

## УВЕЛИЧЕНИЕ ТЕКУЧЕСТИ МОДЕЛЬНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ПОД ДЕЙСТВИЕМ МЕСТНЫХ АНЕСТЕТИКОВ

© С. С. Ефимова,<sup>1</sup> Р. Я. Медведев, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: ssefimova@mail.ru

Исследовано влияние местных анестетиков на проницаемость фосфолипидных липосом различного состава для кальцеина. Среди местных анестетиков протестираны амиды (лидокаин, прилокайн, мепивакайн и бупивакайн) и сложные эфиры (бензокайн, прокайн и тетракайн). Проницаемость больших моноламеллярных липосом определяли по интенсивности флуоресценции кальцеина, вытекающего из фосфолипидных везикул. Показано, что все протестиранные амидные анестетики слабо влияют на проницаемость диолеофосфохолиновых (ДОФХ) липосом для флуоресцентного маркера. При этом наиболее эффективным амидом является бупивакайн. Замена в составе мембран 20 моль % ДОФХ на тетраолеоилкардиолипин (ТОКЛ) сопровождается ростом активности амидов. Установлено, что бензокайн и прокайн в концентрациях до 100 мМ не изменяют проницаемость ДОФХ липосом. Добавка к ДОФХ липосомам тетракайна до концентрации 2 мМ не влияет на проницаемость мембран, увеличение концентрации анестетика до 50 мМ сопровождается ростом интенсивности флуоресценции вы свобожденного из везикул кальцеина, а при концентрации 100 мМ весь захваченный липосомами маркер оказывается в омывающем растворе. В случае везикул, включающих 20 моль % ТОКЛ, пороговая концентрация тетракайна и концентрация анестетика, соответствующая 100%-ной утечке кальцеина, составляют 7 и 20 мМ соответственно. С помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии гигантских одноламеллярных липосом, сформированных из эквимолярной смеси ДОФХ и тетрамиристоилкардиолипина, показано, что анестетики разрушают твердые упорядоченные домены, причем эта способность возрастает в ряду: прокайн ≈ мепивакайн < бупивакайн ≪ тетракайн. Выявленная разница в влиянии местных анестетиков может быть обусловлена различной глубиной погружения анестетиков в мембрну.

**Ключевые слова:** липосомы, местные анестетики, кальцеин, проницаемость, фазовое разделение в мембране, упорядоченные домены.

**Принятые сокращения:** МА — местные анестетики, ДОФХ — 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ТОКЛ — тетраолеоилкардиолипин, ТМКЛ — тетрамиристоилкардиолипин.

Местными анестетиками (МА) называют вещества, которые вызывают потерю болевой чувствительности в области, ограниченной зоной их введения. В структуре молекул МА можно выделить гидрофобную и гидрофильную части. Чаще всего первая представлена ароматической группировкой, а вторая — третичным амином. Тип связи, соединяющей гидрофобную и гидрофильную части, лежит в основе химической классификации МА. Их принято делить на сложные эфиры (бензокайн, прокайн, тетракайн и др.) и амиды (лидокаин, прилокайн, мепивакайн, бупивакайн и др.). Амидные анестетики более стабильны и в отличие от эфирных практически не вызывают побочных реакций. Биологическая активность МА во многом зависит от липофильности их молекул. Как правило, более гидрофобные препараты обладают большей активностью и продолжительностью действия. Однако с увеличением гидрофобности возрастает и токсичность МА, что соответственно сужает их терапевтический диапазон (Butterworth, 2002; Rosenberg et al., 2004).

Важно учитывать, что анестезирующие средства вызывают блокаду натриевых каналов при взаимодействии

с цитоплазматической частью белка (Hille, 1977; Nilius et al., 1987; Butterworth, Strichartz, 1990; Weiser, 2006). В этой связи решающее значение для возникновения анестезирующего эффекта МА имеет уровень pH тканевой среды, в которую вводится анестетик, поскольку от данного параметра зависит степень ионизации молекулы анестетика. В силу того что практически все местноанестезирующие средства по химической структуре являются основными соединениями, липофильность и соответственно способность проникать через мембранный барьер и вызывать блокаду натриевой проводимости МА приобретают только в слабощелочной или нейтральной среде.

МА не только блокируют проведение нервного импульса, но и действуют на другие возбудимые органы и ткани, что является причиной развития побочных эффектов, в том числе со стороны центральной нервной и сердечно-сосудистой систем (Covino, 1987). Поскольку побочные эффекты в основном наблюдаются при относительно высоких концентрациях анестезирующих агентов, токсичность может быть обусловлена их неспецифическим действием на клеточные мембранны. К изменениям в

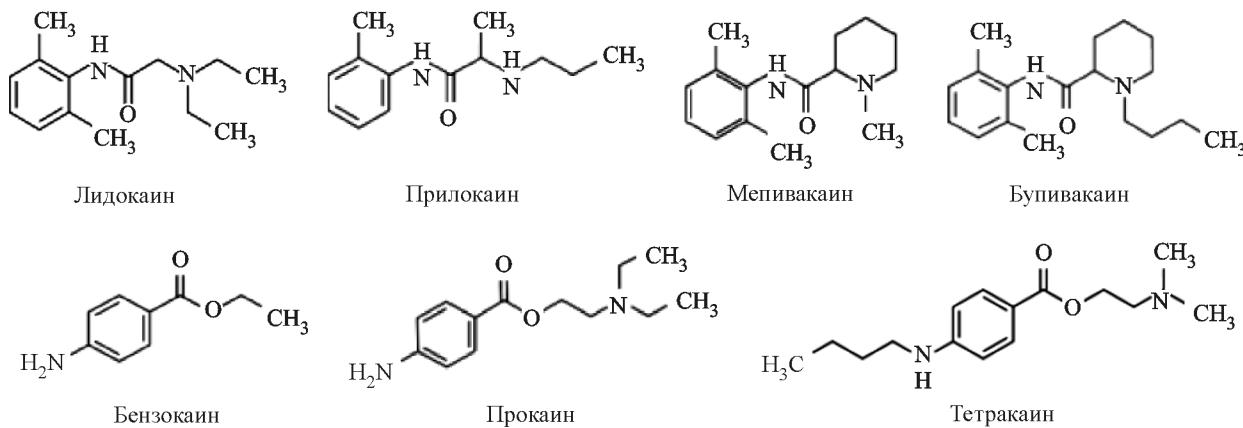


Рис. 1. Химические структуры местных анестетиков (МА): амиды (лидокаин, прилокайн, мепивакайн и бупивакайн) и сложные эфиры (бензокайн, прокайн и тетракайн).

свойствах мембранны, которые могут иметь серьезные последствия для функционирования реконструированных в нее ионных каналов, следует отнести модификацию текучести бислойя, а также его латеральную организацию. Систематических исследований на эту тему не проводили. Известно, что взаимодействие некоторых МА с липидными мембранами сопровождается увеличением их текучести и проницаемости (Shimooka et al., 1992; Shibata et al., 1995; Yun et al., 2002; Onyuksel et al., 2007; Tsuchiya, Mizogami, 2013). Наибольшим эффектом в этом отношении обладает бупивакайн (Onyuksel et al., 2007; Tsuchiya et al., 2010), что может быть причиной его более выраженной кардиотоксичности (McClure, 1996). Данные из литературы также указывают на изменение сценария фазовой сегрегации в бислойе под действием местных анестетиков (Amador, Floyd, 2000; Senisterra, Lepock, 2000).

Для анализа механизмов мембранныго действия различных биологически активных соединений широко используется метод измерения проницаемости липосом для флуоресцентных маркеров (Schwarz, Robert, 1992; Andersson et al., 2007; Heerklotz, Seelig, 2007). Для этого большие одноламеллярные везикулы нагружают флуоресцентным маркером, например кальцеином. Внутри липосом кальцеин флуоресцирует очень слабо из-за сильного самотушения в миллимолярных концентрациях. Омывающий везикулы раствор предварительно очищают от не захваченного кальцеина. Изменения проницаемости мембран больших одноламеллярных везикул, индуцированных мембраноактивными препаратами, вызывают поток кальцеина через бислой. В разбавленных растворах флуоресценция кальцеина заметно возрастает, что дает возможность обнаружить утечку маркера из липосом. При оценке эффектов тестируемых агентов следует также учитывать неоднородность мембранны, главным образом наличие в ней липидных доменов, находящихся в другом агрегатном состоянии. Идеальным инструментом для визуализации разделения фаз являются гигантские однослойные везикулы (Wesolowska et al., 2009). В этом случае исследование фазового разделения проводится с использованием флуоресцентных липидных зондов, которые неравномерно распределяются между липидными фазами в мембране.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния МА (лидокаина, прилокaina, мепивакaina, бупивакaina, бензокaina, прокaina и тетракaina) на текучесть модельных мембран различного состава. Для этого

оценивали влияние МА на проницаемость липосом для кальцеина и фазовое разделение в модельных мембранах.

## Материал и методика

В работе использовали следующие реагенты: 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), тетраполеилкардиолипин (ТОКЛ), тетрамиристоилкардиолипин (ТМКЛ) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиззамин родамин) (ЛР-ДПФЭ) (Avanti Polar Lipids, США); хлорид натрия, НЕРЕС, ЭДТА, Тритон X-100 (TX-100), кальцеин, сорбитол, бензокайн, гидрохлориды лидокаина, бупивакайна, прилокайна, мепивакайна, прокайна и тетракайна (Sigma, США).

Определение утечки кальцеина из липосом при добавке местных анестетиков. Большие однослойные липосомы диаметром 100 нм получали методом экструзии с использованием мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, США). Раствор липида в хлороформе (ДОФХ или смесь 80 моль % ДОФХ и 20 моль % ТОКЛ) помещали в емкость, после чего растворитель удаляли потоком азота. Липидную пленку гидратировали буфером (35 мМ кальцеина, 10 мМ НЕРЕС, 1 мМ ЭДТА, pH 7.4) и подвергали пятикратному замораживанию—размораживанию для превращения раствора в суспензию мультиламеллярных липосом. Затем полученную суспензию пропускали 13 раз через поликарбонатную мембрану с диаметром пор 100 нм (Nucleopore TM, США) для получения одноламеллярных липосом одинакового размера. Удаление не попавшего в липосомы кальцеина проводили с помощью гель-фильтрации на колонке, заполненной сефадексом-50. В качестве элюента использовали свободный от флуоресцентного красителя буфер (150 мМ NaCl, 10 мМ НЕРЕС, pH 7.4). Концентрацию липида в суспензии, очищенной от не захваченного везикулами кальцеина, определяли при помощи набора «Phospholipids assay kit» (Sigma, США). Полученную липосомную суспензию разбавляли буфером (150 мМ NaCl, 10 мМ НЕРЕС, 1 мМ ЭДТА, pH 7.4) до концентрации 25 мкМ.

Липосомную суспензию разделяли на аликовты. Контрольные образцы не модифицировали. В экспериментальные образцы вводили МА из исходных растворов в этаноле или воде и инкубировали в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре. Структурные формулы МА представлены на рис. 1.

Проницаемость больших моноламеллярных липосом для кальцина определяли путем измерения интенсивности флуоресценции красителя, вытекающего из везикул, с помощью спектрофлуориметра «Флюорат Панорама-02» (при длинах волн возбуждения и эмиссии 490 и 520 нм соответственно). Кальцин (в концентрации 35 мМ) внутри липосом имеет пренебрежимо малую интенсивность флуоресценции вследствие самотушения. Поскольку омывающий липосомы раствор не содержит кальцина, можно зафиксировать интенсивность флуоресценции вытекающего из везикул красителя. Спирт в соответствующих концентрациях на проницаемость везикул для кальцина не влиял. После измерения флуоресценции экспериментального образца в раствор добавляли детергент TX-100 до концентрации 10 мМ из водного раствора. Это приводило к полному разрушению липосом и высвобождению всего захваченного красителя.

Относительную величину утечки  $RF$  (%), кальцина из липосом, определяли по формуле

$$RF = \frac{\alpha_i I_i - I_0}{I_{\max}^0 - I_0} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где  $I_i$  и  $I_0$  — интенсивности флуоресценции образцов с  $i$ -той концентрацией анестетика и в отсутствие анестетика,  $I_{\max}^0$  — интенсивность флуоресценции раствора после добавки TX-100 (коэффициент 0.9 введен для учета разбавления экспериментального образца раствором тритона),  $\alpha_i$  — поправочный коэффициент тушения.

По данным Коблин с коллегами, сложноэфирные анестетики в отличие от амидных тушат флуоресценцию различных флуорофоров (Koblin et al., 1975). Для учета возможного тушения коэффициент  $\alpha$  в выражении (1) определяли как

$$\alpha_i = \frac{I_{\max}^0}{I_{\max}^i}, \quad (2)$$

где  $I_{\max}^0$  и  $I_{\max}^i$  — максимальная интенсивность флуоресценции раствора после добавки TX-100 в образце в отсутствие и в присутствии МА соответственно.

Конфокальная микроскопия гигантских одноламеллярных липосом. Эти липосомы изготавливали методом электроформации с помощью Nanion vesicle prep pro (Германия) (стандартный протокол, напряжение 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, 25 °C). Визуализацию латерального фазового разделения проводили путем введения флуоресцентного зонда ЛР-ДПФЭ в исходный липидный раствор ДОФХ : ТМКЛ (50 : 50 моль %) в хлороформе (11 мМ). Концентрация ЛР-ДПФЭ в образце составляла 1 моль %. Полученную липосомальную супензию разделяли на аликовты. В качестве контроля использовали аликовту без местного анестетика. Экспериментальные образцы содержали 100 мкМ МА (бутивакаина, мепивакаина, прокаина или тетракаина). Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив 100.0×/1.4 HCX PL в Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Aro (Leica Microsystems, Германия). Наблюдение препаратов проводили при 25 °C. Свечение ЛР-ДПФЭ возбуждали светом с длиной волны 543 нм (гелий-неоновый лазер). Известно, что ЛР-ДПФЭ в бислое с фазовым разделением встраивается преимущественно в жидкую неупорядоченную фазу (Juhasz et al., 2010). В то время как

твердая упорядоченная (гель) фаза остается неокрашенной (Muddana et al., 2012).

Образец характеризовали частотой встречаемости ( $p_i$ , %) гомогенных и гетерогенных везикул:

$$p_i = \frac{N_i}{N} \cdot 100 \%, \quad (3)$$

где  $i$  — тип фазового разделения липосом (жидкая неупорядоченная фаза или сосуществование жидкой и твердой фаз),  $N_i$  — число везикул в образце с определенным фазовым сценарием (от 0 до 50),  $N$  — общее число липосом в образце (не менее 50 в каждой системе). Для каждой системы проводили как минимум 4 независимых эксперимента.

## Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены зависимости величины утечки кальцина из больших моноламеллярных ДОФХ липосом от концентрации МА. Видно (рис. 2, а), что в концен-

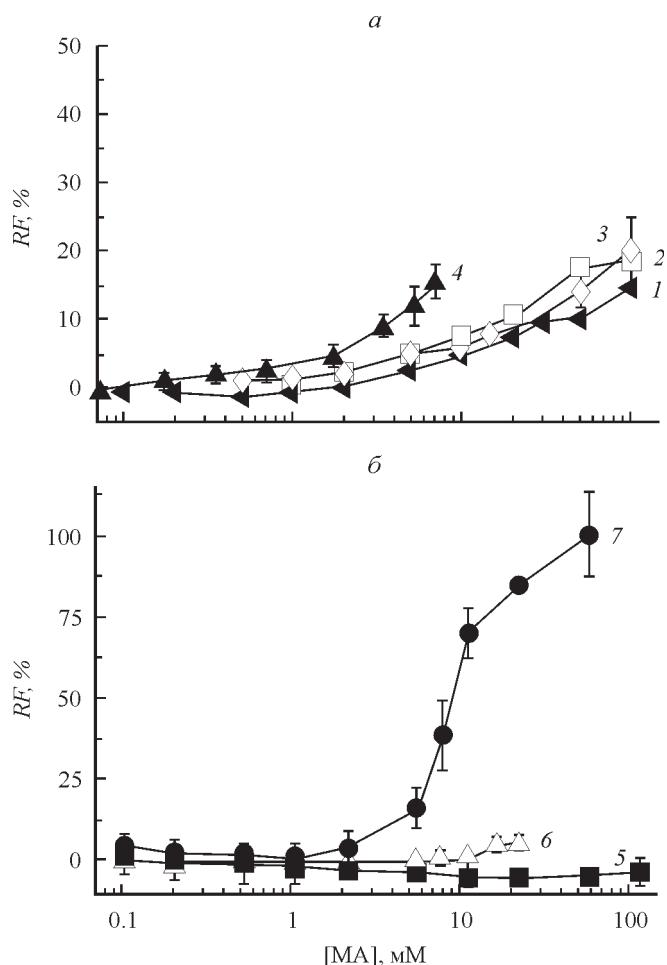


Рис. 2. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции ( $RF$ , %) кальцина, вытекшего из ДОФХ-липосом, от концентрации МА — амидов (а: кривые 1—4) и сложных эфиров (б: кривые 5—7).

Кривые: 1 — прилокайн, 2 — мепивакайн, 3 — лидокайн, 4 — бутивакайн, 5 — прокаин, 6 — бензокайн, 7 — тетракаин.

трационном диапазоне до 100 мМ все амиды слабо влияют на проницаемость везикулярных мембран для кальцеина. Бупивакаин характеризуется большей эффективностью по сравнению с лидокаином, прилокайном и мепивакаином. В концентрации 7 мМ бупивакаин индуцирует утечку, равную 16 %, в то время как для лидокаина, прилокайна и мепивакаина соответствующая величина составляет около 5 %. Сложные эфиры характеризуются различной способностью индуцировать высвобождение флуоресцентного маркера из липидных везикул (рис. 2, б). Добавка прокайн и бензокаина в концентрации до 100 мМ практически не влияет на относительную флуоресценцию кальцеина. Зависимость интенсивности флуоресценции высвобожденного кальцеина от введения тетракаина имеет S-образную форму (рис. 3, б). В диапазоне концентраций от 0 до 2 мМ тетракайн не изменяет утечек и флуоресцентного маркера. Дальнейшее увеличение концентрации до 50 мМ приводит к росту интенсивности флуоресценции. При концентрации тетракаина более 50 мМ происходит полное высвобождение захваченного липосомами кальцеина.

Сопоставление структур МА и коэффициентов их распределения между октанолом и водой (Grouls et al., 1997; Tateuchi et al., 2015) с результатами исследования влияния этих агентов на проницаемость ДОФХ липосом позволяет выдвинуть предположение о связи интенсивности утечки кальцеина из везикул с гидрофобностью молекул МА. Можно думать, что чем глубже погружена молекула анестетика в мембрану, тем более текучим становится бислой. С помощью методов молекулярной динамики показано, что плоскость адсорбции тетракаина находится между областью мембранны, в которой локализованы эфирные связи молекул липидов, и регионом мембранны, занимаемым их углеводородными цепями, в то время как прокайн и лидокаин сорбируются в более полярной области бислоя (Zapata-Morin et al., 2014). Можно предположить, что прилокайн и мепивакаин локализуются в той же области мембранны, что и лидокаин, а глубина погружения бупивакаина близка к плоскости адсорбции тетракаина. Известно, что тетракайн способен формировать смешанные мицеллы с липидом (Fernández, 1981; Frezzatti et al., 1986; Takeda et al., 2009). При этом лидокаин и прокайн подобного действия не оказывают (Takeda et al., 2009). Это дает основание полагать, что увеличение относительной флуоресценции кальцеина в присутствии тетракаина может быть обусловлено не только увеличением проницаемости липосомных мембран для флуоресцентного маркера, но и разрушением везикул посредством образования мицелл.

Ввиду возможной способности МА проникать внутрь клетки, а следовательно, их токсичности интерес представляют их действие на мембранны разного состава, в том числе бислои, имитирующие мембранны клеточных органелл. Кардиолипин является важным компонентом внутренней мембранны митохондрий, которая содержит порядка 20 % этого фосфолипида (Hoch, 1992). Индукция проницаемости мембранны, включающих кардиолипин, под действием МА может иметь необратимые последствия для синтеза АТФ в клетке и быть одной из причин высокой кардиотоксичности некоторых МА. На рис. 3 представлена зависимость утечки кальцеина из смеси ДОФХ и ТОКЛ (80 : 20 моль %) липосом при введении местных анестетиков. На рис. 3, а видно, что введение в мембранообразующий раствор кардиолипина сопровождается ростом активности амидов. Максимальная утечка краси-

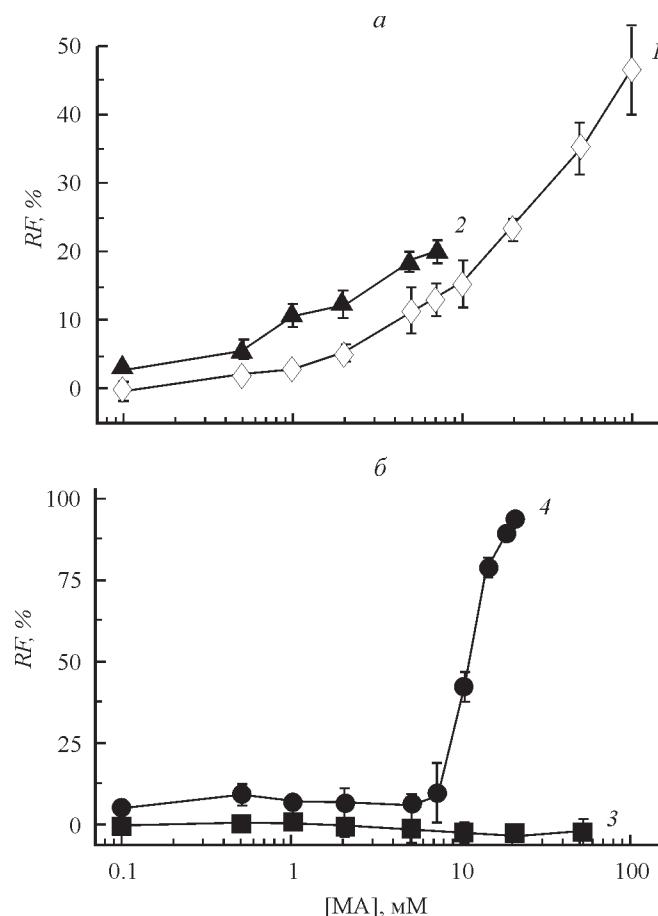


Рис. 3. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции ( $RF, \%$ ) кальцеина, вытекающего из липосом, на основе смеси ДОФХ и ТОКЛ (80 : 20 моль %), от концентрации МА.

а — мепивакаин (кривая 1) и бупивакаин (2); б — прокайн (3) и тетракайн (4).

теля составляет 13 и 20 % при концентрации мепивакаина и бупивакаина 7 мМ соответственно. Учитывая, что при физиологических значениях pH амидные анестетики положительно заряжены, можно предположить, что большее изменение проницаемости липосом из смеси ДОФХ и ТОКЛ (80 : 20 моль %) по сравнению с ДОФХ-везикулами является результатом электростатического взаимодействия отрицательнозаряженных ТОКЛ-содержащих мембрани с положительнозаряженной формой МА. Как и в случае ДОФХ-мембран, прокайн не влияет на проницаемость липосом из ДОФХ и ТОКЛ (80:20 моль %) для кальцеина (рис. 3, б). При этом наличие кардиолипина в составе бислоя приводит к изменению зависимости относительной флуоресценции от концентрации тетракаина. Добавка тетракаина к содержащим кардиолипин мембранным до концентрации 5 мМ не вызывает изменения относительной флуоресценции кальцеина. Повышение концентрации анестетика до 20 мМ сопровождается ростом утечки маркера до 100 %. Увеличение пороговой концентрации тетракаина в случае мембрани, включающих кардиолипин, может быть обусловлено высокой отрицательной спонтанной кривизной этого липида, который в отсутствие других липидов и анестетиков образует инвертированные мицеллы (Israelachvili et al., 1980).

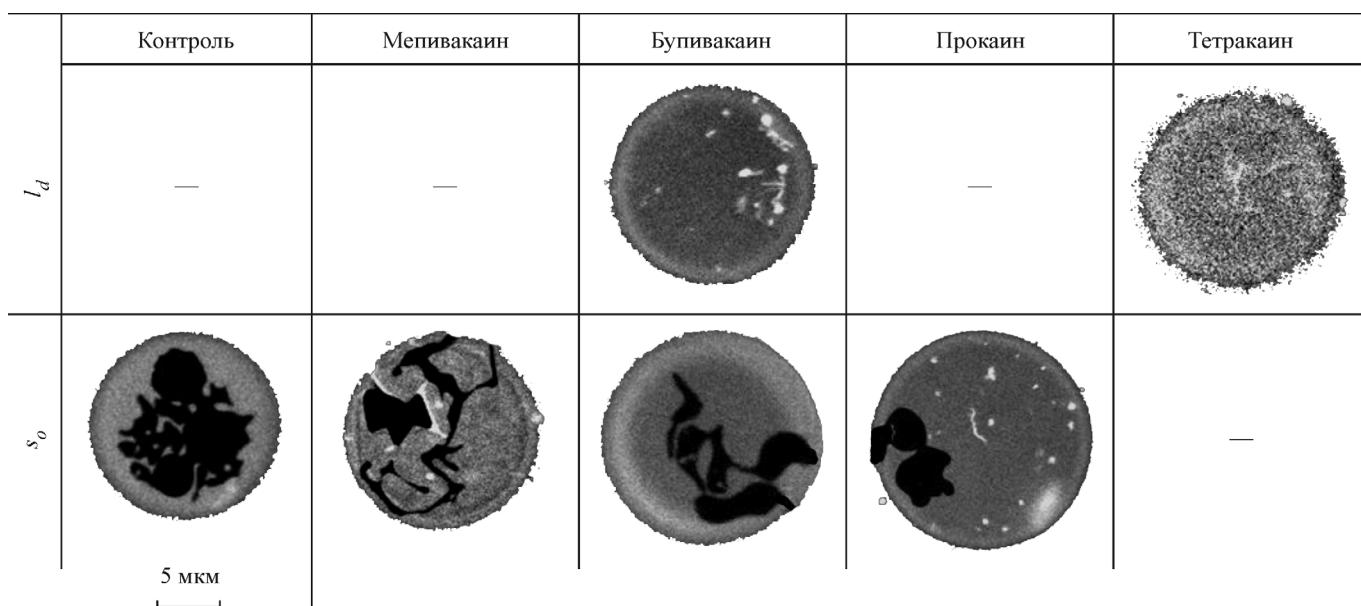


Рис. 4. Микрофотографии одноламеллярных липосом, сформированных из эквимолярной смеси ДОФХ и ТМКЛ в отсутствие (контроль) и в присутствии в суспензии 100 мкМ МА (мепивакаина, бупивакаина, прокаина или тетракаина).

Прочерки соответствуют малой частоте встречаемости везикул с данным типом фазового разделения (менее 8 %). Жидкая неупорядоченная фаза окрашена серым цветом, твердая упорядоченная фаза не окрашена.

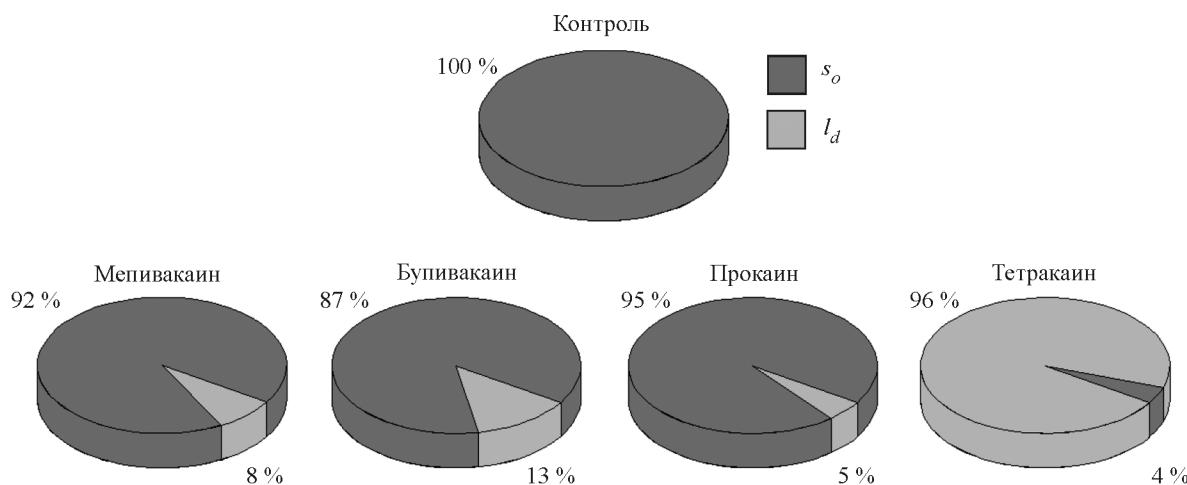


Рис. 5. Диаграммы распределения относительного числа одноламеллярных липосом из эквимолярной смеси ДОФХ и ТМКЛ, демонстрирующих отсутствие фазового разделения ( $l_d$ ) и содержащих твердые упорядоченные домены ( $s_o$ ), в отсутствие (контроль) и в присутствии в суспензии 100 мкМ МА (мепивакаина, бупивакаина, прокаина или тетракаина).

Для изучения влияния МА на фазовую сегрегацию мембран использовали флуоресцентную конфокальную микроскопию. На рис. 4 показаны типичные микрофотографии липосом, содержащих кардиолипин, в отсутствие и в присутствии 100 мкМ МА. В отсутствие МА все липосомы, содержащие кардиолипин, содержат неокрашенные домены неправильной формы (рис. 5). С большой долей уверенности их можно отнести к образуемой ТМКЛ гель-фазе ( $s_o$ ). Добавка к фазоразделенным липосомам 100 мкМ мепивакаина и прокаина вызывает появление гомогенно окрашенных везикул (8 и 5 % соответственно). Введение в липосомную суспензию бупивакаина сопровождается большим ростом числа гомогенно окрашенных везикул (13 %). Добавка 100 мкМ тетракаина

вызывает разрушение  $s_o$ -доменов практически во всех липосомах. Таким образом, данные конфокальной микроскопии гигантских липосом, модифицированных МА, хорошо согласуются с результатами, полученными при измерении утечки кальцеина из липосом, и свидетельствуют об увеличении текучести модельных липидных мембран в присутствии МА.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-34-20356), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и стипендии президента РФ (СП.69.2015.4).

## Список литературы

- Amador K. S., Floyd S. D.* 2000. Interaction of local anesthetics with phospholipids in Langmuir monolayers. *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas. Fluids Relat. Interdiscip. Topics.* 62 : 8400—8408.
- Andersson A., Danielsson J., Gräslund A., Mäler L.* 2007. Kinetic models for peptide-induced leakage from vesicles and cells. *Eur. Biophys. J.* 36 (6) : 621—635.
- Butterworth J.* 2002. Local anesthetics: pharmacology and clinical use. *Anesth. Analg.* 94 : 22—26.
- Butterworth J. F., Strichartz G. R.* 1990. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology.* 72 : 711—734.
- Covino B. G.* 1987. Pharmacology of local anesthetic agents. *Ration Drug Ther.* 21 : 1—9.
- Fernández M. S.* 1981. Disruption of liposomes by tetracaine micelles. *Biochim. biophys. acta.* 646 : 27—30.
- Frezzatti W. A., Toselli W. R., Schreier S.* 1986. Spin label study of local anesthetic-lipid membrane interactions. Phase separation of the uncharged form and bilayer micellization by the charged form of tetracaine. *Biochim. biophys. acta.* 860 : 531—538.
- Grouls R. J., Ackerman E. W., Korsten H. H., Hellebrekers L. J., Breimer D. D.* 1997. Partition coefficients (n-octanol/water) of N-butyl-p-aminobenzoate and other local anesthetics measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 694 : 421—425.
- Heerklotz H., Seelig J.* 2007. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur. Biophys. J.* 36 : 305—314.
- Hille B.* 1977. Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* 69 : 497—515.
- Hoch F. L.* 1992. Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim. biophys. acta.* 1113 : 71—133.
- Israelachvili J. N., Marcelja S., Horn R. G.* 1980. Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.* 13 : 121—200.
- Juhasz J., Davis J. H., Sharom F. J.* 2010. Fluorescent probe partitioning in giant unilamellar vesicles of «lipid raft» mixtures. *Biochem. J.* 430 : 415—423.
- Koblin D. D., Pace W. D., Wang H. H.* 1975. The penetration of local anesthetics into the red blood cell membrane as studied by fluorescence quenching. *Arch. Biochem. Biophys.* 171 : 176—182.
- McClure J. H.* 1996. Ropivacaine. *Br. J. Anaesth.* 76 : 300—307.
- Muddana H. S., Chiang H. H., Butler P. J.* 2012. Tuning membrane phase separation using nonlipid amphiphiles. *Biophys. J.* 102 : 489—497.
- Nilius B., Benndorf K., Markwardt F.* 1987. Effects of lidocaine on single cardiac sodium channels. *J. Mol. Cell Cardiol.* 19 : 865—874.
- Onyüksel H., Sethi V., Weinberg G. L., Dudeja P. K., Rubinstejn I.* 2007. Bupivacaine, but not lidocaine, disrupts cardiolipin-containing small biomimetic unilamellar liposomes. *Chem. Biol. Interact.* 169 : 154—159.
- Rosenberg P. H., Veering B. T., Urmey W. F.* 2004. Maximum recommended doses of local anesthetics: a multifactorial concept. *Reg. Anesth. Pain. Med.* 29 : 564—575.
- Schwarz G., Robert C. H.* 1992. Kinetics of pore-mediated release of marker molecules from liposomes or cells. *42* : 291—296.
- Senisterra G. A., Lepock J. R.* 2000. Thermal destabilization of transmembrane proteins by local anaesthetics. *Int. J. Hyperthermia.* 16 : 1—17.
- Shibata A., Ikawa K., Terada H.* 1995. Site of action of the local anesthetic tetracaine in a phosphatidylcholine bilayer with incorporated cardiolipin. *Biophys. J.* 69 : 470—477.
- Shimoaka T., Shibata A., Terada H.* 1992. The local anesthetic tetracaine destabilizes membrane structure by interaction with polar headgroups of phospholipids. *Biochim. biophys. acta.* 1104 : 261—268.
- Takeda K., Okuno H., Hata T., Nishimoto M., Matsuki H., Kaneshina S.* 2009. Interdigitation and vesicle-to-micelle transformation induced by a local anesthetic tetracaine in phospholipids bilayers. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 72 : 135—140.
- Tateuchi R., Sagawa N., Shimada Y., Goto S.* 2015. Enhancement of the 1-octanol/water partition coefficient of the anti-inflammatory indometacin in the presence of lidocaine and other local anesthetics. *J. Phys. Chem. B.* 119 : 9868—9873.
- Tsuchiya H., Mizogami M.* 2013. Interaction of local anesthetics with biomembranes consisting of phospholipids and cholesterol: mechanistic and clinical implications for anesthetic and cardio-toxic effects. *Anesthesiol. Res. Pract.* 2013 : 297141. doi: 10.1155/2013/297141.
- Tsuchiya H., Ueno T., Mizogami M., Takakura K.* 2010. Local anesthetics structure-dependently interact with anionic phospholipid membranes to modify the fluidity. *Chem. Biol. Interact.* 183 : 19—24.
- Weiser T.* 2006. Comparison of the effects of four Na<sup>+</sup> channel analgesics on TTX-resistant Na<sup>+</sup> currents in rat sensory neurons and recombinant Nav1.2 channels. *Neurosci. Lett.* 395 : 179—184.
- Wesołowska O., Michałak K., Jadwiga Maniewska J., Hendrich A.B.* 2009. Giant unilamellar vesicles—a perfect tool to visualize phase separation and lipid raft in model systems. *Acta biochim. pol.* 56 : 33—39.
- Yun I., Cho E. S., Jang H. O., Kim U. K., Choi C. H., Chung I. K., Kim I. S., Wood W. G.* 2002. Amphiphilic effects of local anesthetics on rotational mobility in neuronal and model membranes. *Biochim. biophys. acta.* 1564 : 123—132.
- Zapata-Morin P. A., Sierra-Valdez F. J., Ruiz-Suárez J. C.* 2014. The interaction of local anesthetics with lipid membranes. *J. Mol. Graph. Model.* 53 : 200—205.

Поступила 7 XII 2015

## INCREASING OF THE FLUIDITY OF MODEL LIPID MEMBRANES UNDER THE INFLUENCE OF LOCAL ANESTHETICS

S. S. Efimova,<sup>1</sup> R. Ya. Medvedev, L. V. Schagina, O. S. Ostroumova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

\* e-mail: ssefimova@mail.ru

We have studied the effect of local anesthetics on the permeability of phospholipid liposomes of various composition to calcein. We have tested amides (lidocaine, prilocaine, mepivacaine and bupivacaine) and ester anesthetics (benzocaine, procaine and tetracaine). The permeability of large unilamellar liposomes to calcein has been determined by measuring the relative fluorescence intensity of calcein released from the phospholipid vesicles. We have shown that all tested amide anesthetics have little effect on the leakage of calcein from dioleoylphosphocholine (DOPC) liposomes. The most effective amide was did bupivacaine. Substitution in the membranes of 20 mol % DOPC on tetraoleoylcarniolipin (TOCL) was did accompanied by increased activity of

amides. Benzocaine and procaine at concentration up to 100 mM practically did not change DOPC liposome permeability. Addition of tetracaine up to concentration of 2 mM did not affect the permeability of vesicle. Further increase in the anesthetic concentration up to 50 mM led to increase in the intensity of calcein fluorescence and, at a concentration of 100 mM, a complete engagement of fluorescent marker was observed. In the case of vesicles including 20 mol % TOCL, the threshold concentration of tetracaine and the concentration that corresponded to 100% leakage of calcein were been 7 and 20 mM, respectively. Using confocal fluorescence microscopy of giant unilamellar vesicles formed from an equimolar mixture of DOPC and tetramyristoylcardiolipin (TMCL), we have shown that anesthetics destroy solid ordered domains, and this ability increases in the order: procaine  $\approx$  mepivacaine < bupivacaine  $\ll$  tetracaine. The revealed differences in the effect of local anesthetics might be caused by different depth of immersion of the anesthetics into the membrane.

**K e y w o r d s:** local anesthetics, liposomes, calcein, permeability, lipid phase segregation, membrane ordered domains.