



УДК 577.356:352:615.277.3:543.422.25

© 2008

Академік НАН України В. Ф. Чехун, В. М. Михайленко,
С. В. Чехун, О. В. Чалий

Аналіз особливостей структурованої води у плазматичних мембранах карциноми Герена з різною чутливістю до цис-дихлордіаміноплатини

The content of structured water in a suspension of plasma membranes (PM) isolated from Guerin's carcinoma (GC) tumor cells with different sensitivities to cis-dichlorodiaminoplatinum (cis-DDP) is studied by ^1H NMR-spectroscopy. The PM of a sensitive substrain of GC showed the increase of the total content of bound water (by 65%) and the increased ratio (2.5-fold) $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$ as compared with PM of resistant GC cells. The effect of cis-DDP was associated with an increased level of membrane hydration, especially in cells of the resistant GC substrain. The administration of cis-DDP caused the decrease (1.6-fold) of the ratio $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$ in PM of the sensitive substrain of GC, but its level in resistant cells was increased twice. The level of inter-phase energy was not changed significantly in the sensitive or resistant substrain of GC. However, after the cis-DDP treatment, we observed an increase of the inter-phase energy for the PM suspensions from sensitive and resistant GC cells (14% and 26%, respectively). The differences observed in the properties of structured water in PM of tumor cells showed its important role in rearrangements of the PM structure of tumor cells and the development of drug resistance to a cancer treatment and may contribute to the biological effect of cis-DDP.

Сучасні дослідження структури, фізико-хімічних та біологічних властивостей води виявили її фундаментальну роль у перебігу біохімічних процесів, особливо у функціонуванні білків, ДНК та інших макромолекулярних структур. За результатами експериментальних і теоретичних досліджень гідратації клітинних компонентів встановлено участь молекул води в структуруванні білків і медіюванні взаємодії через систему водневих зв'язків та потенціюванні їх енергетичних функцій. Аналіз таких молекул показав, що, використовуючи систему водневих зв'язків, вода взаємодіє з полярними атомами багатоланцюгових лігандів амінокислот білка, заповнюючи при цьому його порожнину. Знаходячись у кристалічній решітці білка, вода надає йому просторову структуру, при цьому значно впливає на його динамічні властивості [1, 2].

На поверхні біомолекул вода структурується таким чином, щоб максимально скомпенсувати локальні заряди і дипольні моменти макромолекул. За даними квантово-хімічних

розрахунків можна виділити ряд можливих структур упорядкування молекул води, які значною мірою визначають її фізико-хімічні властивості [3]. Міжводна взаємодія в біологічних системах визначається двома популяціями молекул води: одна з низькокутовими водневими зв'язками, а інша з більш високим кутом взаємодії, що обумовлює індукцію гідрофобних структур води [4].

Важливо зазначити, що гідратна вода біополімерів має властивості, які істотно відрізняються від загального об'єму води в біологічній системі. Ефекти "взаємодії" з поверхнею макромолекул не проникають на всю глибину наявної в біосистемі води, а лише включають один або два гідратні шари [2]. Більше того, молекули води по-різному взаємодіють з полярними і неполярними групами біополімерів. Полярні групи переважно безпосередньо взаємодіють з молекулами води, тоді як неполярні групи підвищують взаємодію молекул води всередині її середовища. Оскільки клітинні структури майже завжди мають гетерогенну складову, то взаємодія води з біомакромолекулами являє собою складну систему. Згідно з даними літератури [5], навколо гідрофобних молекул формується пароподібний шар величина якого пов'язана з величиною електростатичних і ван-дер-ваальсових взаємодій гідрофільних молекул з водою. Гідрофобні структури, які відштовхують молекули води, сприяють створенню більш жорсткої структури зв'язаної води навколо гідрофільних білків.

Такі переходи, які спостерігаються в при- і внутрішньомембранних структурах, радикально впливають на структуру міжмолекулярних зв'язків та поведінку біомакромолекул. Взагалі, зв'язування води з макромолекулами призводить до зміни їх конфігурації, ефективних розмірів і властивостей. Тому будь-яке варіювання білок-білкових, білок-ліпідних, ліпід-ліпідних зв'язків впливає на структуру гідратної компоненти біологічних систем, що спричиняє суттєву модифікацію їх функціонального складу. Особливого змісту і значення набувають ці явища при патологічних процесах, зокрема канцерогенезі та прогресії пухлинної хвороби [6].

Локальна структура шару води, який знаходиться навколо ланцюгів макромолекул, значно залежить від їх форми. Вода структурується на поверхні біомолекули таким чином, щоб максимально скомпенсувати локальні заряди і дипольні моменти макромолекули. Вивчення фізико-хімічних властивостей молекул структурованої води в білкових розчинах показало їх безпосередній зв'язок зі структурою білка та його просторовим упорядкуванням і взаємодією з оточуючими молекулами. При цьому загальні властивості води значною мірою залежать від властивостей мінорної фракції молекул структурованої води, які присутні в системі [7].

Сьогодні стрімко зростає арсенал методів для дослідження фундаментальних та прикладних аспектів поведінки молекул води [8, 9]. Вивчення динамічних властивостей молекул води в суспензіях плазматичних мембран (ПМ) пухлинних клітин, чутливих та резистентних до медикаментозної терапії, може пролити світло не тільки на природу цього явища, а й особливості корекції їх відповіді. Нами раніше в системі *in vivo* було встановлено особливості змін у внутрішньому інтер'єрі мембран при виникненні резистентності клітин до лікарських засобів, що приводить до підвищення їх мікрров'язкості та зменшення пасивної дифузії протипухлинних препаратів [10, 11]. Виходячи із зазначеного вище, можна думати, що рухомість жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів та білків ПМ значною мірою може залежати також і від кількості вільної та зв'язаної з ними води.

Метою нашого дослідження було вивчення методом ЯМР динамічного стану молекул води в суспензіях ПМ чутливих та резистентних пухлинних клітин карциноми Герена (КГ) при дії протипухлинного препарату цис-дихлордіаміноплатини (цис-ДДП).

Матеріали і методи. Дослідження проведені на неінбредних самцях щурів масою 120–140 г з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України у відповідності з етичними нормами поводження з експериментальними тваринами.

Моделювання пухлинного росту здійснювали шляхом перещеплення пухлин вихідного та резистентного до дії цис-ДДП підштамів КГ. Трансплантацію пухлинних клітин (підшкірно, $5 \cdot 10^{-6}$ клітин на тварину) виконували з дотриманням правил асептики. Експериментальні тварини були розділені на чотири групи: 1 (КГвих) — тваринам з вихідним підштамом КГ вводили фізіологічний розчин 5 разів через добу; 2 (КГвих+цис-ДДП) — тваринам з вихідним підштамом КГ вводили цис-ДДП 5 разів через добу; 3 (КГрез^{цис-ДДП}) — тваринам з резистентним до дії цис-ДДП підштамом КГ вводили фізіологічний розчин 5 разів через добу; 4 (КГрез^{цис-ДДП}+цис-ДДП) — тваринам з резистентним до дії цис-ДДП підштамом КГ вводили цис-ДДП 5 разів через добу.

У роботі застосовували препарат цис-ДДП (“Cisplatin-Ebewe”, Австрія), дозволений для клінічного застосування. Внутрішньоочеревинні ін’єкції препарату розпочинали при досягненні розміру пухлини в $0,5 \text{ см}^3$ і вводили 5 разів через добу в сумарній дозі 6 мг/кг маси тіла. Забір матеріалу здійснювали через 24 год після 5-ї ін’єкції препарату.

Об’єктом дослідження були ПМ, виділені з пухлинних клітин щурів. Методику виділення та контролю чистоти мембранного препарату описано в [8]. Стандартну суспензію ПМ готували в 0,1 мМ фосфатному буфері (рН 7,0), вміст мембран у дослідному зразку становив 30 мг/мл.

Спектри ЯМР знімали на спектрометрі “Mercury-300BB” (“Varian”, США) з робочою частотою 300 МГц та смугою пропускання 50 кГц. Зміни інтенсивності сигналу визначали при варіюванні температури в діапазоні від 273 до 220 К. Температура зразка регулювалась за допомогою контролера температури з точністю $\pm 0,5$ °С. Час встановлення рівноважної температури становив 5 хв. Як стандарт використовували 3-метилсілілтетрадейтетропроїонову кислоту (ТСП).

Відповідно до методики, докладно описаної в [12], вимірювали температурні залежності інтенсивності сигналу незамерзаючої води. Порівнюючи інтенсивності сигналу води до і після заморожування, розраховували концентрацію незамерзаючої води ($C_{\text{нв}}$) у зразках при $T < 273$ К. Внаслідок того що умовою замерзання води на міжфазній границі біомембрана/вода є рівність вільних енергій адсорбованої води і льоду, зниження температури замерзання адсорбованої води ($273 - T$) визначається зменшенням вільної енергії води, викликаним адсорбційними взаємодіями ($\Delta G = G_0 - G$, де G_0 — вільна енергія льоду при $T = 273$ К) [12]. Оскільки вільна енергія льоду зі зниженням температури змінюється у вузькому інтервалі температур за лінійним законом, величина ΔG (кДж/моль) може бути розрахована за формулою

$$\Delta G = 0,036 \cdot (273 - T). \quad (1)$$

Площа під кривою $\Delta G(C_{\text{нв}})$ визначає величину міжфазної енергії біологічного об’єкта (γ_S) у водному середовищі:

$$\gamma_S = K \int_0^{C_{\text{нв}}^{\text{max}}} \Delta G dC_{\text{нв}}, \quad (2)$$

де $C_{\text{нв}}^{\text{max}}$ — товщина шару незамерзаючої води при $T \rightarrow 273$ К.

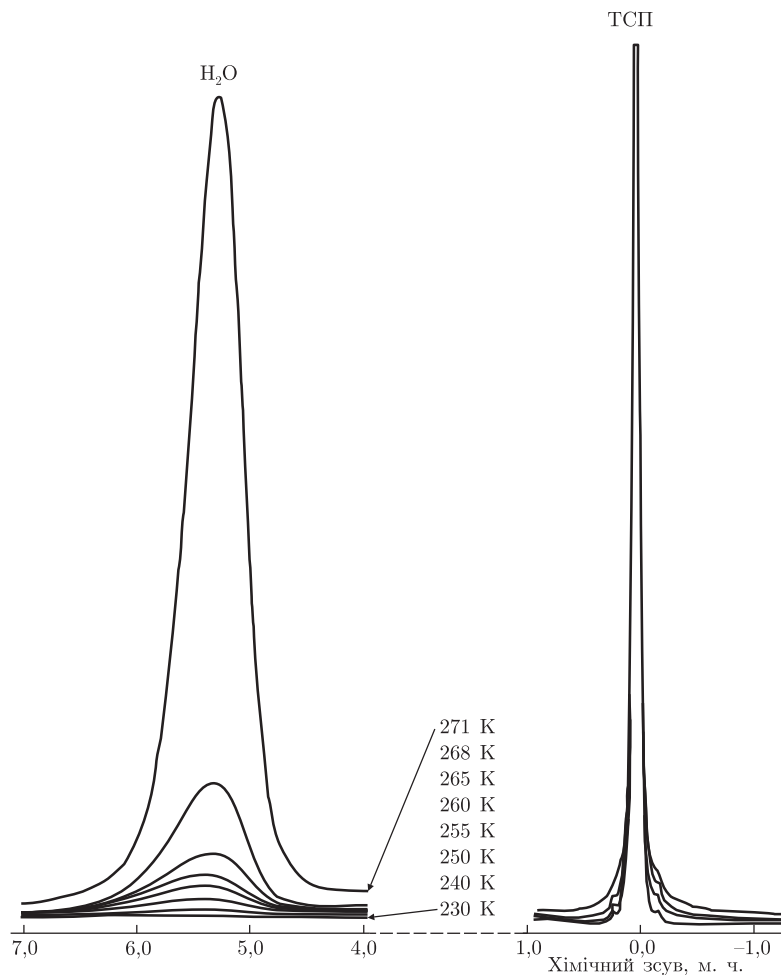


Рис. 1. Температурна залежність інтенсивності ЯМР сигналу протонів води в суспензії ПМ клітин КГ

Шляхом використання методу пошарового виморожування рідкої фази [12, 13] можна виміряти товщину шару слабкозв'язаної і сильнозв'язаної води ($C_{\text{нв}}^w$, $C_{\text{нв}}^s$ відповідно), максимальне зниження вільної енергії Гіббса в цих шарах (ΔG^w , ΔG^s) та міжфазну енергію (γ_S), що визначає сумарне зниження вільної енергії всієї води, яка зазнає впливу з боку границі розділу фаз. Для запобігання явищ, пов'язаних з переохолодженням рідини, вимірювались інтенсивності сигналу незамерзаючої води для зразків, попередньо охолоджених до температури 220 К. Точність величин $C_{\text{нв}}^w$ та $C_{\text{нв}}^s$ визначається точністю вимірювання інтегральних інтенсивностей сигналу і в більшості випадків становить 2–10%. Точність визначення інтегральної величини γ_S становить 10%.

Результати та їх обговорення. Комбіноване застосування методу ^1H ЯМР з пошаровим виморожуванням рідкої фази дозволяє визначати характеристики різних типів зв'язаної води та величину міжфазної енергії, яка опосередковано характеризує стан шарів води, зв'язаних з внутрішньою та зовнішньою поверхнею ПМ. Інтенсивність та форму ЯМР сигналів протонів води в замороженій водній суспензії ПМ клітин КГ та їх залежність від температури наведено на рис. 1. За температури нижче 273 К відбувалось вимерзання вільної води та відповідне зменшення інтенсивності ЯМР сигналу протонів води. Зменшення

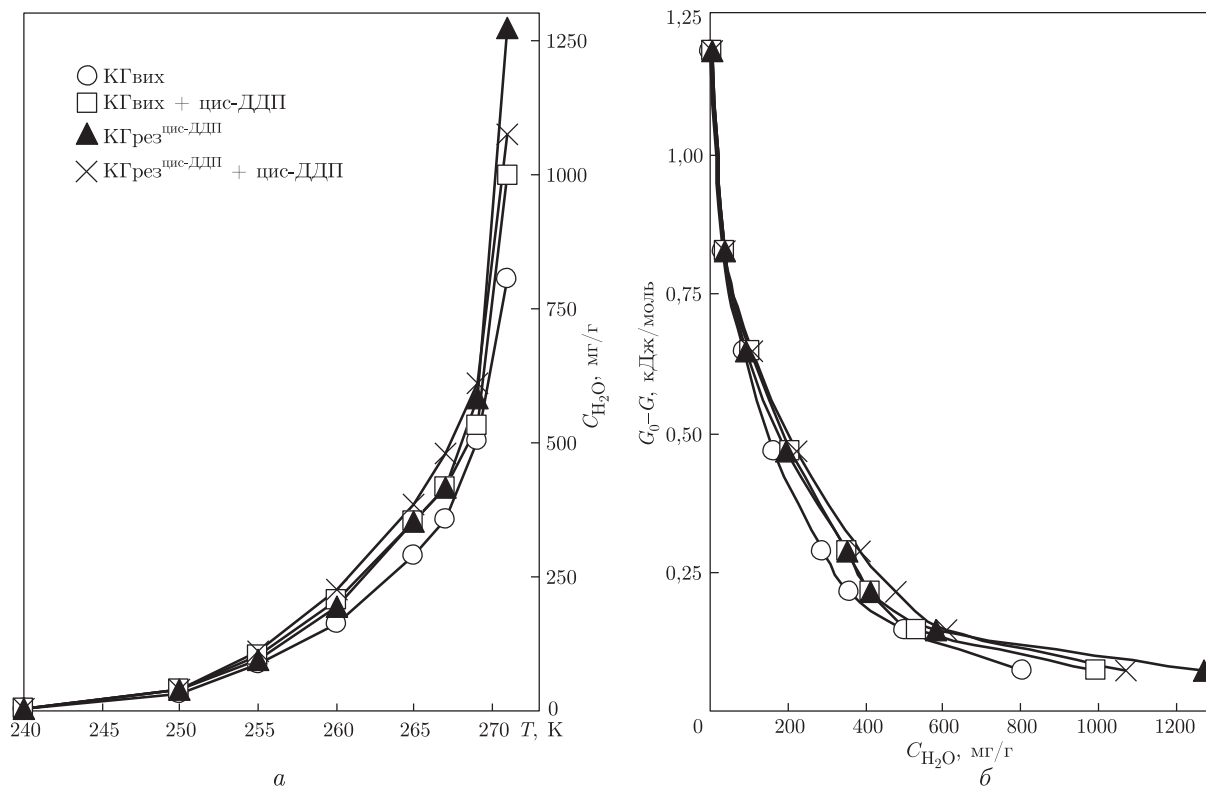


Рис. 2. Залежність концентрації води від температури (а) та зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (б) в суспензії ПМ клітин КГ

молекулярної рухливості води при зниженні температури обумовлює збільшення ширини сигналу [14]. Для зв'язаної води, вільна енергія якої знижена взаємодією з границею розділу фаз, температура замерзання визначається формулою (1). Залежності інтенсивності сигналу води в суспензії ПМ від температури та рівня вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води наведено на рис. 2.

Концентрація незамерзаючої води зменшувалась при зниженні температури, і цей процес виявляв бімодальний характер. Спочатку виморожується слабкозв'язана вода, вільна енергія якої майже не зменшена за рахунок взаємодії на міжфазній границі з ПМ. Так, концентрація вільної та слабкозв'язаної води зменшувалась експоненціально (більше ніж на 99,6%) при досягненні температури 260 К, що відповідає незначному зменшенню її вільної енергії до 0,25 кДж/моль. Виморожування мінорної фракції сильнозв'язаної води (0,36–0,14%) супроводжувалось значною зміною (у 5 разів) її вільної енергії, викликаною адсорбційною взаємодією з ПМ.

Концентрації обох типів зв'язаної води ($C_{\text{H}_2\text{O}}^w$ та $C_{\text{H}_2\text{O}}^s$), максимальні зміни вільної енергії, викликані адсорбцією (ΔG_w , ΔG_s), а також значення міжфазної енергії для суспензії ПМ наведено в табл. 1. Зміна співвідношення слабкозв'язаної води до сильнозв'язаної ($C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$) є відображенням структурно-функціональних змін стану ПМ. Співвідношення $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$ значно змінювалось у ПМ пухлинних клітин з різним ступенем чутливості до дії протипухлинного препарату цис-ДДП. Зростання $C_{\text{H}_2\text{O}}^s$ на фоні зменшення $C_{\text{H}_2\text{O}}^w$ може свідчити як про зміну структури та просторової організації трансмембранних білків, так і про перерозподіл білків у внутрішньомембранному інтер'єрі ПМ.

Як впливає з одержаних даних (див. табл. 1), у ПМ клітин КГ, чутливої до цис-ДДП, рівень $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$ в 2,5 раза перевищував його значення в ПМ резистентного штаму. Різноманітні зміни в ПМ спостерігались при введенні щурам цис-ДДП. Так, введення протипухлинного препарату щурам з вихідним підштамом КГ супроводжувалось зниженням рівня $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$ в 1,6 раза, у той час як у ПМ резистентного підштаму КГ рівень $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$, навпаки, збільшувався в 2 рази. Подібним чином змінювалась величина ΔG_s , однак амплітуда змін не перевищувала 12% при різній чутливості КГ до дії цис-ДДП.

Відомо, що саме мінорна фракція структурованої води критичним чином змінює властивості всієї води в системі. Так, методом ЯМР продемонстровано істотні відмінності у властивостях загальної і структурованої води в розчинах білків (альбумін та γ -глобулін). Константа релаксації структурованої води в білкових розчинах значно відрізняється від звичайної води і прямо зв'язана зі структурою та просторовою організацією макромолекул в розчині [7]. Наші попередні дослідження ПМ гепатоцитів показали, що при дії цис-ДДП відбувається однонаправлена зміна ліпід-білкової взаємодії, зменшується рівень проникнення білків у ліпідний бішар [15]. Очевидно, що такі структурні зміни в ПМ будуть впливати на рівень $C_{\text{H}_2\text{O}}^w$ та $C_{\text{H}_2\text{O}}^s$.

Визначена методом ^1H ЯМР загальна концентрація води, зв'язаної з ПМ, збільшувалась при дії цис-ДДП як у вихідного, так і у резистентного підштамів КГ. Особливо це було характерно для мембран резистентного підштаму КГ, у якого рівень $C_{\text{H}_2\text{O}}^w$ підвищився в 1,9 раза (див. табл. 1). Це може свідчити про значні консервативні зміни, які відбуваються в структурно-функціональному стані ПМ пухлинних клітин при розвитку резистентності до цис-ДДП.

Характерно, що величина міжфазної енергії суспензії ПМ вихідного та резистентного підштамів КГ істотно не відрізнялась. Однак при дії цис-ДДП величина γ_S зростала на 14% у вихідного підштаму та на 26% у резистентного підштаму КГ. Величина γ_S відображає зміну фазового складу колоїдної системи [3]. У випадку суспензії ПМ величина γ_S буде залежати як від взаємодії між міцелами, що формуються з фрагментів ПМ, так і від взаємодії молекул білків і ліпідів у ПМ. У випадку слабкої взаємодії дисперсних частинок чи макромолекул спостерігається максимально можливе для даної системи значення γ_S . При зближенні частинок γ_S зменшується, тому що товщина шару зв'язаної води не може перевищувати відстані між ними. Міжфазна енергія визначає сумарне зниження вільної енергії колоїдної системи, обумовлене присутністю границі розділу фаз [3]. Для суспензії ПМ середнє значення величини γ_S залежить від стану води, зв'язаної з внутрішньою і зовнішньою поверхнею мембран та молекулами білків і ліпідів, які формують ПМ.

Таким чином, одержані нами дані свідчать про значну роль структурованої води як у механізмах формування лікарської резистентності, так і в реалізації біологічних ефектів цис-ДДП. Показано, що виморожування вільної та слабкозв'язаної води відбувалося при незначному зменшенні її вільної енергії, а виморожування мінорної фракції сильнозв'язаної

Таблиця 1. Характеристика шарів зв'язаної води в суспензіях плазматичних мембран клітин КГ

Група тварин	ΔG_s , кДж/моль	ΔG_w , кДж/моль	$C_{\text{H}_2\text{O}}^s$, мг/г	$C_{\text{H}_2\text{O}}^w$, мг/г	γ_S , Дж/г
КГвих	2,42	0,13	5,41	3810,43	22,52
КГвих + цис-ДДП	2,14	0,13	9,88	4314,42	26,09
КГрез _{цис-ДДП}	2,37	0,16	8,74	2450,57	21,51
КГрез _{цис-ДДП} + цис-ДДП	2,41	0,13	8,72	4756,63	28,97

води супроводжувалося значною зміною (в 5 разів) її вільної енергії за рахунок адсорбційної взаємодії з ПМ. Загальна концентрація води, зв'язаної з ПМ, збільшувалася при дії цис-ДДП, особливо в мембранах резистентного підштаму КГ. Співвідношення $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$ в ПМ клітин чутливого підштаму КГ в 2,5 раза перевищувало його значення для резистентного штаму. Введення цис-ДДП щурям з вихідним підштамом КГ супроводжувалося зниженням співвідношення $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$ (1,6 раза), але для резистентного підштаму КГ характерним було збільшення в 2 рази рівня $C_{\text{H}_2\text{O}}^w/C_{\text{H}_2\text{O}}^s$. Величина міжфазної енергії суспензії ПМ вихідного та резистентного підштамів КГ істотно не відрізнялась. Однак при дії цис-ДДП величина γ_S зростала на 14% у вихідного підштаму та на 26% у резистентного підштаму КГ. Виявлені зміни властивостей структурованої води впливають на структурно-функціональні перебудови в ПМ пухлинних клітин, що є однією з причин формування фенотипу лікарської резистентності до дії протипухлинних препаратів.

Роботу виконано за часткової фінансової підтримки програми U. S. Civilian Research & Development Foundation (RESC 20-7; UR2-1028-KV-03) та теми "Молекулярні механізми росту і прогресії злоякісних новоутворень", яка здійснюється в рамках цільової наукової програми НАН України "Фундаментальні основи геноміки і протеоміки". Автори висловлюють вдячність д-ру хім. наук В. В. Турову та канд. біол. наук В. П. Триндяку за допомогу при підготовці роботи.

1. Park S., Saven J. G. Statistical and molecular dynamics studies of buried waters in globular proteins // *Proteins*. – 2005. – **60**, No 3. – P. 450–463.
2. Raschke T. M. Water structure and interactions with protein surfaces // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2006. – **16**, No 2. – P. 152–159.
3. Туров В. В., Гунько В. М., Горбик С. П. Влияние высокодисперсного кремнезема на фазовое равновесие в водных суспензиях, содержащих клетки и белки // *Доп. НАН України*. – 2003. – № 9. – С. 150–156.
4. Madan B., Sharp K. Changes in water structure induced by a hydrophobic solute probed by simulation of the water hydrogen bond angle and radial distribution functions // *Biophys. Chem.* – 1999. – **78**. – P. 33–41.
5. Jiang L., Kuhlman B., Kortemme T., Baker D. A "solvated rotamer" approach to modeling water-mediated hydrogen bonds at protein-protein interfaces // *Proteins*. – 2005. – **58**, No 4. – P. 893–904.
6. Pouliquen D., Rivet P., Gallier J. et al. Proton NMR studies of tissue water phases during chemical carcinogenesis in rats // *Anticancer Res.* – 1993. – **13**, No 1. – P. 49–55.
7. Pouliquen D., Gallois Y. Physicochemical properties of structured water in human albumin and gamma-globulin solutions // *Biochimie*. – 2001. – **83**, No 9. – P. 891–898.
8. Чехун В. Ф., Михайленко В. М., Триндяк В. П. та ін. ЯМР спектроскопія як метод оцінки чутливості біологічних мембран до дії цитостатиків // *Доп. НАН України*. – 2006. – № 10. – С. 180–187.
9. Булавін Л. А., Вишневецький І. М., Чехун В. Ф. та ін. Дослідження самодифузії молекул води у водних суспензіях плазматичних мембран методом квазіпружного розсіювання повільних нейтронів // *Там само*. – 2004. – № 7. – С. 176–181.
10. Chekhun V. F., Lebed O. I., Tryndyak V. P. et al. Structural alterations of plasma membranes of Guerin's carcinoma cells upon the development of resistance to doxorubicine // *Exp. Oncol.* – 2002. – **24**. – P. 279–283.
11. Чехун В. Ф., Триндяк В. П., Тодор І. М. та ін. Вміст фосфоліпідів та холестеролу у плазматичних мембранах пухлинних клітин з різною чутливістю до доксорубіцину // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – **75**, № 4. – С. 120–125.
12. Туров В. В. Слои связанной воды и поверхностные силы в водных суспензиях высокодисперсных оксидов // *Химия поверхности кремнезема*. – Киев, 2001. – Т. 1. – С. 510–607.
13. Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M. et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // *Adv. Colloid and Interface Sci.* – 2005. – **118**. – P. 125–172.
14. Манк В. В., Лебовка Н. И. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в гетерогенных системах. – Киев: Наук. думка, 1988. – 202 с.

15. Чехун В. Ф., Кулик Г. И., Лебедь О. И. Структурные свойства плазмолеммы гепатоцитов при действии цисплатина, адриабластина и эмбихина // Эксперим. онкология. – 1997. – **19**, № 4. – С. 343–348.

*Інститут експериментальної патології,
онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 18.06.2007