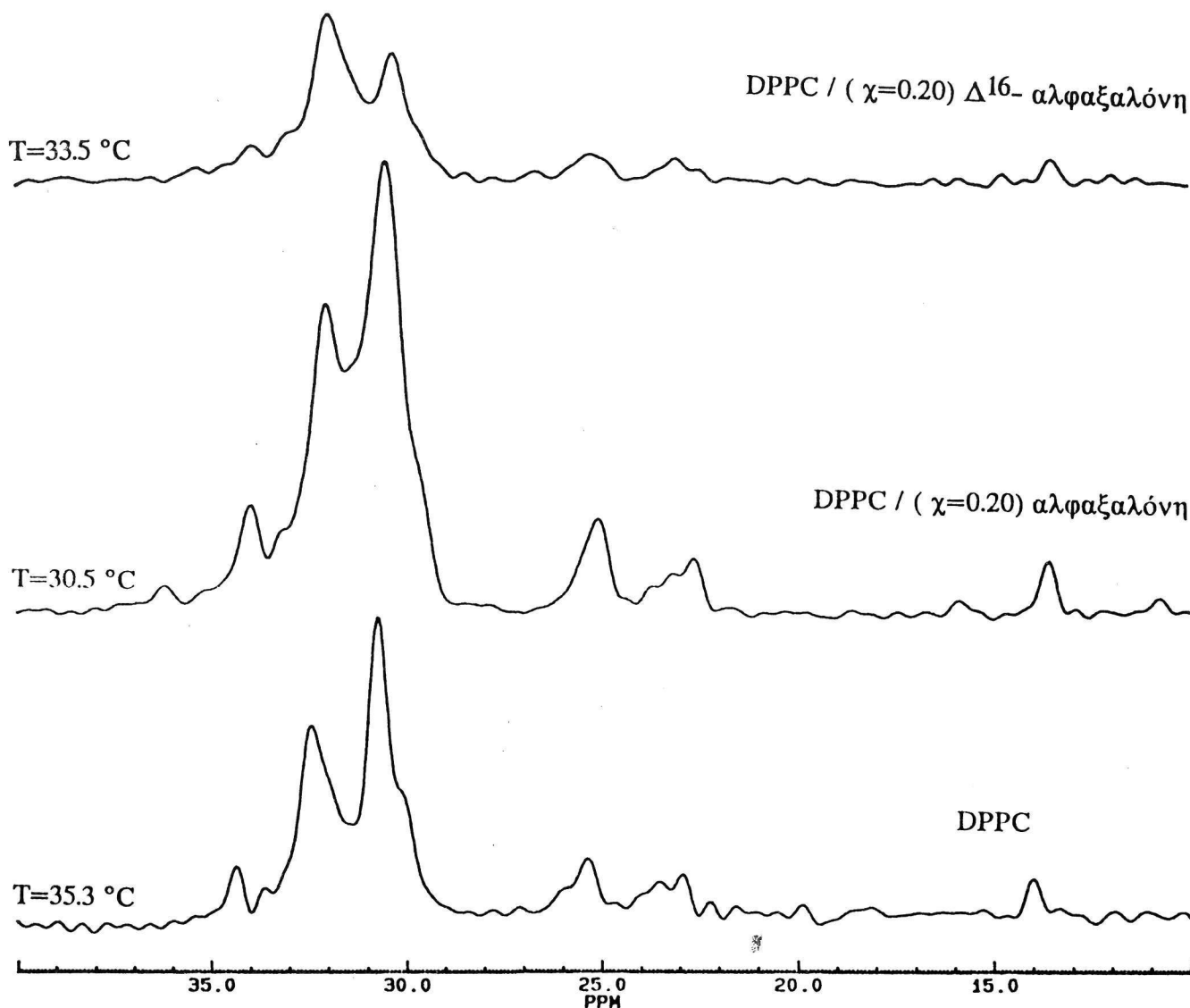
Η μερική ανάκτηση γίνεται στη ίδια θερμοκρασία και για τα τρία παρασκευάσματα. Αυτό δηλώνει ότι η παρουσία στεροειδούς χαμηλώνει τη θερμοκρασία δημιουργίας περιοχών με δύο φάσεις (στερεή και υγρή). Το γεγονός ότι σε αυτή την περιοχή θερμοκρασιών υπάρχουν τουλάχιστο δύο φάσεις φαίνεται και από την αλληλεπικάλυψη κορυφών (DPPC στους 35,3°C, DPPC + αλφαξαλόνη στους 30,5°C και DPPC + Δ^{16} -αλφαξαλόνη 33,5°C) (Σχήμα 7).

Διάφοροι συσχετισμοί υπάρχουν και μεταξύ των εντάσεων των κορυφών. Μεταξύ 22-27 ppm στους 25,5°C τόσο στην διπλοστοιβάδα DPCC όσο και σ' αυτή που περιέχει Δ^{16} -αλφαξαλόνη, η κορυφή στα ppm είναι μεγαλύτερης εντάσεως απ' αυτή στα 27 ppm. Όμως στο παρασκεύασμα που περιέχει αλφαξαλόνη η αναλογία αντιστρέφεται και η κορυφή που συντονίζεται στα 22 ppm έχει μικρότερη ένταση σχετικά μ' αυτή που συντονίζεται στα 27 ppm και που εμφανίζει επίσης στενότερο φασματικό εύρος. Οι αλλαγές αυτές στις εντάσεις των κορυφών μεταξύ των δύο παρασκευασμάτων δείχνουν τη διαφορετική ρευστότητα και κινητικότητα των δύο ατόμων που αντιστοιχούν στις πιο πάνω κορυφές.

II) Χημικές μετατοπίσεις

Η μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων των κορυφών της υδροφοβικής περιοχής σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, δείχνεται στα διαγράμματα του Σχήματος 8. Τέτοιες βαθμιαίες αλλαγές της χημικής μετατόπισης δίνουν πληροφορίες για τη μετάβαση φάσης του φωσφολιπιδίου παρουσία ή απουσία στεροειδούς²². Η μετάβαση φάσης γίνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες παρουσία του δραστικού στεροειδούς της αλφαξαλόνης συγκριτικά με τα άλλα δύο παρασκευάσματα. Η μετάβαση φάσεως συμβαίνει βαθμιαία και κατά συνέπεια γίνεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών στην περίπτωση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας που περιέχει το αναισθητικό στεροειδές αλφαξαλόνη. Στη DPPC διπλοστοιβάδα ή εκείνη που περιέχει το μη δραστικό στεροειδές Δ^{16} -αλφαξαλόνη η μετάβαση φάσεως γίνεται με όμοιο τρόπο και σε μικρό εύρος θερμοκρασιών. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες η μεμβράνη που περιέχει την αλφαξαλόνη είναι περισσότερο ρευστή. Πάνω από τη θερμοκρασία μετασηματισμού του φωσφολιπιδίου (412°C) όλα τα παρασκευάσματα έχουν παρόμοια ρευστότητα.

Εκτελέσαμε πειράματα στους 43°C των δύο στερο-



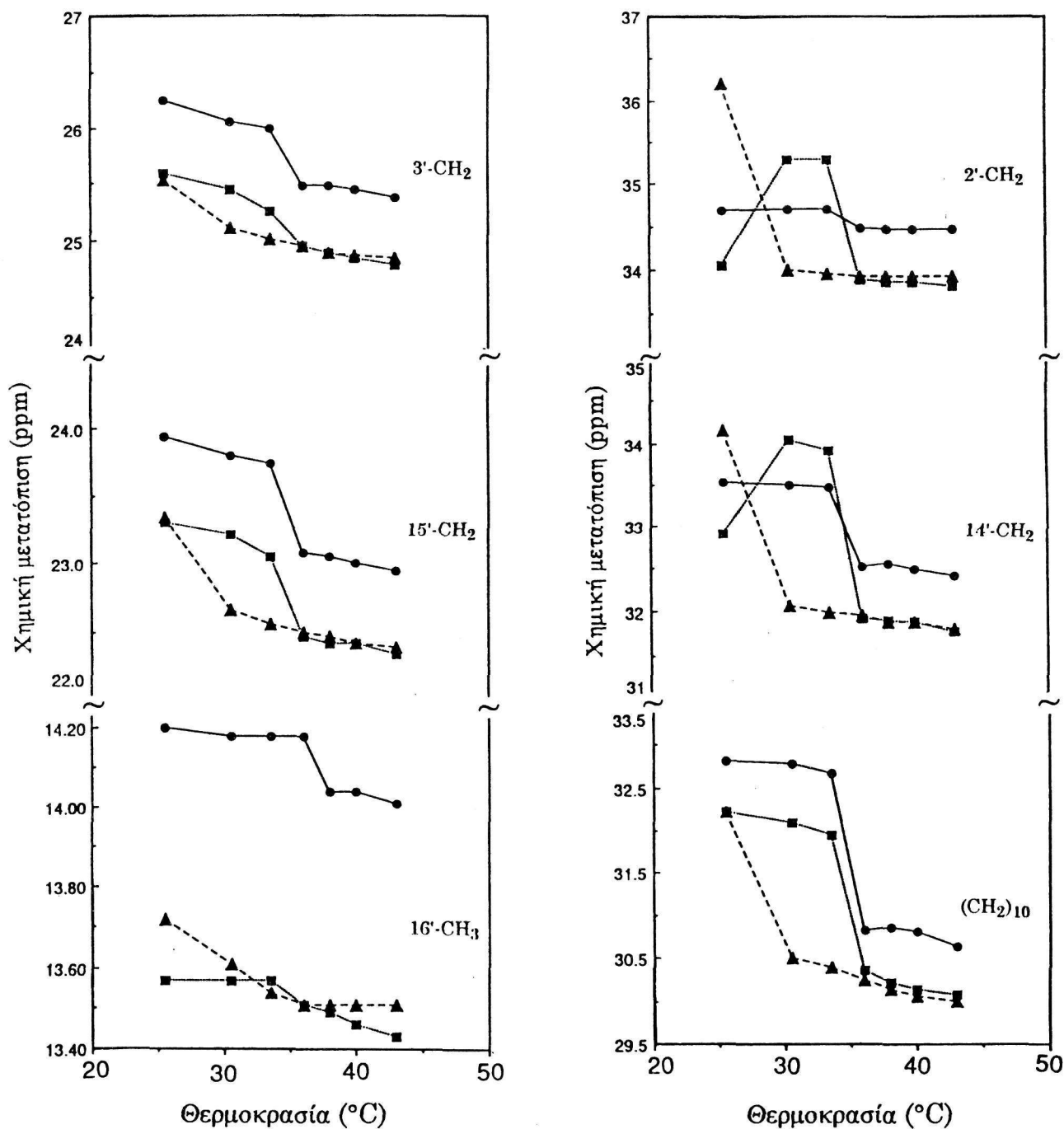
Σχήμα 7. Φάση προσχηματισμού των λιπιδικών διπλοστοιβάδων DPPC, DPPC / ($\chi=0.20$) αλφαξαλόνη και DPPC / ($\chi=0.20$) Δ^{16} -αλφαξαλόνη.

ειδών χωρίς την χρήση τεχνικής CP στην ίδια περιοχή. Παρατηρήσαμε ότι το φάσμα της DPPC είναι παρόμοιο με αυτό που περιέχει Δ^{16} -αλφαξαλόνη. Η παρουσία όμως της αλφαξαλόνης αναδιοργανώνει τη μεμβράνη και παρουσιάζει ένα φάσμα που μοιάζει με αυτό των υγρών.

Έτσι παρόλο που με την τεχνική της CP/MASS δεν παρατηρήσαμε ουσιαστικές διαφορές μεταξύ των τριών παρασκευασμάτων στην υγρή φάση, εν τούτοις με τη απλή τεχνική της MASS αποδεικνύεται ότι οι μεμβράνες έχουν διαφορετική ρευστότητα και σ' αυτή τη φάση. Δυστυχώς η τεχνική της MASS δεν δίνει υψηλής διαχωριστικότητας φάσματα κάτω από τη θερμοκρασία μετασχηματισμού του φωσφολιπιδίου. Αυτό περιορίζει τη δυνατότητα να ληφθούν επιπρόσθετες πληροφορίες στη στερεή φάση.

(III) Εμφάνιση νέων κορυφών

Η παρουσία του φαρμακευτικού μορίου όταν εισχωρεί στις μεμβράνες μπορεί να παρατηρηθεί με τις καινούριες κορυφές που εμφανίζονται στα φάσματα λόγω της εισδοχής του. Διαλέξαμε να δείξουμε σαν παράδειγμα την περιοχή της κεφαλής 40-80 ppm της DPPC απουσία ή παρουσία στεροειδούς (αλφαξαλόνης ή Δ^{16} -αλφαξαλόνης) που φαίνεται στο Σχήμα 9. Αυτή η περιοχή δείχνει πιο καθαρά κορυφές που οφείλονται στην παρουσία των στεροειδών συγκριτικά με την προηγούμενη υδρόφοβη περιοχή που έχουμε μελετήσει. Αυτό μπορεί να εξακριβωθεί για παράδειγμα με σύγκριση του φάσματος της Δ^{16} -αλφαξαλόνης σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο που δείχνεται στο Σχήμα 10. Η ταυτοποίηση των κορυφών της Δ^{16} -αλφαξα-



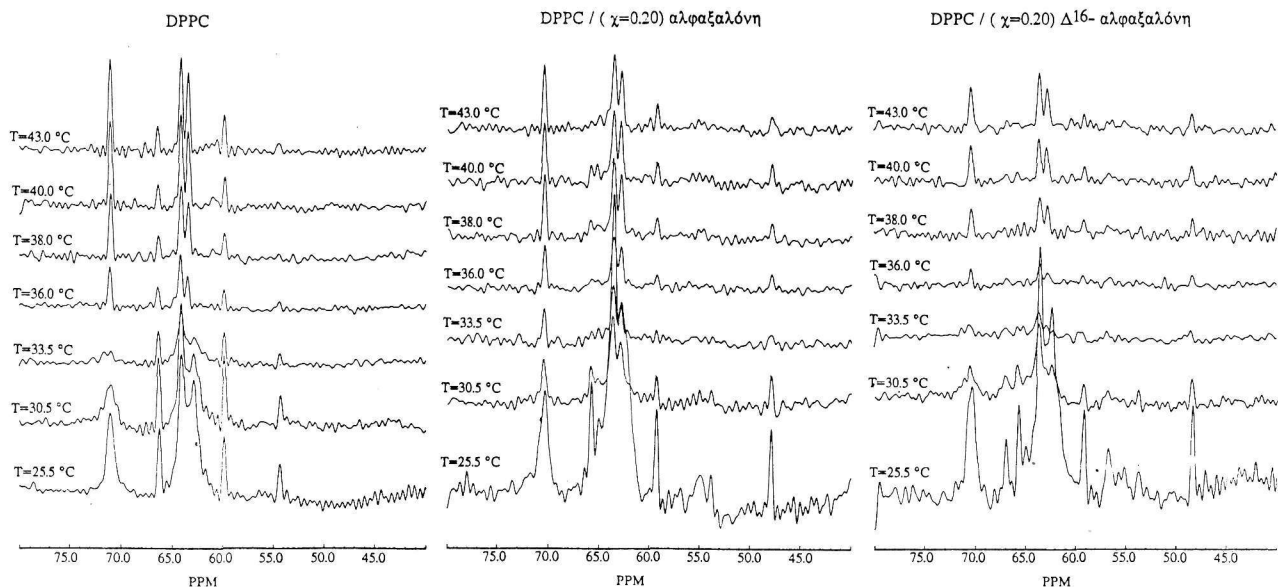
Σχήμα 8. Σύγκριση χημικών μετατοπίσεων των φασμάτων DPPC (●), DPPC / ($\chi=0.20$) αλφαξαλόνη (▲), και DPPC / ($\chi=0.20$) Δ16-αλφαξαλόνη (◆), των διαφόρων ανθράκων της υδροφοβικής περιοχής του φασφολιπιδίου σε περιοχή θερμοκρασιών 25,5 °C-43 °C.

λόνης φαίνεται στον Πίνακα 2 και επιτεύχθηκε κατ' αναλογία από τα αντίστοιχα φάσματα των στεροειδών σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο²³. Δυστυχώς δεν υπάρχει ακόμη πλήρης εξήγηση γιατί μόνο ορισμένες κορυφές από τα στεροειδή μπορούν να παρατηρηθούν. Ένας πιθανός λόγος είναι ότι ο δραστηκός εγκάρσιος χρόνος αποδιέγερσης (effective transverse relaxation time) T_2^* είναι μικρός για ωρισμένα άτομα^{11,24}. Ο χρόνος αυτός είναι ανιστρόφως ανάλογος του ημίσειου

φασματικού εύρους σύμφωνα με την εξίσωση:

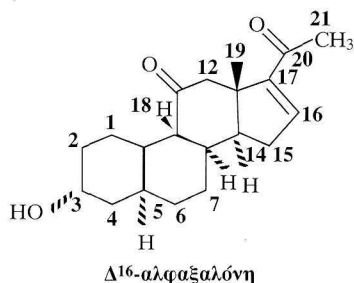
$$T_2^* = 1/(\pi\nu_{1/2})$$

Πολύ μικροί χρόνοι T_2^* προκαλούν μεγάλη φασματική διεύρυνση των κορυφών με αποτέλεσμα να μην είναι παρατηρήσιμες. Ένας κύριος παράγοντας που επηρεάζει - εκτός από τη φύση του μορίου- το μέγεθος του T_2^* είναι η δυνατότητα ανταλλαγής ευκινήτων πυρήνων (chemical exchange).



Σχήμα 9. Σύγκριση ^{13}C -CP/MAS φασμάτων των DPPC, DPPC/ ($\chi=0.20$) αλφαξαλόνη, και DPPC / ($\chi=0.20$) Δ^{16} -αλφαξαλόνη, της περιοχής της κεφαλής και μεσόφασης του φωσφολιπιδίου σε περιοχή θερμοκρασιών 25.5 °C-43 °C.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΟΡΥΦΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣ ^{13}C -NMR ($X=0.20$) Δ^{16} -ΑΛΦΑΞΑΛΟΝΗΣ ΣΕ CDCl_3 ΣΤΟΥΣ 298 K.



Ατομο C	Χημική μετατόπιση (ppm)
C=O (C-11, C-20)	210.3, 195.9
C-1	32.5
C-2	29.0
C-3	66.3
C-4	36.1
C-5	39.2
C-6	27.8
C-7	31.0
C-8	35.2
C-9	54.1
C-10	35.4
C-12	64.8
C-13	48.5
C-14	55.8
C-15	31.8
C-16	153.2
C-17	144.3
C-18	10.9
C-19	17.3
C-21	26.9

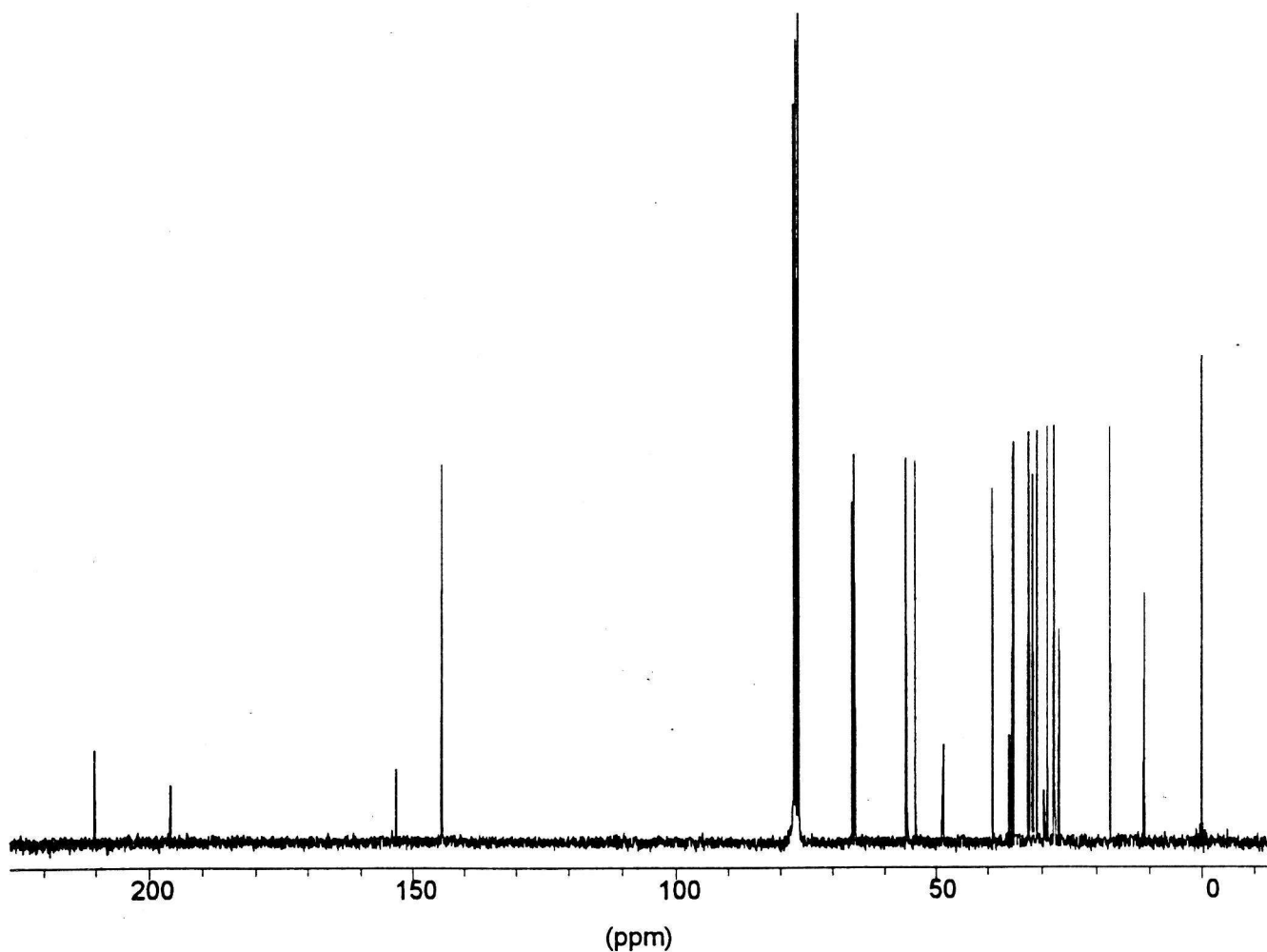
Πρέπει να πούμε ότι διεξοδική ανάλυση μπορεί να γίνει και σ' αυτή την περιοχή όπως κάναμε για την υδροφοβή. Επίσης και για οποιαδήποτε άλλη περιοχή τη λιπιδικής διπλοστοιβάδας παρουσία ή απουσία βιολογικά δραστικού μορίου. Επομένως η τεχνική CP/MAS μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος παρατήρησης της θερμοκρασίας μετάβασης για όλους τους άνθρακες. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί αποτελεί τη μοναδική μέθοδο όπου μπορεί να επιτευχθεί αυτό χωρίς να χρειάζεται να επισημανθεί ούτε το φωσφολιπίδιο ούτε η λιπιδική διπλοστοιβάδα.

Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας δημοσίευσης είναι να δείξει μερικές από τις δυνατότητες της μεθόδου CP/MAS στη μελέτη αλληλεπίδρασης βιολογικά δραστικών μορίων στην φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα της DPPC.

Με τα παραδείγματά μας έχουμε δείξει τη χρησιμότητα των τεχνικών υψηλής διαχωριστικότητας στη μελέτη αλληλεπιδράσεων βιολογικά δραστικών μορίων σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Οι συγκεκριμένες τεχνικές μπορούν να δώσουν πληροφορίες για (α) τις δυναμικές ιδιότητες των μορίων που εισέρχονται στις διπλοστοιβάδες, (β) τις θερμοτροπικές αλλαγές που υφίσταται κάθε περιοχή του λιπιδίου και (γ) τις διαμορφωτικές αλλαγές που προκαλούνται στην τρισδιάστατη δομή της προς μελέτη λιπιδικής διπλοστοιβάδας.

Προκειμένου να δειχθεί η σημαντικότητα αυτών των τεχνικών συγκρίναμε δύο στεροειδή μόρια με πα-



Σχήμα 10. Φάσμα DPCC / ($\gamma=0.20$) Δ^{16} -αλφαξάλονη σε $CDCl_3$.

ρόμοια χημική δομή αλλά διαφορετική βιολογική δραστηριότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δύο αυτά στεροειδή εξασκούν διαφορετικές αλληλεπιδράσεις στο φωσφολιπιδικό περιβάλλον των μεμβρανών. Έτσι προκύπτει μια νέα εφαρμογή της παραπάνω τεχνικής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη σύγκριση αλληλεπίδρασης διαφόρων χημικά παρεμφερών ουσιών, που έχουν όμως διαφορετική βιολογική δραστηριότητα στις μεμβράνες. Μελέτες αυτού του είδους μπορεί να καθορίσουν τα δομικά χαρακτηριστικά των μορίων που δρούν σε επίπεδο μεμβρανών.

Πιστεύουμε ότι τα παραπάνω αποτελέσματα θα δώσουν ώθηση στην περαιτέρω διερεύνηση της μεθόδου από βιοφυσικούς που ασχολούνται με αλληλεπιδράσεις βιολογικά δραστικών μορίων με μεμβράνες, εφόσον παρέχει σημαντικές πληροφορίες γι' αυτές σε μοριακό επίπεδο.

Ευχαριστίες: Ευχαριστούμε το Έθνικό Ίδρυμα Ερευνών για την οικονομική υποστήριξη που μας παρείχε ώστε να συντελεσθεί αυτή η εργασία.

Use of ^{13}C -MASS and ^{13}C -CP/MASS Techniques to Study the Dynamic Properties of Anesthetic Steroids in Membrane Bilayers.

T. Mavromoustakos, E. Theodoropoulou, A. Makriyannis

Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Vas. Constantinou 48, Athens 116 35

Summary: □ In this publication the dynamic properties of the anesthetic steroid alphaxalone and its inactive congener Δ^{16} -alphaxalone in L-dipalmitoylphosphatidylcholine (L-DPPC) bilayer are examined. The above properties are studied using a

combination of ^{13}C -MASS and ^{13}C -CP/MASS techniques. Specifically, the chemical shift, intensity changes and the appearance of new peaks that arised from the presence of the steroid in the DPCC bilayer revealed the following most important results: (a) Both steroids are incorporated in the phospholipid bilayer. (b) The active steroid fluidizes and broadens the phase transition of DPPC bilayer more significantly than the inactive analog in the gel phase. (c) The presence of either steroid molecule broadens the pretransition area of DPPC bilayer and (d) The presence of the active analog fluidizes and changes the conformation of the lipid acyl chains in the liquid crystalline phase, whereas the inactive analog does not exert any effect in this phase. (e) The thermotropic properties of the membrane bilayer can be virtually studied at the atomic level in presence or absence of the molecules of interest. To our knowledge this is the only method that can achieve that without using any external probe or specific labelling. In conclusion, the above results clearly show, that these methods are capable of detecting differences of dynamic behaviour in membrane bilayers of structurally similar, but with different bioactivity, molecules.

Βιβλιογραφία

1. Yannoni, C.S. *Acc. Chem. Res.* 15, 201, 1982.
2. Oldfield, E., Bowers, J.L., Forbes, J. *Biochemistry* 26, 6919, 1987.
3. Lawrence, D.K., Gill E.W. *Mol. Pharmacol.* 11, 280, 1975.
4. Atkinson, R.M., Davis, B., Pratt, M.A., Sharpe, H.M., Tomich, E.G. *J. Med. Chem.* 8, 426, 1985.
5. Phillips, G.H. *J. Steroid Biochem.* 6, 607, 1975.
6. Oldfield, E., Adebodun, F., Chung, J., Monter, B., Park, K.D., Le, H.B., Phillips, B. *Biochemistry* 30, 11025, 1991.
7. Fesik, S.W., Makriyannis, A. *Mol. Pharmacol.* 27, 624, 1985.
8. Makriyannis, A., Siminovitch, D.J., Das Gupta, S.K., Griffin, R.G. *Biochim. Biophys. Acta* 859, 49, 1986.
9. Fesik, S.W., Makriyannis, A. *J. Med. Chem.* 26, 463, 1983.
10. Makriyannis, A., Yang, D.P., Mavromoustakos, T (1990). In: «Steroid and Neuronal Activity», Ciba Foundation Symp. No 153, Simmons M. ed. (London, U.K.) p.p. 172-185.
11. Makriyannis, A., Fesik, S.W., Dimeglio, C.D. *J. Med. Chem.* 34, 1700, 1991.
12. Mavromoustakos, T., Makriyannis, A. *Rev. Clin. Pharmacol.*, 11, 13, 1993.
13. Makriyannis, A., Mavromoustakos, T. *Rev. Clin. Pharmacol.* 3(2), 95, 1989.
14. Melchior, D.L., Steim, J.M. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 5, 205, 1976.
15. McElhaney, R.N. *Chem. Phys. Lipids* 30 (2-3), 229, 1982.
16. Jurgen, H.H., Sturtevant, J.M. *J. Biol. Chem.* 254, 6068, 1979.
17. Janiak, M.J., Small, D.M., Shipley, G.G. *J. Biochemistry* 15, 4575, 1979.
18. Witerbort, R.J., Bume, A., Huang, T.H., Das Gupta, S.K., Griffin, R.G. *Biochemistry* 21, 3487, 1982.
19. Bruzik, K.S., Salamonezyk, G.M., Sobon, B. *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 143, 1990.
20. Dick, D., Pluskey, S., Sukumaran, D.K., Lawrence, D.S. *J. Lip. Res.* 33, 605, 1990.
21. Ashworth, D.J., Adams, D.O., Giang, B.Y., Gheng, M.T., Lee, R.Y. *Anal. Chem.* 57, 710, 1985.
22. Wu, W.G., Chi, L.M. *Biochim. Biophys. Acta* 1026, 225, 1990.
23. Blunt, J.W., Stothers, J.B. *Org. Magn. Reson.* 9(8), 439, 1977.
24. Forbes, J., Husted C., Oldfield, E. *J. Am. Chem.Soc.* 110, 1059, 1988.