

Действие ряда противоопухолевых препаратов на электрические параметры бислойных липидных мембран

А.Е. Закарян, Н.А. Саркисян, З.А. Закарян

Кафедра биофизики Ереванского государственного университета

375028 Ереван, ул. Чаренца, 8

Ключевые слова: противоопухолевые препараты, бислойные липидные мембраны, метод фиксации напряжения, удельное сопротивление, потенциал разрыва

Химиотерапия опухолей является одной из основных форм лечения и профилактики злокачественных новообразований [2,4]. В настоящее время актуальным является изучение природы и механизмов действия противоопухолевых препаратов (ПОП) на клеточные структуры и клетку в целом, а также поиск возможностей экспрессного тестирования ПОП по физико-химическим критериям [7]. Несмотря на то, что в научной литературе имеется много данных о взаимодействии ПОП с биохимическими компонентами клетки [5,6], тем не менее вопрос о природе их физико-химического взаимодействия с мембранными структурами и липидами до конца не выяснен [1,3]. В этом аспекте перспективным является применение метода бислойных липидных мембран (БЛМ) для оценки взаимодействия ПОП с липидными структурами мембран [6,8].

В данной работе изучалось действие некоторых противоопухолевых соединений на ряд электрических параметров фосфолипидных бислойных мембран в различных солевых растворах.

Материал и методы

Измерение и определение электрических параметров БЛМ проводилось на установке, работающей на базе дифференциального электрометрического усилителя с обратной связью «Keithley 301» (США). Исследование изучаемых параметров осуществлялось методом фиксации напряжения, суть которого заключается в поддержании мембранного потенциала на заданном уровне независимо от ионных потоков. Измерения проводились с использованием пары хлор-серебряных электродов, погруженных в исследуемый солевой раствор 0,1 М КСl в оба отсека измерительной тefлоно-

вой (фторопластовой) камеры. Для определения избирательной ионной проницаемости БЛМ при действии изучаемых препаратов были использованы также электролиты в виде растворов 0,1 М NaCl и 0,1 М CaCl₂. На самописце непрерывно регистрировалась кинетика выходного напряжения в течение 20–30 мин. Сопротивление мембраны рассчитывалось следующим образом:

$$I = U_{изм}/R_f = U_m/R_m$$

$$R_m = U_m \times R_f / U_{изм}$$

$$R_{уд} = R_m \times S$$

$$S = \pi r^2,$$

где I – ток, проходящий через мембрану; $U_{изм}$ – измеряемое напряжение; R_f – заданное сопротивление цепи; U_m – напряжение на мембране; R_m – вычисляемое сопротивление мембраны; $R_{уд}$ – «удельное сопротивление» мембраны; R – радиус отверстия на стенке измерительной ячейки, на которой формируется мембрана, 0,2 мм; S – площадь мембраны, 0,1256 мм².

Потенциал разрыва БЛМ определялся как пороговое значение плавно подаваемого напряжения, при котором мембрана разрывается. Все эксперименты проводились в экранированной камере при комнатной температуре. В качестве исследуемых веществ использовались ПОП из различных фармакологических групп, а именно:

сарколизин, тиофосфамид и циклофосфан – из алкилирующих;
5-фторурацил и фторафур – из антиметаболитов;
колхицин – из препаратов растительного происхождения.

Конечная концентрация исследуемых препаратов в обоих отсеках измерительной ячейки составляла 2,10–5 М, что обеспечивалось добавлением растворов ПОП в объеме 0,2 мл.

Для получения БЛМ был использован 10% раствор суммарных фосфолипидов, полученных из мозга крупного рогатого скота [8] в растворе хлороформ : метанол (1:2), содержащий 0,1% раствор α -токоферола и окисленного холестерина.

Эксперименты в зависимости от степени воспроизводимости повторялись в среднем 8–10 раз. Полученные результаты подвергались статистической обработке по критерию Стьюдента-Фишера и представлены в виде средних арифметических величин и их среднеквадратичных отклонений.

Результаты и обсуждение

При изучении изменения электрических параметров, а именно величины удельного сопротивления и потенциала разрыва искусственных БЛМ в присутствии колхицина, сарколизина, фторафура, циклофосфана, тиофосфамида и 5-фторурацила в разных ионных средах, содержащих как моновалентные катионы K^+ и Na^+ , так и бивалентный Ca^{2+} в виде хлоридов, было выявлено наличие их взаимодействия с БЛМ. Во всех экспериментах постоянное напряжение на БЛМ фиксировалось при значении в 100 мВ.

Результаты, приведенные в таблице, показали, что значение удельного сопротивления БЛМ во всех экс-

периментальных электролитах были схожи.

При изучении потенциала разрыва немодифицированных искусственных мембран оказалось, что этот показатель почти одинаков во всех экспериментальных средах. Некоторые отмеченные различия в значениях электрического сопротивления и потенциала разрыва для немодифицированных БЛМ, возможно, связано с физико-химическими особенностями катионов в водной среде.

В последующих экспериментах было изучено влияние ПОП на искусственные БЛМ (таблица). Как видно из полученных данных, все испытываемые соединения модифицируют вышеуказанные электрические параметры фосфолипидных мембран. При этом удельное сопротивление БЛМ во всех электролитах снижается больше всего в присутствии колхицина, а меньше – под влиянием 5-фторурацила. Так, колхицин уменьшает величину удельного сопротивления БЛМ на 3 порядка, а 5-фторурацил – на один порядок. По приведенным данным можно составить следующий ряд по степени влияния исследуемых ПОП на удельное сопротивление БЛМ: колхицин > фторафур > сарколизин > тиофосфамид > циклофосфан > 5-фторурацил. Полученные данные свидетельствуют о том, что у модифицированных препаратами мембран нет заметной ионной избирательности.

Таблица

Изменение электрических параметров бислойных липидных мембран в присутствии ряда противоопухолевых препаратов в различных ионных средах

Среда	Руд. Уразр.	Контроль	Испытуемые препараты					
			колхи- цин	фторафур	сарколи- зин	тиофосфа- мид	циклофос- фан	5-фтору- рацил
0,1M KCl	Руд. Ом	4,55.1010 ± 0,27.1010	3,17.107 ± 0,29.107	5,78.107 ± 0,45.107	1,15.108 ± 0,1.108	3,39.108 ± 0,67.108	4,06.108 ± 0,33.108	1,81.109 ± 0,2.109
	Уразр. мВ	330 ± 4	256 ± 5	261 ± 8	272 ± 8	266 ± 5	278 ± 12	279 ± 7
0,1M NaCl	Руд. Ом	3,01.1010 ± 0,38.1010	1,6.107 ± 0,06.107	3,25.107 ± 0,29.107	5,56.107 ± 0,06.107	1,03.108 ± 0,04.108	2,05.108 ± 0,08.108	0,83.109 ± 0,01.109
	Уразр. мВ	321 ± 7	255 ± 4	263 ± 5	268 ± 4	266 ± 4	268 ± 3	282 ± 5
0,1M CaCl ₂	Руд. Ом	3,55.1010 ± 0,54.1010	3,3.107 ± 0,12.107	7,13.107 ± 0,29.107	1,4.108 ± 0,09.108	2,41.108 ± 0,19.108	4,22.108 ± 0,39.108	6,02.109 ± 0,62.109
	Уразр. мВ	341 ± 10	256 ± 7	263 ± 5	269 ± 2	276 ± 4	274 ± 3	293 ± 6

В опытах по изучению потенциала разрыва бислойных мембран было выявлено, что под воздействием изучаемых препаратов устойчивость БЛМ изменяется. Согласно приведенным в таблице данным, по значению потенциала разрыва наименьшая устойчивость БЛМ наблюдалась в присутствии колхицина, а наибольшая – 5-фторурацила. Очевидно, что существует прямая корреляция между степенью модифицированности удельного сопротивления БЛМ и его потенциалом разрыва, что полностью согласуется с общепринятыми литературными данными [8].

Изучалась и выживаемость искусственных БЛМ в присутствии исследуемых противоопухолевых соединений. В ходе экспериментов было выявлено, что выживаемость фосфолипидных БЛМ составляла более чем 4–5 часов, после чего наблюдение, как правило, прекращалось. Выживаемость же модифицированных изучаемыми препаратами мембран при заданном по-

тенциале на мембрану (100 мВ) составляла всего 30–40 мин. Это свидетельствует о деструкции мембран с появлением мембранных дефектов, обуславливающих флуктуацию проводимости.

Таким образом, анализируя полученные экспериментальные данные, можно заметить, что исследуемые ПОП модифицируют фосфолипидные бислойные мембраны, вызывая уменьшение электрического сопротивления и порог потенциала разрыва последних. Это, очевидно, обусловлено взаимодействием изучаемых противоопухолевых соединений с фосфолипидами бислоя с последующей деструкцией мембран. Обнаружение взаимодействия исследуемых противоопухолевых соединений с липидами в модельных экспериментах *in vitro* может с некоторой приближенностью указывать на схожие взаимодействия и на уровне клеточных мембран в условиях *in vivo*, подтверждая имеющиеся литературные данные [1,6].

Поступила 21.01.03

Որոշ հակառնոցային պատրաստուկների ազդեցությունը լիպիդային երկշերտ քաղանքների էլեկտրական հատկանիշների վրա

Ա.Ե. Զաքարյան, Ն.Ա. Սարգսյան, Զ.Ա. Զաքարյան

Հետազոտվել է որոշ հակառնոցային պատրաստուկների ազդեցությունը ֆոսֆոլիպիդային երկշերտ քաղանքների դիմադրողականության վրա: Հայտնաբերված է, որ հակառնոցային պատրաստուկների առկայության դեպքում լիպիդային երկշերտ քաղանքների դիմադրողականությունը Ca^{2+} երկվալենտ իոնի միջավայրում նվազում է, ընդ որում մաքսիմալ ազդեցությունը նկատվում է կոլիսիցինի, իսկ մինիմալը՝ 5-ֆտորուրացիլի առկայության դեպքում:

Բացահայտված է, որ հակառնոցային դեղամիջոցները թուլացնում են լիպիդային երկշերտ քաղանքների դիմադրողականությունը մալ K^+ և Na^+ միավալենտ իոնների միջավայրերում մույն օրինաչափությամբ: Հայտնաբերված է մալ լիպիդային երկշերտ քաղանքների խզման պոտենցիալի մեծության նվազում:

Ցույց է տրված, որ բոլոր հետազոտվող հակառնոցային պատրաստուկները մոլիֆիկացնում են լիպիդային երկշերտ քաղանքները:

The influence of some anticancer preparations on electrical parameters of bilayer lipid membranes

A.E. Zakaryan, N.A. Sarkisyan, Z.A. Zakaryan

The influence of some anticancer preparations on reluctance of membranes was investigated. It was found out that level of reluctance of lipid bilayers in presence of

anticancer preparations and bivalent ions of Ca^{2+} is low; the maximal decrease takes place under influence of colchicine, and the minimal one under influence of 5-

flourouracil. It is demonstrated that anticancer preparations decrease reluctance of lipid bilayers also in presence of univalent ions of K^+ and Na^+ with the same regularity. It was revealed a decrease of break potential of lipid bi-

layers in presence of anticancer preparations. Thus, all investigated anticancer preparations modify bilayer lipid membranes.

Литература

1. Кочубей Л.Н., Татевосян К.Г. В кн.: Ревматология. М., 1985, с. 61.
2. Потапенко А.Я., Кягова А.А. Биол. мембраны, М., 1998, 15, 2, с.213.
3. Тихазе А.К., Коловалова Г.Г., Гуревич С.М. II съезд Биохим. об-ва РАН, (Тез. докл.) М., Пушкино, 1997, с. 239.
4. Anderson K.M., Ells G., Bonom P., Harris J.E. Med. Hypotheses, 1999, 52, 1, p.53.
5. Ben-Hur H., Kossoy G., Zusman I. Int. J. Oncol., 2001, 19, 2, p.407.
6. Kulharni S.B., Betageri G.V. Cell. And Mol. Biol. Lett., 1997, 2, 2, p.151.
7. Lennard L. Brit. J. Clin. Pharmacol., 1999, 47, 2, p.131.
8. Montal M., Mueller P. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1972, 69, p.3561.