

اثرات متفاوت کاروتینوئید ها بر پراکسیداسیون لیپید ها به دلیل بر هم کنش

X-ray : آنالیز پراش های غشایی

چکیده

فوايد زيستي کاروتينوئيد های خاص ممکن است به خاطر ويژگی های آنتی اکسیدانی قوی مرتبط با بر هم کنش ها با غشا باشد. بر اساس این فرضيه، ما تاثير کاروتینوئيد ها مختلف را بر نرخ های پروکسیداسیون لیپید اندازه کردیم و یافته ها را با برهم کنش هایشان با غشا مطابقت دادیم، که این ها توسط روش پراش اشعه X تعیین شد. تاثير کاروتینوئيد های هوموکایرال شامل (astaxanthin, zeaxanthin, lutein, β -carotene, lycopene) روی ایجاد هیدروپروکسید لیپید (LOOH) در غشا های غنی شده با پلی چربی های اسیدی اشباع نشده، بررسی شد. کاروتینوئيد های غیر قطبی مانند β -carotene و lycopene، ساختار دو لایه ای غشا را مختل کرده و یک تاثير اکسیدان شدید (بیش از 85 & افزایش تکشیل LOOH) را نشان دادند؛ در حالی که astaxanthin ساختار غشا را حفظ کرده و یک فعالیت آنتی اکسیدانی قوی (40 % ماهش در سطح LOOH) را شنان دادند و این یافته های تاثيرات متفاوت کاروتینوئيد ها روی پروکسیداسیون لیپید ها به علت تغيير ساختار غشا را مشخص ميکند. اين تاثيرات متغیر کاروتینوئيد ها رئي پروکسیداسیون غشا، ميتواند تفاوت ها در فعالیت های زيستي شان را نشان بدهد.

1. معرفی

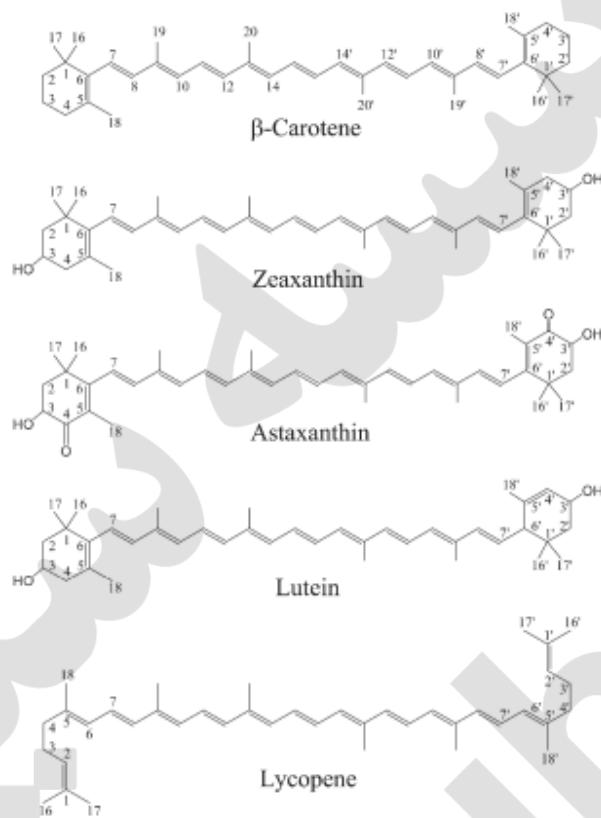
کاروتینوئيد ها یک گروه بزرگ از رنگدانه ها هستند که به طور طبیعی پدید می آيند و در گیاهان ، جلبک های دریایی ، و میکرو ارگانیسم ها ای مختلف یافت میشوند. تا امروز، بیش از 750 نوع کاروتینوئيد در طبیعت یافت شده است. اما فقط 24 نوع از آنها در بافت های انسانی بافت میشود. این فکر وجود دارد که کاروتینوئيد ها دارای یک اثر محافظتی در مقابل شرایط انحطاطی مانند سرطان ، امراض قلبی عروقی و آب مروارید دارند. اکثریت مطالعات همه گیر شناسی در مورد وقوع انواع مختلف سرطان و امراض قلبی عروقی یک رابطه معکوس با کاروتینوئيد های غذایی و

کاروتینوئید های موجود در خون را مشخص کرده اند. مکانیزم(ها) که کاروتینوئید ها فواید خود را ارائه میدهند کاملا درک نشده است اما ممکن است به دلیل فعالیت های آنتی اکسیدانی شان باشد. با اینکه تحقیقات قبلی در مورد فعالیت های آنتی اکسیدانی کاروتینوئید ها در ابتدا روی β -carotene متمرکز بود، دیگر کاروتینوئید ها هم تاثیرات آنتی اکسیدانی قوی تری را نشان دادن که میتواند یافته های متناقض بالینی شامل شواهدی برای افزایش خطر قلبی با β -carotene را توضیح دهد.

ویژگی رایج شمیایی کاروتینوئید ها زنجیره ای پولینی است، یک سیستم پیوند دوگانه مزدوج که ستون پشتی مولکول را تشکیل میدهد. این زنجیر ممکن است با گروه های حلقه ای پایانی شامل جایگزین های حامل اکسیژن، خاتمه یابد. سیستم مزدوج غنی از الکترون پولین، مسئول خواص آنتی اکسیدان کاروتینوئید هاست، هم با دفع اکسیژن ها تک و هم پاکسازی رادیکال ها تا به این طریق واکنش های زنجیره ای را خاتمه دهد.

Woodall و همکارانش، گزارش کردند که ظرفیت های آنتی اکسیدان کاروتینوئید ها مختلف در لیپوزوم ها بسیار متفاوت از محلول های آزاد است و ارائه داشتند که ویژگی های آنتی اکسیدانی کاروتینوئید ها توسط واکنش های ذاتی شیمیایی آنها در کنار چگونگی واکنششان با دولایه غشا، تعیین میشود. این دیدگاه باعث شده است که مطالعات مختلفی برای درک بهتر واکنش های کاروتینوئید ها با غشا، با تکنیک های مختلف شامل تصویر برداری هسته ای با رزونانس مغناطیسی، تشدید برچسب اسپین پارامغناطیسی الکترون (EPR)، کالریمتري رویشی تفاضلی، اندازه گیری های فلورسنتی، و روش های پراش اشعه X، انجام شود. اما در واقع باید در نظر داشت که تمام آزمایشات که قبل انجام شده است روی مدل های غشایی انجام شده است که کلسترول نداشته اند. معلوم شده است که کلسترول خواص فیزیکی فسفولیپید های غشا را تعدیل میکند. با وجود شواهدی یک رابطه بین برهم کنش های غشایی کاروتینوئید ها و رفتار آنتی اکسیدانی آنها، این چنین رابطه ای تا کنون به طور مستقیم اندازه گیری نشده است. در این مطالعه، ما بر هم کنش های غشایی 5 کاروتینوئید هوموکایرال با قطبیت های متفاوت (astaxanthin, zeaxanthin, lutein, β -carotene, and lycopene) را اندازه گیری کردیم. بر هم کنش های غشایی آنها مستقیماً با اثر آنها روی پروکسیداسیون غشا های شامل کلسترول، مطابقت داده شد. نتایج این مطالعه تفاوت های

محسوس بین این کاروتینوئید ها مختلف را با توجه به اثرشان روی ساختار لیپیدی غشا و نرخ پروکسیداسیون غشا ، نشان میدهد.



شكل 1

2. مواد و روش ها

2.1. مواد

1-palmitoyl-2-oleoyl-3-sn- (DLPC) و 1,2-Dilinoleoyl-3-sn-glycero phosphatidylcholine (Alabaster, Avanti POPC) که از لیپید های قطبی (Avanti Polar Lipids) خریداری شده و در کلروفرم ذخیره شده (25 mg/ml) در دمای آن (20 °C) بوده است. کلسترول ها هم از Sigma-Aldrich (SaintLouis, MO), CaroteNature, GmbH (Lupsingen, Germany) از شرکت تمام ترانس (Sigma-Aldrich, SaintLouis, MO) و کاروتینوئید های قطبی (CaroteNature, GmbH, Lupsingen, Germany) که از از Avanti (Avanti Polar Lipids) خریداری شده و در کلروفرم (10 mg/ml) در دمای 20 °C تا زمان استفاده نگه داری شد. فرم های 3S, 3'S, 3R, 3'R zeaxanthin و astaxanthin (تمام ترانس) ، و β -carotene (تمام ترانس) ،

لutein (Switzerland), and Synchem, تمام 3R, 6'R) به ترتیب ، گرفته شده بود. ساختار مولکولی lycopene (تمام ترانس) از Chromadex (Santa Ana, CA) خریداری شده بود. کاروتینوئید های مورد استفاده در این مطالعه در شکل 1 نشان داده شده اند. هر کدام از کاروتینوئید ها در کلروفرم حل شده و غلظتش 50 mM بود و در دمای 20 °C - تا زمان استفاده نگه داری شد. معرف رنگی CHOD-iodide (ذخیره) براساس روند معرفی شده توسط el-Saadani و همکارانش ، آماده شد. آن شامل $0.2\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ ، 0.12 M KI ، 0.15 mM NaN_3 ، $0.1\text{ g/l}\text{ 10 }\mu\text{M آمونیوم مولیبدات}$ (چهار آبه) و 0.2% Triton-X100 است. معرف فعال هم به طور تازه قبل از استفاده ، توسط اضافه کردن $24\text{ }\mu\text{M butylated hydroxytoluene}$. $20\text{ }\mu\text{M EDTA}$ از ethylenediaminetetraacetic آماده شد.

2.2. آماده سازی لیپوزوم های چند لایه (مولتی لاملا)

برای آنالیز های پروکسیداسیون، لیپوزوم ها با DLPC و کلسترون در یک نسبت مولی فیزیولوژیکی کلسترون به فسفو لیپید (C/p) 0.2 آماده شدند. هر کدام از کاروتینوئید ها با غلظت $10\text{ }\mu\text{M}$ به لیپوزوم ها اضافه شدند. برای آنالیز پراش اشعه X با زوایه کوچک، از POPC برای آماده سازی غشاها به علت حساسیت کمتر به اکسیداسیون در مقایسه با DLPC و شباهتش با طول زنجیره آسیل DLPC، استفاده شد. کلسترون با سطح مشابهش در DLPC اضافه شد. کاروتینوئید ها با یک نسبت کاروتینوئید به فسفولیپید 0.07 در غشا POPC، اضافه شدند. نمونه های غشایی، آن طور که در ادامه نشان داده خواهد شد، آماده شدند. اجزای لیپیدی و کاروتینوئید ها (در کلروفرم) به لوله های آزمایش شیشه ای منتقل شده بودند و زیر جریان ثابت گاز نیتروزن خشک شده و تحت تختلاط گردابی بودند. حلال باقی مانده توسط حداقل 1 ساعت و کیوم شدن، حذف شد. نمونه ها دوباره در یک محلول بافر پراش (0.5 mM HEPES, 154 mM NaCl, pH 7.3) نگه داری شدند تا غلظت نهایی فسفولیپیدی به ترتیب 2.5 و 1.0 mg/ml برای POPC و DLPC را به دست بیاورند. لیپوزوم های مولتی لاملا با اختلاط چرخشی شدید به مدت سه دقیقه در دمای اتاق، آماده شدند. ما کارایی کاروتینوئید های اضافه شده به لیپوزوم ها را در این مطالعه اندازه نگرفیم؛ اما، مافرض کردیم اتصال 100٪ لیپوزوم ها بر اساس گزارشات قبلی از قابلیت اتصال لیپوزوم ها به

EYPC و DMPC غیر اشباع ، در محدوده ۰-۱۰ mol% رخ میدهد. غلظت های مورد استفاده در این مطالعه، زیر ۱۰ mol% با توجه به فسفولیپید ها بوده و ۵-۶.۲ mol% برای فسفولیپید ها و کلسترول بوده است.

2.3 آنالیز پروکسیداسیون لیپید ها

تمام نمونه غشا های DLPC با روی هم قرار گرفتن در یک حمام آب لرزان رو باز، در دمای ۳۷ درجه سانتگیراد، در معرض خوداکسایشی قرار گرفتند. کسری از هر نمونه (alm ۲۰) در نقطه زمانی ۴۸ ساعت از محلول جدا شده و با یک میلی لیتر از معرف رنگی CHODiodide ترکیب شد. نمونه های آزمایشی فورا با فویل پوشانده شده و در دمای ۳۶۵ اتاق برای بیش از سه ساعت در تاریکی، روی هم قرار گرفتند. مقدار جذب ها در مقابل یک CHOD خالی در ۳۶۵ نانومتر، توسط یک طیف نور سنج Beckman DU-640 اندازه گیر شد. این تحقیق بر اساس اکسیداسیون ید به تری یودید منفی توسط هیدروپروکساید ها است. غلظت LOOH مستقیماً متناسب با غلظت تری یودید بوده و با استفاده از ضریب جذب مولی $\epsilon = 2.46 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4 آماده سازی نمونه ها برای آنالیز پراش پرتو X

همانگونه که در قبل توصیف شد، نمونه های غشا برا آنالیز پراش پرتوی X هماهنگ شده بودند. کسر هایی شامل $250 \mu\text{g}$ از کیسه های مولتی لاملا (بر اساس فسفولیپید ها) به سلول های رسوبی لوسيت که به صورت سفارشی طاحی شده بودند، منتقل شدند و هر کدام از آن ها دارای یک بستر فویل آلومینیوم بودند که روی آن پلت های تک غشا برا جمع آوری شود. سپس نمونه ها به یک روتور نوسانی سانتریفیوژی (Dupont Sorvall AH-629 Corp., Wilmington, DE) منتقل شدند و در $35,000 \times g$, 5°C در مدت ۱ ساعت سانتریفیوژ شدند. بعد از این سوی غشا، شناور ها جدا شده و بستر فویل آلومینیوم، که از پلت های غشا برا پشتیبانی میکرد، از سلول های رسوبی جدا شده و روی اسلاید های شیشه های محدب قرار داده شد. سپس نمونه ها در ثوطی های برنجی سرپسته قرار گرفتند که در آنها رطوبت و دما حین آزمایش پراش X تحت کنترل بود. تارتارات سدیم پتاسیم ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$)

L تارتاریک اسید ($K_2C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2}H_2O$) به ترتیب برای سطوح رطوبت 74% و 87% در مای NaK \cdot $4H_2O$ درجه سانتیگراد مورد استفاده قرار گرفتند.

2.5 آنالیز پراش اشعه ایکس با زاویه کوچک

غشا های تنظیم شده برای قرار گرفتن در معرض اشعه ایکس تنظیم شده تکفام تولید شده توسط Rigaku ، ژنراتوری ریزمترکر با تابش بالا، تنظیم شدند. (Rigaku-MSC, The Woodlands, Rotaflex RU-200 TX) اشعه های ایکس آنالیزی، توسط بمباران الکترونی یک اند مسی چرخان تولید شده و توسط یک فویل نازک نیکلی فیلتر شدند تا یک پرتو CuK α تکفام را ایجاد کنند. ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$; $K\alpha_1$ and $K\alpha_2$) تصفیه نشده کولیماسیون اشعه ایک هم با استفاده از یک آینه تک فرانک، به دست آمد. اطلاعات پراشی هم روی یک آشکار ساز الکترونی تک بعدی حساس به موقعیت، (Hecus X-ray Systems, Gra Austria) با فاصله ای 150mm از نمونه، جمع اوری شد. هر پیک پراش همانطور که در قبل توضیح دادیم، اصلاح لورنتس و پس زمینه شد. فاز های اطلاعات پراش هم توسط آنالیز افایش حجم، با استفاده از محلول های اشباع شده از نمک های زیر (با رطوبت های داخل پرانتز) تعیین شدند : اسید تارتاریک (74٪) ، تارتاریت سدیم پتاسیم (87٪) ، و آمونیوم دی هیدروفسفات (93٪). تبدیلات فوریه اطلاعات به دست آمده از پراش اشعه ایکس توسط مدول های برنامه ای سفارشی نوشته شده برای OriginLab Co., Northampton, MA (Origin) تولید شده و توزیع چگالی الکترونی در زمان متوسط را فراهم میکند. (فاصله \AA , vs. electrons/ \AA^3)

به علاوه بر کالیبراسیون مستقیم، مونوهیدرات کریستالین کلسترول برای تایید کالیبراسیون آشکار ساز، مورد استفاده قرار گرفت.

این تکنیک امکان اندازه گیری دقیق خصلت تناوبی واحد سلول ، یا فضای d ، مربوط به غشای لیپیدی دو لایه، را فراهم میکند که فاصله مرکز یک لیپید دولایه تا دیگری ، شامل هیدراسیون سطح ، است، فضای d برای نمونه های غشایی چندین دولایه ای، با استفاده از قانون Bragg محاسبه شد :

$$h\lambda = 2d\sin\theta$$

که در آن ، h شماره ترتیب پراش، λ طول اشعه ایکس (1.54 \AA)، d خصلت تناوبی واحد سلولی غشای لیپیدی دو لایه شامل هیدراسیون سطحی، و \emptyset زاویه Bragg معادل با نصف زوایه بین اشعه برخورد و اشعه پراکنده شده است.

3. نتایج

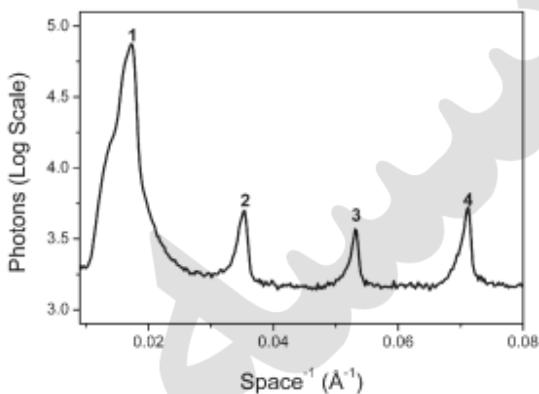
3.1. اثرات کاروتینوئید ها روی ساختار غشا

یک معرف الگوی پراش مدل غشایی POPC همراه با کلسترول و نسبت موبی $p/c = 0.2$ در شکل 2 نشان داده شده است. شکل 3 نشان دهنده پروفایل های چگالی الکترونی غشا ها است که از اطلاعات پراش اشعه ایکس با زاویه کوچک، به دست آمده است. برای درک تاثیر کاروتینوئید ها روی ساختار غشا، چگالی الکترونی روی مقیاس مشابه قرار گرفته است. دو پیک در چگالی الکترونی رو هر طرف متقارن مرکزی پروفایل، مربوط به گروه های سر فسفولیپید ها هستند در حالی که کمترین چگالی الکترون در مرکز غشا مربوط به بخش های ترمنالی متیل فیفولیپید در زنجیر آسیل است.

با انتظاراتی که از astaxanthin میرفت، کاروتینوئید ها چگالی الکترونی مربوط به مرکز غشای هیدروکربنی را در یک منطقه وسیع، را $\text{\AA} \pm 10$ از مرکز غشا را تغییر دادند. (شکل 3 و 5) برای ارزیابی اثر کاروتینوئید ها بر ساختار غشا، ما پروفایل های چگالی الکترونی نمونه های حاوی کاروتینوئید را از نمونه های دستکاری نشده، کم کردیم (شکل 5). بیشترین تاثیر مختل کننده توسط β -carotene، lutein، lycopene، و سپس zeaxanthin بود. به علاوه برای کاهش در چگالی الکترونی مناطق زنجیر آسیل، این کاروتینوئید ها با اثر گذاری، باعث (شکل 5) افزایش در عرض غشا شدند (جدول 1).

ما همچنین اثر این ترکیبات بر ساختار غشا را در حالتی که فشار هیدرو استاتیک برای تنظیم غشای لیپیدی کاهش یافته یود، اندازه گیری کردیم/کاهش در رطوبت مربوطه از 87٪ به 74٪ اثرات اخلالی کاروتینوئید ها را کاهش داده و باعث کاهش در تغییر در عرض غشا شد. (جدول 1) این تاثیر مخصوصا در مورد lycopene کاملا محسوس بود. (شکل 4) این مشاهدات این فرضیه را حمایت میکند که کاروتینوئید ها تاثریات خود روی غشا را از طریق یک

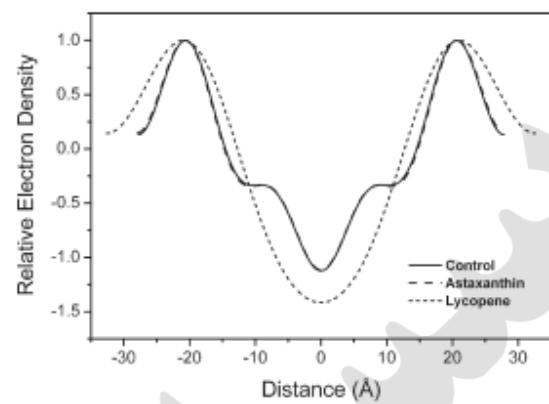
mekanizm biophysikي عمال ميكنند. اگر تغييرات ذاتا بيوشيميايی بودند، مانند شکافتن زنجيره های اسيل، تغييرات فيزيكى تحمل شده، اين برگشت پذيرى را نشان نميدادند.



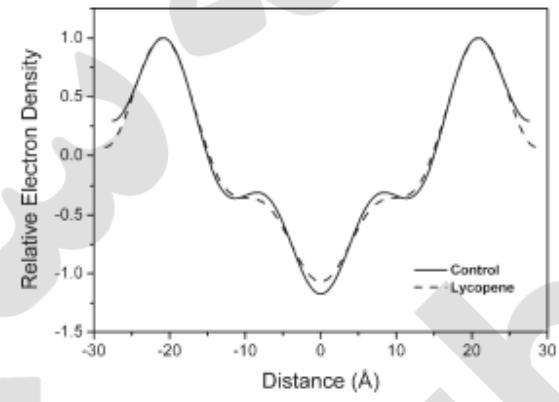
شكل 2

3.2. تاثيرات کاروتينوئيد ها روی پروکسیداسيون ليبيد

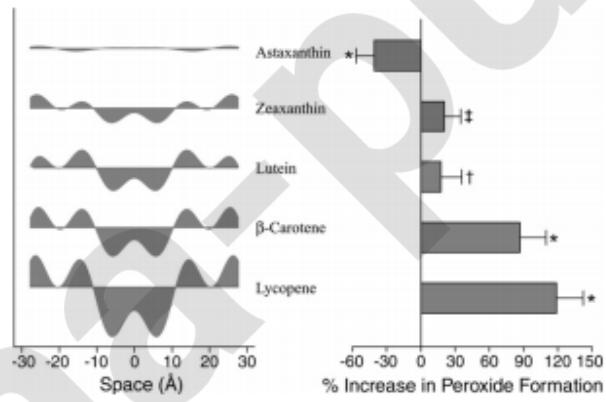
هر کدام از کاروتینوئيد ها به غشا ترکيبي DLPC/cholesterol (C/P 0.2) در $10 \mu\text{M}$ اضافه شدند و غشا های حاصل شده در معرض خوداكسايشي در دمای 37 درجه سانتيگراد برای 48 ساعت قرار گرفتند. درجه پروکسیداسيون غشا در درصد افزایش يا کاهش تشکيل LOOH در مقایسه با گروه های کنترلی بدون کاروتینوئيد، نشان داده شده بود. يك رابطه مثبت قوي بين درجه پروکسیداسيون غشا و اختلال غشا که توسط کاروتينوئيد های اضافه شده بود، وجود داشت. *Astaxanthin* يك کاهش محسوس 41٪ در پروکسیداسون غشا را نشان داد (شكل 5) و ساختار غشا را نيز حفظ ميکرد. اما در مقابل، کاروتينوئيد های ديگري غشا دو لايه را مختل کرده و فعاليت های اكساييشی را ايجاد کردن. بيشترین فعاليت های اكساييشی با *lycopene* مشاهده شد. (119٪) و سپس *zeaxanthin* (21%)، *lutein* (18%)، و *β-carotene* (87%) (شكل 5).



شكل 3



شكل 4



شكل 5

بحث 4

یافته مهم این مطالعه این است که کاروتینوئید ها دارای اثرات متغیری بر نرخ پروکسیداسیون غشا دارند که مرتبط با بر هم کنش های آن ها با غشا است. کاروتینوئید های غیر قطبی (β -carotene, lycopene) تراکم فسفولیپید های زنجیره آسیلی را به گونه ای به هم زده که مرتبط با فعالیت های قوی اکسایشی است. در مقابل، افزودن astaxanthin، به غشا ساختار غشار متشکل از اجزای لیپیدی را تغییر نداد. نتیجه اینکه، astaxanthin بقیه، دارای ویژگی های آنتی اکسیدانی تحت شرایط یکسان را داشت. ازین رو، ویژگی های معمول شیمیایی کاروتینوئید ها (مانند حضور زنجیره مرکزی پولین) ممکن است تنها تعیین کننده خاصیت آنتی اکسیدانی یا اکسایشی آنها نباشد. برای به دست آوردن این چنین نتیجه ای، مهم است که مطمئن شویم که تفاوت ها در فعالیت های پروکسیداسیون لیپیدی، ویژگی های ذاتی ساختار ان ها را تحت تاثیر قرار نمیدهد. برای این لیلی، POPC به علت حساسیت کم ش به اکسیداسیون لیپید در مقایسه با DLPC انتخاب شد، که با پلی اسید های چرب اشباع نشده غنی شده بود. آزمایشات قبلی در آزمایشگاه ما نشان داد که اکسیداسیون لیپید به شدت تراکم لیپید و ساختار دولایه غشا را تحت تاثیر قرار میدهد، و بنابراین میتواند تغییرات ساختاری غشا را که در اثر افزودن کاروتینوئید ها ایجاد شده است را مبهم کند. به علاوه، Woodall و همکارانش، گزارش کردند که همه ی کاروتینوئید ها (β -carotene, astaxanthin, zeaxanthin, and lycopene) که در مطالعه آن ها بررسی شدند، در محلول ارگانیکی که ساختار غشا مدنظر نبود، فعالیت های آنتی اکسیدانی را نشان دادند، که astaxanthin و lycopene کمترین اثر را داشتند. هنگامی که کاروتینوئید ها به یک سیستم غشایی متراکم (لیپوزوم) اضافه شدند، آنها اثرات محافظتی متفاوتی را نشان دادند، شامل بر هم کنش های غشا- گاروتینوئیدی که یک عامل مهم برای تاثیر فعالیت های آنتی اکسیدانی آن ها است.

اثرات متفاوت کاروتینوئید ها روی پروکسیداسیون غشا ممکن است به طور قسمی مربوط به، جهت گیری و مکانشان روی غشا باشد. هم رزونانس رامان و هم طیف سنجی دورنگی، برای اینکه نشان دهنده کاروتینوئید های غیر قطبی در عمق مرکز آب گریز و به صورت عمود بر محور طولی فسفولیپید های زنجیره ای آسیل قرار میگیرند. متعاقباً، همانطور که در این مطالعه مشاهده شد، این مولکول های سخت و میله مانند، استکام میان مولکولی مولکول

های فسفولیپیدی را به علت کاهش چکالی مولکولی به هم میزنند. مطابق با یافته های ما، نالیز پراش اشعه ایکس توسط Suwalsky و همکارانش، نشان دادند که lycopene یک اختلال ساختاری در زنجیرهای آسیل غشا های DPPC را هنگامی که در سطح 2.5 mol % اضافه شد، ایجاد کرد، همانطور که با تضعیف پیک تراکم زنجیره ای آسیل توسط گرام های پراش، نشان داده شد. برچسب اسپینی ERP و مطالعات ناهمسانگردی، به ترتیب، برای نشان دادن تاثیرات اخلاقی غشایی lycopene و β -carotene استفاده شدند.

Sample	d-Space (Å)	
	87% RH	74% RH
Control	57	55
Astaxanthin	57	55
β -Carotene	61	57
Zeaxanthin	58	57
Lutein	61	56
Lycopene	66	57

جدول 1

کاروتینوئید های قطبی، مانند astaxanthin و zeaxanthin، به نظر میرسد که با گروه های قطبی پایانی خود به پل میشوند و به سمت مناطق قطبی غشا دولایه، قرار میگیرند و در یک حالت موازی با غشا، پل میشوند. اما، این چنین جهت گیری کاروتینوئید ها ممکن است به شت تحت تاثیر ترکیبات لیپید (مانند طول زنجیر آسیل، درجه اشباع) غشا باشد که باعث شرایط عدم تطابق بالقوه بین کاروتینوئید ها و غشا شود. Gruszecki پیشنهاد داد که zeaxanthin مانند یک پرج عمل میکند که غشا را در جهت خودش محکم میکند. این دیدگاه با (5) mol% با استفاده از غشا های DMPC، DPPC و phosphatidylcholine زرده تخم، در آنالیز های پراش اشعه ایکس، ناهمسانگردی و H-NMR تایید شد. در مقابل، Lazrack و Suwalsky گزارش دادند که هیچ اثری از zeaxanthin روی EYPC و DPPC حتی در افزایش های بیشتر (9 to 10 mol %) توسط به ترتیب آنالیز پراش اشعه ایکس و اندازه گیری تورم اسمزی لیپوزوم ها، دیده نشد.

مطالعات مختلف EPR نشان دادند که کاروتینوئید های طبی (zeaxanthin, violaxanthin, and lutein) آبگونی غشا های phosphatidylcholine را در فاز مایع کریستالین کاهش داده و باعث افزایش پارامتر های نظم دولاوایه غشا، مخصوصا در مرکز یا منطقه هسته آبگریز شدند. آبگریزی غشا میتواند یک نقش بسیار مهم در تعیین

حساسیتش به اکسیداسیون را ایفا کند ، زیرا نه تنها نفوذپذیری غشا نسبت به مولکول های قطبی را محدود میکند بلکه عمق نفوذ یونی در غشا دو لایه را نیز محدود میکند. Subczynski و Wisniewska با استفاده از تکنیک EPR و پرور گذاری ر عمق های مختلف در غشا، حالت مانع هیدروفوبی را تخمین زدند که با مقدار نفوذ آب در غشا تعیین میشود. در مطالعه آنها، کاروتینوئید ها قطبی، zeaxanthin، lutein و violaxanthin، آبگریزی مربوط به مرکز دولایه غشا را در 10 mol%， افزایش دادند ، اما آبگریزی در گروهای سر منطقه قطبی، کاهش دادند. درجه ای طول زنجیره آسیل و عدم اشباع بودن لیپید ها هم بر آبگریزی غشا تاثیر داشت : زنجیر های بلندتر آسیل تاثیر کاروتینوئید های قطبی را در گروهای سر منطقه قطبی کاهش داند، اما در هسته هیدروکربنی تاثیری نداشتند. در غشا های اشباع نشده EYPC ، آب گریزی هسته هیدروکربنی ، در مقایسه با غشا های phosphatidylcholine اشباع شده ، به یک سطح بالاتر ، افزایش یافته بود.

یک ملاحظه اولیه برای برهمکنش مساعد بین غشا و کاروتینوئید خاص ، طول مولکولی آن است. طول مولکول های zeaxanthin ، که به عنوان فاصله ای بین گروه های هیدروکسیل روی حلقه های پایانی متقابل تعریف میشود، 32 Å است. طیف نگاری دو رنگی خطی نشان داد که zeaxanthin زاویه های شیب قائم بر صفحه دولایه غشا انتخاب میکنند که تابعی از ضخامت غشا است تا بتوانند با بهترین جهت گیری ، نفوذ مناسب را ایجاد کند ؛ هنگامی که ضخامت هسته آبگریز غشا های DMPC (25 Å) و EYPC (23 Å) را با هم مقایسه میکنیم، که به عنوان فاصله ای بین گروه های استر کربونیل دو سر متقابل مولکول فسفولیپیدی تعریف میشود، زاویه 24 درجه برای DMPC مشاهده شد در حالی که زاویه عریض تر 44 درجه برای EYPC مشاهده شد. با مقایسه با مطالعاتی که در POPC بالا بحث کردیم، سیستم غشای ما دارای یک عرض غشایی بزرگتر حدود 36 Å ، به دلیل زنجیر آسیل میزبان و zeaxanthin ممکن است اثرات اخلاقی این کاروتینوئید در مطالعه فعلی را توضیح دهد. (شکل 5) یه علاوه عرض غشا، مشخص شده است که حضور پیوند های اشباع نشده در زنجیره آسیل متواند توانایی کاروتینوئید ها را برای تغییر غشا ، تحت تاثیر قرار دهد. Subczynski و همکاران ، مشاهده کردند که تاثیرات مرتب سازی

zeaxanthin در غشا های EYPC کمتر از DMPC معلوم بود. آنها پیشنهاد کردند که محور بلند کاروتینوئید های میله ای موازی با زنجیره های آسیلی اشباع شده قرار میگیرند و بنابراین ساختار گسترش دهنده زنجیره های لیپیدی هیدروکربنی را بهبود میدهند. تاثیر مرتب سازی ساختار لیپیدی در غشا هایی که زنجیره های آسیلی غیر اشباع داشتند، کمتر مشهود بود، مانند POPC و دلیلی آن هم حضور پیوند های دوگانه سیس بود.

با وجود شباهت ساختاری با zeaxanthin، astaxanthin (طول مولکولی 32 \AA) به طور محسوسی چگالی الکترونی غشا های مطالعه شده را تغییر نداد. (شکل 3 و 5). تنها تفاوت شیمیایی این دو، وجود یک گروه کتونی در جایگاه های C4 و C4' در حلقه های پایانی astaxanthin، است که ممکن است باعث ثبات بیشتر بر هم کنش های غشایی، astaxanthin، با توجه به گروه های ترمینالی قطبی، بشود. (شکل 1) این باعث میشود که این امکان برای بقیه مولکول بوجود آید که به کل عرض غشا پل بشود. این تنظیم که توسط Woodall و همکاران رائئه شد، باعث بهبود فعالیت آنتی اکسیدانی، با فراهم کردن محافظت از داخل کل عمق غشا، میشود و با پخش رادیکال های آزاد در هسته آبگریز تداخل پیدا کرده، و رادیکال های ایجاد شده در سطح غشا را دفع میکند. Goto و همکاران، گزارش دادن که هنگامی که astaxanthin جهت گیری مناسب خود را در غشا به دست می اورد، نیمه ای قطبی حلقه های ترمینالی آن میتواند رادیکال ها را هم در داخل غشا و هم در سطح غشا به طزیق پیوند های هیدروژنی میان مولکولی و داخل مولکولی، به دام بیندازد. این چنین روابط ساختاری - فعالیتی، برای astaxanthin، باعث فعالیت های قوی آنتی اکسیدانی در غشا شده است.

Lutein، یک ایزومر ساختاری قطبی دی هیدروکسی از zeaxanthin، باعث ایجاد اخلال غشایی ای کمی بیشتر از zeaxanthin شد. (شکل 5) گزارش شده است که Lutein کاملاً متفاوت با zeaxanthin، در تغییر غشا عمل میکند و دلیلش هم تغییرات ظریف غشا در یک حلقه ای ترمینالی است (ϵ -ring). در lutein، یک پیوند دوگانه در حلقه ϵ بین C5' و C4' قرار گرفته است که آن را از پیوند دوگانه بین C5 و C6' در حلقه پایانی β در

zeaxanthin متفاوت میسازد (شکل 1)