

Биолог. журн. Армении, 1-2 (59), 2007

УДК 577.3:615.771.7:534.121.2

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ С БИСЛОЙНЫМИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ В РАЗЛИЧНЫХ ИОННЫХ СРЕДАХ

А.Е. ЗАКАРЯН, Н.А. САРКИСЯН, Н.А. ЗАКАРЯН, А.А. ТРЧУНЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра биофизики, 0025*

Исследовано взаимодействие колхицина, фторафура, сарколизина, тиофосфамида, инклофосфана и 5-фторурацила с бислойными фосфолипидными мембранами в различных солевых средах. Показано, что исследуемые противоопухолевые препараты вызывали заметные изменения некоторых параметров, характеризующих физические свойства этих мембран (потенциал разрыва, электрическое сопротивление и время жизни), при этом наибольшее воздействие оказывал колхицин. Эти изменения могут быть обусловлены взаимодействием препаратов с молекулами фосфолипидов в бислое, при этом изменение физических свойств мембран не зависело от солевого состава среды.

Դետազոտված է կոլիխիցինի, ֆտորաֆուրի, սարկոլիզինի, թիոֆոսֆամիդի, ցիկլոֆոսֆանի և 5-ֆտորուրացիլի փոխազդեցությունն երկշերտ ֆոսֆոլիպիդային թաղանթների հետ տարբեր աղային միջավայրերում: Ցույց է տրված, որ ուսումնասիրվող հակաոնկոցրային պրեպարատները բերում են այդ թաղանթների որոշ ֆիզիկական հատկությունները բնութագրող չափանիշների (խզան պոտենցիալ, էլեկտրական դիմադրություն և կյանքի տևողություն) նկատվող փոփոխությունների, ընդ որում առավել ուժգին է կոլիխիցինի ներգործությունը: Ղրանը կարող են պայմանավորված լինել երկշերտում ֆոսֆոլիպիդների մոլեկուլների հետ արեպարատների փոխազդեցությամբ, ընդ որում թաղանթների ֆիզիկական հատկությունների փոփոխությունը կախված չէ միջավայրի աղային կազմից:

The interaction of colchicine, fluorouracil, sarcosylin, thiophosphamide, cyclophosphane and 5-fluorouracyl with bilayer phospholipid membranes was investigated within different salt medium. It was shown that these anticancer preparations caused marked changes in the parameters characterizing physical properties of the membranes (breakdown potential, electrical resistance and survival time). These changes could be resulted from interaction of the preparations with phospholipid molecules in bilayer, and they did not depend on salt composition of the medium

*Бислойные мембраны - потенциал разрыва - электрическое сопротивление*

Искусственные бислойные липидные мембраны (БЛМ), сформированные из обычных фосфолипидов, полученных из тканей животных, могут являться адекватной моделью липидного бислоя биологической мембраны клеток человека и животных [1, 6, 12, 13]. При этом БЛМ обладают физическими свойствами, которые могут претерпевать изменения в различных

ионных средах и в зависимости от концентрации соли [11].

Нарушение свойств липидного бислоя не только сопровождается многими заболеваниями, но и во многих случаях является причиной развития патологических процессов в клетках, тканях и организме в целом [2, 5]. Используя свойства и методические возможности БЛМ, особенно метод фиксации напряжения, можно изучить природу и механизмы действия различных биологически активных соединений, в том числе и фармакологических препаратов [4, 10].

Целью данной работы было исследование некоторых физических параметров БЛМ в присутствии противоопухолевых препаратов (ПОП) в различных ионных средах.

**Материал и методика.** Экстракцию общих фосфолипидов из мозга крупного рогатого скота проводили по методу Мюллера с соавторами [9]. Бислойные мембраны из полученных липидов формировали на отверстиях в перегородке тефлоновой камеры по методу Мюллера и Монталя [8].

Измерение и определение электрических параметров БЛМ проводили по методу фиксации напряжения на электрометрической установке с высокоомным дифференциальным усилителем с обратной связью "Keithley 301" (США) [13]. Суть этого метода заключается в поддержании приложенного потенциала на мембране на заданном уровне независимо от ионных потоков.

Сопротивление мембраны ( $R_m$ ) рассчитывали по формуле:  $R_m = U_m R_f / U_{изм}$ , где  $U_m$  — измеремое напряжение (показатель на самопишущем потенциометре);  $R_f$  — заданное сопротивление цепи (сопротивление обратной связи);  $U_{изм}$  — разность потенциалов на мембране. Однако с целью стандартизации работы с различными камерами, имеющими разные диаметры отверстия для формирования БЛМ, вместо значения  $R_m$  рассчитывали величину удельного сопротивления мембраны ( $R_{уд}$ ):  $R_{уд} = R_m / S$ , где  $S$  — площадь мембраны и 0,5024 мм<sup>2</sup>. с учетом радиуса отверстия на перегородке измерительной камеры, на котором формируется мембрана, равного 0,4 мм.

Потенциал разрыва БЛМ определяли как пороговое значение плавно подаваемого напряжения на мембрану, при котором она разрывается.

В работе использовали коммерческие ПОП, конечная концентрация испытуемых соединений в обоих отсеках тефлоновой ячейки составляла  $2 \cdot 10^5$  М, что обеспечивалось добавлением растворов этих препаратов в объеме 0,2 мл и призмембранные отсеки ячейки объемом по 5 мл.

Все опыты проводили в экранированной камере и в зависимости от степени воспроизводимости повторяли в среднем 9-10 раз. Результаты обрабатывали статистически с определением стандартной ошибки.

**Результаты и обсуждение.** Для изучения взаимодействия ПОП с БЛМ вначале были определены некоторые электрометрические параметры, характеризующие физические свойства БЛМ (электрическое сопротивление, потенциал разрыва и время жизни), сформированных из общих фосфолипидов мозга крупного рогатого скота [9]. При этом время жизни этих мембран составляло не менее 3 ч, что было достаточно для проведения экспериментов. В течение указанного времени наблюдалось стабильное значение электрических показателей БЛМ.

Из данных, полученных в опытах (табл. 1), следует, что в принципе значения электрического сопротивления и потенциала разрыва БЛМ во всех исследуемых мембраноомывающих средах мало отличаются друг от друга. При этом, в случае с 0,1 М раствором CaCl<sub>2</sub> проницаемость БЛМ (судя по величинам  $R_{уд}$ ) ниже по сравнению с данными для других сред (0,1 М KCl

и 0,1 М NaCl), а потенциал разрыва почти одинаков для всех сред. Эти результаты не противоречат литературным данным [3, 11-13]. Они могут указывать на изменение электростатического взаимодействия между молекулами в бислой в зависимости от величины заряда ионов в среде.

Таблица 1. Изменение удельного электрического сопротивления БЛМ в присутствии ПОП в различных ионных средах. Ом см<sup>2</sup>

Мембраноо- мывающая солевая среда, 0,1 М	Контроль	Испытуемые противоопухолевые препараты (концентрация 2 · 10 <sup>-6</sup> М)					
		Колхицин	Фторафур	Сарколизин	Тиофосфа- мид	Циклофос- фан	5-фтор- урацил
KCl	6,80±0,43 10 <sup>10</sup>	4,46±0,18 10 <sup>1</sup>	2,31±0,45 10 <sup>1</sup>	4,6±0,3 10 <sup>1</sup>	6,35±0,37 10 <sup>1</sup>	1,62±0,33 10 <sup>1</sup>	0,73±0,20 10 <sup>10</sup>
NaCl	7,60±0,34 10 <sup>10</sup>	6,3±0,9 10 <sup>1</sup>	1,3±0,6 10 <sup>1</sup>	2,23±0,60 10 <sup>1</sup>	4,1±0,8 10 <sup>1</sup>	2,10±0,87 10 <sup>1</sup>	0,52±0,06 10 <sup>10</sup>
CaCl <sub>2</sub>	9,90±0,45 10 <sup>10</sup>	1,32±0,29 10 <sup>1</sup>	3,85±0,43 10 <sup>1</sup>	5,5±0,7 10 <sup>1</sup>	9,60±0,95 10 <sup>1</sup>	3,68±0,31 10 <sup>1</sup>	1,40±0,49 10 <sup>10</sup>

В последующих опытах исследовали влияние ПОП на электрическое сопротивление БЛМ. Согласно экспериментальным данным, представленным в табл. 1, все изучаемые вещества модифицировали бислойную фосфолипидную мембрану в сторону снижения R<sub>н</sub>, что, возможно, объясняется выраженной гидрофобностью изучаемых соединений, а также их другими физико-химическими свойствами, например, суммарными зарядными характеристиками. Последние могли способствовать ассоциированию исследуемых веществ с заряженными головками фосфолипидов, за счет чего молекулы ПОП могут абсорбироваться на поверхности мембраны или частично/либо полностью внедряться в липидный бислой, приводя к изменению его жидкокристаллической структуры с последующим изменением его физических свойств.

Было выявлено, что время жизни мембран, модифицированных с помощью исследуемых ПОП, при потенциале на мембране в 100 мВ значительно уменьшалось по сравнению с контролем и составляло всего 30-40 мин. Это, по-видимому, объясняется деструкцией мембран за счет образования дефектов в мембранной структуре, что приводит к флуктуации проводимости и других свойств БЛМ, сокращая время их жизни.

Приведенные данные (табл. 1) указывают, что в экспериментах по изучению действия ПОП на характеристики БЛМ наибольший эффект наблюдается с колхицином, который снижает R<sub>н</sub> на -3 порядка, а наименьший - с 5-фторурацилом (уменьшение на -1 порядок). Интенсивность действия ПОП на R<sub>н</sub> для БЛМ можно представить нижеприведенным рядом:

колхицин > фторафур > сарколизин > тиофосфамид > циклофосфан > 5-фторурацил.

Сравнивая эти данные с результатами по взаимодействию ПОП с биологическими структурами, полученными ранее при применении разных методических подходов (определение уровня перекисного окисления липидов,

хемилюминисцентный анализ, определение активности ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы) [2, 12, 13], отметим, что действие колхицина во всех опытах было более выражено, а действие 5-фторурацила – менее.

Было изучено также действие ПОП на потенциал разрыва БЛМ, который является важным показателем состояния липидного бислоя (табл. 2). Не затрагивая теоретическую часть вопроса относительно механизмов “электрического” разрыва БЛМ [1, 6, 12, 13], отметим, что потенциал разрыва зависит от многих факторов, в том числе и от состава и строения мембранных липидов, величины прикладываемого на бислой напряжения и присутствия модификаторов различной природы.

Таблица 2. Изменение потенциала разрыва БЛМ в присутствии ПОП в различных ионных средах, мВ

Мембраноо- мывающая солевая среда, 0,1 М	Контроль	Испытуемые противоопухолевые препараты (концентрация $2 \cdot 10^{-4}$ М)					
		Колхицин	Фторафур	Сарколизин	Тиофосфа- мид	Циклофос- фан	5-фтор- урацил
KCl	330±30	256±25	261±28	272±28	266±25	278±24	279±27
NaCl	321±25	255±24	263±25	268±24	266±26	268±23	282±25
CaCl <sub>2</sub>	341±35	256±27	263±25	269±22	276±24	274±23	293±26

Основные результаты, полученные в этих экспериментах (табл. 2), сводятся к тому, что, во-первых, нет существенной разницы между величинами потенциалов разрыва БЛМ в присутствии разных катионов в мембраноомывающих средах; во-вторых, присутствие в этих средах ПОП однозначно приводит к уменьшению значения потенциала разрыва БЛМ (от 12 % до 25 %). Здесь колхицин также вызывает наибольшее изменение. Это может быть обусловлено проникновением гидрофобных молекул ПОП в бислой, приводящим к изменению объема и структурной организации мембраны, что в свою очередь способствует ее более быстрому разрушению в электрическом поле [6, 12-13].

На основании полученных данных все результаты были сгруппированы и сравнены по отдельным группам используемых ПОП, а именно по антиметаболитам (фторафур и 5-фторурацил), по алкилирующим реагентам (циклофосфан, сарколизин и тиофосфамид) и по колхицину отдельно (табл. 1 и 2). При рассмотрении данных в этом аспекте внутри каждой группы не было обнаружено определенной закономерности по взаимодействию изучаемых соединений с БЛМ. То же самое наблюдали и при анализе результатов, полученных с использованием других методов [2, 12, 13], что также может говорить о роли структурных особенностей изучаемых соединений при их взаимодействии с биологическими структурами.

В пользу того, что изучаемые ПОП, скорее всего, взаимодействуют именно с липидными структурами, говорят данные, полученные при изучении действия этих препаратов на такие параметры БЛМ, как потенциал разрыва и время их жизни. Это, очевидно, обусловлено взаимодействием ПОП с

молекулами фосфолипидов в бислое с последующей деструкцией последнего, в том числе и изменением его толщины [11]. Обнаружение взаимодействия испытуемых ПОП с липидами в модельных экспериментах может указывать на аналогичные формы взаимодействия и на уровне клеточных структур, подтверждая литературные данные [2, 7, 10].

Анализ данных по изучению действия ПОП на БЛМ позволяет заключить, что модифицированные БЛМ не проявляют заметной ионной избирательности к исследуемым соединениям, несмотря на изменение электрических показателей. Они интересны в связи с пониманием механизмов проницаемости мембраны для различных соединений, которые должны применяться для решения биотехнологических и медицинских задач, например, при разработке новых лекарств, проникающих через мембрану [11].

Таким образом, можно допустить, что изучаемые в условиях *in vitro* процессы, приводящие к изменению свойства липидного бислоя, могут иметь место на клеточном и тканевом уровнях в организме (*in vivo*), что подлежит изучению в дальнейшем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ջոշոբյան Ա. Կենսաբանական բաղադրերը: Երևան, Չանգակ-97, 2001.
2. Владимиров Ю.А. Роль нарушения барьерной и матричной функций липидного слоя биологических мембран в патологии. М., Медицина, 1985.
3. Ивков В.Г., Берестовский Н.Г. Динамическая структура липидного бислоя. М., Наука, 1981.
4. Bemporad D., Luttmann C., Essex J.W. Biochim. Biophys. Acta 1718, 1-21, 2005.
5. Boffi E.M., Ozaki J., Matsuki N., Inaba M., Desmaras E., Ono K. J. Vet. Med. Sci. 64, 483-488, 2002.
6. Coster H.G.I. J. Biol. Phys. 29, 363-399, 2003.
7. Kulharni S.B., Betageri G.V. Cell. Mol. Biol. Lett. 2, 151-159, 1997.
8. Montal M., Mueller P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69, 3561-3566, 1972.
9. Mueller P., Rudin D., Tien H., Wescot T.J. Nature 194, 979-980, 1962.
10. Omote H., Al-Shawi M.K. Biophys J., 90, 4046-4059, 2006.
11. Petracke H.I., Tristram-Nagle S., Harries D., Kucerka N., Nagle J.P., Parsegian V.A. J. Lipid Res. 47, 302-309, 2006.
12. Tien H., Ottova A. Planar Lipid Membranes and Their Applications. Amsterdam: Elsevier, 2003.
13. Zakharyan A.E., Ayvazian N.M. In: Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. 2. 237-259, 2005.

Поступила 08.X.2006