การใช้ บรอมครีซอล เพอเพิล เป็นออพติคอลโพรบเพื่อตรวจวัดการจัดระเบียบและการเคลื่อนไหวระดับโมเลกุลในเนื้อเยื่อต้นแบบ

นาวสาวเจษฎี ม่านสะอาด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974 - 632 - 611 - 2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16655321

BROMCRESOL PURPLE AS AN OPTICAL PROBE FOR MONITORING MOLECULAR ORDER AND MOTION WITHIN MODEL MEMBRANE

Miss Jasadee Mansa-ard

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmaceutical Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1995

ISBN 974 - 632 - 611 - 2

Thesis Title	Bromcresol Purple as an Optical Probe for Monitoring Molecular Order and Motion within Model Membrane.
By	Miss Jasadee Mansa-ard
Department	Pharmaceutical Chemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Usa Glagasigij, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Master's Degree

Santi Thoongsuwan .....Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Suttatip Chantaraskul .....Chairman

(Associate Professor Suttatip Chantaraskul, M.Sc. in Pharm)

Usa Glagasigij .....Thesis Advisor

(Assistant Professor Usa Glagasigij, Ph.D.)

Mitr Pathipvanich .....Member

(Mitr Pathipvanich, Ph.D.)

Panida Vayumhasuwan .....Member

(Panida Vayumhasuwan, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เจษฎ์ ม่านสะอาด : การใช้ บรอมครีซอล เพอเพิล เป็นออพติคอลโพรบ เพื่อตรวจวัดการจัดระเบียบและการเคลื่อนไหวระดับโมเลกุลในเนื้อเยื่อต้นแบบ (BROMCRESOL PURPLE AS AN OPTICAL PROBE FOR MONITORING MOLECULAR ORDER AND MOTION WITHIN MODEL MEMBRANE) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. อุษา กล้ากสิกิจ, 93 หน้า. ISBN 974-632-611-2

บรอมครีซอล เพอเพิล เป็นสีที่มีคุณสมบัติเป็นกรด จัดอยู่ในกลุ่มซัลฟอนธาลีน การเปลี่ยนแปลงสเปคตราการดูดกลืนแสงของบรอมครีซอล เพอเพิล สามารถนำมาใช้ในการตรวจวัดสภาวะเหลวและการจัดเรียงตัวของแผ่นเนื้อเยื่อไขมันได้ บรอมครีซอล เพอเพิล ชอบอยู่ในเนื้อเยื่อที่มีสภาวะเหลวมากกว่าสภาวะแข็ง โมโนเมอร์ของบรอมครีซอล เพอเพิล พบในสภาวะเหลว (ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด 598 นาโนมิเตอร์) อย่างไรก็ดี เมื่อแผ่นเนื้อเยื่อมีความหนาแน่นเพิ่มมากขึ้น บรอมครีซอล เพอเพิล จะจัดเรียงตัวใหม่ในลักษณะไดเมอร์ (ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด 557 และ 575 นาโนมิเตอร์) แผ่นเนื้อเยื่อที่มีสภาวะเหลวสูงจะมีผลทำให้ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดของโมโนเมอร์เพิ่มขึ้น เนื่องจากสีสามารถแทรกตัวลงไปในบริเวณไฮโดคาร์บอนได้ลึกมากขึ้น การเติมคอเลสเทอรอลลงไปในแผ่นเนื้อเยื่อลิโปโซมที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนสภาวะทำให้แผ่นเนื้อเยื่อมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดไดเมอร์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ดี ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนสภาวะ คอเลสเทอรอลส่งผลให้แผ่นเนื้อเยื่อมีความเหลวมากขึ้น โมโนเมอร์จึงเพิ่มขึ้นและเมื่อมาอยู่ใกล้กันมากๆ จะเกิดเป็นไดเมอร์ทำให้ไดเมอร์แบนด์ใหญ่ขึ้น การเกิดโดเมน ซึ่งเกิดจากการผสมที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันของฟอสฟอลิปิดที่มีความยาวของเส้นเอซิลไม่เท่ากัน ทำให้แผ่นเนื้อเยื่ออยู่ในลักษณะหลวม ดังนั้นบรอมครีซอล เพอเพิล จึงสามารถแทรกตัวลงไปในแผ่นเนื้อเยื่อได้ง่ายขึ้นและทำให้เกิดไดเมอร์ซึ่งเป็นผลจากการเหลื่อมซ้อนกันของไพอิเลคตรอนบนบรอมครีซอล เพอเพิล สองโมเลกุล การเพิ่มขึ้นอย่างมากของโมโนเมอร์ในแผ่นเนื้อเยื่อซึ่งมีประจุเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเนื้อเยื่อที่เป็นกลาง อาจเป็นผลเนื่องจากการมีปฏิกิริยาทางไฟฟ้าต่อกันระหว่างโมเลกุลของสีและโมเลกุลที่ให้ประจุ การใส่อนุพันธ์ของคอเลสเทอรอล ทำให้สภาวะเหลวในแผ่นเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลตรงข้ามกับผลของคอเลสเทอรอล และสภาวะการรบกวนดังกล่าวเพิ่มขึ้นตามความยาวของอนุพันธ์ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากสเปคตราการดูดกลืนแสงของบรอมครีซอล เพอเพิล มีความง่ายและชัดเจนต่อการแปลผล และไวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและส่วนประกอบของแผ่นเนื้อเยื่อต้นแบบ ดังนั้นจึงสามารถนำบรอมครีซอล เพอเพิล ไปใช้เป็นออพ ติคอลโพรบในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในโครงสร้างและหน้าที่ของแผ่นเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต

ภาควิชา.....เภสัชเคมี.....
สาขาวิชา.....เภสัชเคมี.....
ปีการศึกษา....2538.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C675238 **MAJOR** PHARMACEUTICAL CHEMISTRY
KEY WORD : FLUIDITY/ BROMCRESOL PURPLE/ 1,6-DIPHENYL-1,3,5-HEXATRIENE/ FLUORESCENCE POLARIZATION
JASADEE MANSA-ARD: BROMCRESOL PURPLE AS AN OPTICAL PROBE FOR MONITORING MOLECULAR ORDER AND MOTION WITHIN MODEL MEMBRANE. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. USA GLAGASIGIJ, Ph.D. 93 pp.
ISBN 974-632-611-2

Bromcresol purple(BCP) is an acid dye belonging to sulfonphthalein group. Changes in absorption spectra of BCP are utilized for monitoring membrane bilayer fluidity and degree of lipid packing. BCP binds preferentially to fluid phase lipid in greater extent than a gel phase one. Monomer (λ max 598 nm.)of BCP is found in fluid phase, however in higher membrane density, BCP reorients to be dimer conformations((λ max 557 and 575 nm). A bathochromic shift of monomer maxima is achieved in more fluid membrane due to deeper penetration of dye into hydrocarbon region. Addition of cholesterol to liposomal membrane produces condensing effect in lipid above its phase transition temperature(T_c), consequently, promoting dimer formation. However, increasing amount of BCP in lipid below its T_c is also observed due to fluidizing effect of cholesterol, then larger dimer band is illustrated as a result of close packing of BCP monomers. Appearance of domain caused by non-ideal mixing of unequal acyl chain length phospholipids loosens membrane; thus allows ease of penetration, therefore dimers are formed by overlapping of π-electrons on two BCP molecules. Much more extent of monomers illustrated in membrane incorporating charged amphiphiles compared to a neutral one suggests electrostatic interaction between dye and charged amphiphile molecules. Inclusion of cholesterol derivatives create more fluidity in membrane in the opposite way of cholesterol and degree of perturbation increases with longer chain length. Since absorption spectra of BCP are simple and clear for interpretation and are sensitive to alteration of model membrane structures and compositions; thus BCP is introduced as one of the optical probes of choice for study structural and functional events occurring in biological membrane.

ภาควิชา.....เภสัชเคมี.....
สาขาวิชา.....เภสัชเคมี.....
ปีการศึกษา.....2538.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I am sincerely indebted to my thesis advisor, Assistant Professor Usa Glagasigij, for her inestimable advice, guidance, concern, understanding, kindness and encouragement throughout the period of my graduate study.

I would like to express my thankfulness to Assosiate Professor Suttatip Chantaraskul , head of the Department of Pharmaceutical Chemistry, for her hospitality and providing facilities.

I am obligated to the members of thesis committee for their valuable scrutinizing and discussion.

Thankful expression is also extended to all staffs of the Department of Pharmaceutical Chemistry for their cooperation.

I wish to express my gratitude to the Graduate School of Chulalongkorn University for granting partial financial support.

Finally , I would like to express my indefinite gratitude to my parents for their endless love , care and encouragement throughout my study.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv
ENGLISH ABSTRACT.....v
ACKNOWLEDGEMENT.....vi
LIST OF TABLES.....viii
LIST OF FIGURES.....x
ABBREVIATIONS.....xiv
CHAPTER
I INTRODUCTION.....1
II BACKGROUND.....6
III EXPERIMENTAL.....21
IV RESULTS AND DISCUSSION.....28
V CONCLUSION.....78
REFERENCES.....83
VITA.....94

LIST OF TABLES

Page

Table 1. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from phosphatidylcholines having acyl chain length of C 12 - C 18.....32

Table 2. Peak area of monomer and dimer bands of BCP from membranes composed of various acyl chain length phospholipids.....33

Table 3. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from dimyristoylphosphatidylcholine at various temperatures.....39

Table 4. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from various mixtures of DLPC and cholesterol.....47

Table 5. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from various mixtures of DMPC and cholesterol.....50

Table 6. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from various mixtures of DPPC and cholesterol.....53

Table 7. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from various mixtures of DLPC and DPPC.....59

Table 8. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from various mixtures of DLPC, cholesterol and charged amphiphiles.....65

Table 9. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from mixtures of DMPC and cholesterol or DMPC and cholesterol derivatives....70

Table 10. Absorption intensity at each wavelength of BCP in membranes made from mixtures of DMPC, cholesterol and cholesterol derivatives.....74

Table 11. Peak area of monomer and dimer bands of BCP from membranes composed of DMPC, cholesterol and / or its derivatives.....75

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1. Fluorescence anisotropy of a cylindrically symmetric fluorophore.....14

Figure 2. Schematic representation of phospholipids.....22

Figure 3. Chemical structures of cholesterol and its derivatives (chol O - chol II).....23

Figure 4. Chemical structure of divalent anion of BCP.....24

Figure 5. Chemical structure of 1,6,-diphenyl-1,3,5-hexatriene...25

Figure 6. Absorption spectra of BCP in liposomal membranes made from phosphatidylcholines having acyl chain length of C 12 - C 18.....31

Figure 7. Peak area of monomer and dimer bands of BCP from membranes composed of various acyl chain length phospholipids.....34

Figure 8. Fluorescence polarization (A) and anisotropy (B) of DPH in phosphatidylcholine liposomes having acyl chain length of 12 - 18 carbon atoms.....35

Figure 9. Absorption spectra of BCP in liposomal membranes made from dimyristoylphosphatidylcholine at various temperatures.....38

Figure 10. Absorption spectra of BCP in membranes made from various mixtures of DLPC and cholesterol.....46

Figure 11. Fluorescence polarization (A) and anisotropy (B) of DPH in membranes made from various mixtures of DLPC and cholesterol.....48

Figure 12. Absorption spectra of BCP in membranes made from various mixtures of DMPC and cholesterol.....49

Figure 13. Fluorescence polarization (A) and anisotropy (B) of DPH in membranes made from various mixtures of DMPC and cholesterol.....51

Figure 14. Absorption spectra of BCP in membranes made from various mixtures of DPPC and cholesterol.....52

Figure 15. Fluorescence polarization (A)and anisotropy (B) of DPH in membranes made from various mixtures of DPPC and cholesterol.....54

Figure 16. Effects of cholesterol on phospholipids differing in acyl chain length as illustrated by fluorescence polarization.....55

Figure 17. Absorption spectra of BCP in membranes made from various mixtures of DLPC and DPPC.....58

Figure 18. Fluorescence polarization (A)and anisotropy (B) of DPH in membranes made from various mixtures of DLPC and DPPC.....60

Figure 19. Absorption spectra of BCP in membranes made from various mixtures of DLPC , cholesterol and charged amphiphiles.....64

Figure 20. Proposed ring structure occurred between SO_3^- of BCP and trimethylammonium group of phosphatidyl-choline.....66

Figure 21. Absorption spectra of BCP in membranes made from various mixtures of DMPC and cholesterol / cholesterol derivatives.....69

Figure 22. Absorption spectra of BCP in membranes made from various mixtures of DMPC , cholesterol and cholesterol derivatives.....73

Figure 23. Peak area of monomer and dimer bands of BCP from membranes composed of DMPC and cholesterol derivatives (1 : 0.6 , by mole).....76

Figure 24. Peak area of monomer and dimer bands of BCP from membranes composed of DMPC, cholesterol and its derivatives.....77

ABBREVIATIONS

BCP	Bromcresol purple
Chol	Cholesterol
Chol 0	Cholesterol derivative 0
Chol I	Cholesterol derivative I
Chol II	Cholesterol derivative II
DCP	Dicetyl phosphate
DLPC	Dilauroylphosphatidylcholine
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC	Distearoylphosphatidylcholine
LUVs	Large unilamellar vesicles
MC 540	Merocyanine 540
REVs	Reverse phase evaporated vesicles
SL	Stearylamine
SR	Sarcoplasmic reticulum
T_C	Phase transition temperature