
ПОВЕРХНОСТЬ,
ТОНКИЕ ПЛЕНКИ

УДК 538.87.91.97

СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ МОДЕЛЕЙ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО АНТИБИОТИКА ДОКСОРУБИЦИНА

© 2023 г. Н. Н. Новикова^{1,*}, М. В. Ковальчук¹, А. В. Рогачев¹, Ю. Н. Малахова^{1,2},
Ю. О. Котова³, С. Э. Гельперина³, С. Н. Якунин¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

*E-mail: nn-novikova07@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 26.07.2023 г.

Принята к публикации 26.07.2023 г.

С помощью методов двумерной дифракции и рентгеновской рефлектометрии проведены исследования, посвященные изучению молекулярных механизмов взаимодействия противоопухолевого антибиотика доксорубицина с липидными моделями клеточных мембран. В качестве модельных систем использованы монослои четырех видов фосфолипидов, относящихся к основным компонентам мембран животных клеток. Получена новая информация о процессах повреждения кристаллической решетки фосфолипидных монослоев под действием доксорубицина. Установлено, что действие доксорубицина на монослои анионных фосфолипидов определяется электростатическим взаимодействием: положительно заряженные молекулы доксорубицина встраиваются между отрицательно заряженными функциональными группами фосфолипида. В случае нейтральных фосфолипидов основная роль принадлежит гидрофобному взаимодействию: молекулы доксорубицина координируются с углеводородными хвостами фосфолипида в неупорядоченных областях.

DOI: 10.31857/S0023476123600842, EDN: AAUWIR

ВВЕДЕНИЕ

Развитие новых подходов к изучению молекулярной организации биологических мембран остается актуальной задачей, несмотря на многочисленные фундаментальные исследования в этой области. Это объясняется важнейшей ролью биомембран в структурной и функциональной организации клеток, а также возможностью активного воздействия на клетку через мембрану. Адекватной моделью клеточных мембран являются упорядоченные липидные монослои, сформированные на поверхности жидкой субфазы в ленгмюровской ванне [1]. Для изучения подобных объектов широко привлекаются поверхностно-чувствительные рентгеновские методы, что позволяет получать информацию о механизмах функционирования клеточных мембран на молекулярном уровне [2–6].

Наиболее часто в исследованиях органических пленок на поверхности жидкости применяется метод рентгеновской дифракции в скользящей геометрии, позволяющий изучать кристаллическую структуру двумерных молекулярных систем

в латеральном направлении [3]. Еще одна рентгеновская методика, которая успешно используется в исследованиях на жидкости, – метод рентгеновской рефлектометрии [4]. Такие измерения дают информацию о распределении профиля электронной плотности и позволяют локализовать отдельные химические компоненты биоорганической пленки по ее толщине.

В представленных исследованиях методы рентгеновской дифракции в скользящей геометрии и рентгеновской рефлектометрии были использованы для выявления молекулярных механизмов изменения структуры липидных моделей клеточных мембран под действием антибиотика доксорубицина.

Доксорубицин – полусинтетический антибиотик антрациклинового ряда – занимает важное место в химиотерапии онкологических заболеваний [7]. Благодаря широкому спектру действия доксорубицин является компонентом стандартных схем комбинированной химиотерапии многих опухолей (в том числе, опухолей молочной железы, легких, желудка и пр.) и лейкозов [8]. Ос-

новным механизмом цитотоксического действия доксорубина считают нарушение взаимодействия фермента топоизомеразы II с ДНК, что приводит к торможению репликации ДНК и ингибированию пролиферации клеток. Кроме того, доксорубин способствует образованию активных форм кислорода (свободных радикалов), обладающих высокой цитотоксичностью. В частности, действие свободных радикалов приводит к окислению липидов, входящих в состав цитоплазматических мембран. Полагают, что именно окислительное повреждение мембран является причиной кардиотоксичности доксорубина, которая имеет кумулятивный характер и ограничивает применение этого препарата в клинике [9, 10]. Еще одним важным механизмом цитотоксического действия доксорубина является его способность внедряться в липидные слои клеточных мембран, что приводит к нарушению их организации и изменению текучести и в конечном счете к апоптозу клеток. В то же время, поскольку основные мишени цитотоксического действия доксорубина локализованы внутри клетки, его взаимодействие с клеточными мембранами и проникновение внутрь клетки имеют определяющее значение для реализации противоопухолевого эффекта [11].

С начала 1980-х гг. большое внимание уделяется исследованиям, направленным на выяснение различий в доставке доксорубина к резистентным/чувствительным раковым клеткам [11–17]. Как показано в [12, 13, 17], восприимчивость клеток к доксорубину во многом определяется биофизическими свойствами мембраны (упаковка липидов, текучесть мембраны, электрический заряд), взаимодействием доксорубина с липидами. Взаимодействие доксорубина с липидными молекулами широко изучалось в модельных экспериментах с использованием липидных бислоев на твердых подложках, липосом и т.д. [15–19]. Многочисленные опубликованные исследования посвящены выявлению особенностей взаимодействия доксорубина с лентгюровскими монослоями, состоящими из синтетических фосфолипидов [20–22], а также липидов, выделенных из раковых клеток [12]. Наиболее часто в таких исследованиях применяются брюстеровская микроскопия, метод изотерм сжатия и флуоресцентная микроскопия, что позволяет детально охарактеризовать морфологию монослоя, его термодинамические свойства, фазовое поведение и т.д. Однако изменения в структуре монослоя, вызванные действием доксорубина, еще не рассматривались систематически.

Механизмы действия доксорубина на фосфолипидные монослои обусловлены тем, что молекулы доксорубина в водных растворах заряжены положительно (при нейтральных значениях pH). С другой стороны, часть молекулы доксору-

бина в виде планарной структуры ароматических колец обладает выраженными гидрофобными свойствами. Таким образом, в зависимости от химического строения и структуры фосфолипида возможно как электростатическое, так гидрофобное взаимодействие. В связи с этим в представленных исследованиях экспериментальные измерения были проведены для четырех различных типов фосфолипидов. Изучали монослои дипальмитоилфосфатидилглицерина (ДПФГ), который выбрали в качестве одного из основных отрицательно заряженных фосфолипидов в клеточных мембранах. Чтобы выяснить роль состояния гидрофобной части монослоя, в частности ненасыщенности ацильной цепи молекул липида, провели измерения на монослоях фосфолипида с двумя ацильными цепями ненасыщенной жирной кислоты — диолеоилфосфатидилсерин (ДОФС). Кроме того, рентгеновские эксперименты были выполнены для двух нейтральных фосфолипидов: дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) — основной компонент клеточных мембран животных клеток, а также дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДПФЭ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование монослоя фосфолипида на поверхности жидкости

Использовали следующие реактивы: 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol) sodium salt (ДПФГ), 1,2-Di-(cis-9-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-L-serine sodium salt (ДОФС), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (ДПФЭ), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (ДПФХ).

Растворы ДПФГ и ДПФЭ были приготовлены в концентрации 0.45 мг/мл с использованием смеси хлороформ:метанол (9:1). ДОФС и ДПФХ растворяли в хлороформе в концентрации 0.42 мг/мл. Для формирования монослоя раствор фосфолипида наносили на поверхность чистой воды в лентгюровской ванне. После испарения растворителя (через 15 мин) слой поджимали до поверхностного давления $\pi = 25$ мН/м.

Для каждого фосфолипида было выполнено по три серии измерений:

1) монослой формировали на поверхности раствора доксорубина. Концентрация доксорубина в субфазе составляла 1.255×10^{-4} М, выбранное значение соответствует концентрации доксорубина в плазме крови крыс при введении препарата NanoDox, в состав которого входит доксорубин;

2) монослой формировали на поверхности чистой воды. После поджатия слоя фосфолипида до давления $\pi = 25$ мН/м, под монослой с помощью шприца вводили 300 мкл раствора доксорубина

(концентрация 1.47×10^{-3} М). Монослой оставляли на 40 мин до начала рентгеновских измерений;

3) контрольные измерения для монослоя, сформированного на поверхности чистой воды.

Рентгеновские измерения

Измерения с помощью метода рентгеновской дифракции в скользящей геометрии и рентгеновской рефлектометрии проведены на станции ID10 (Европейский центр синхротронного излучения ESRF, Франция). Было использовано излучение с длиной волны $0.563 \text{ \AA}$. При измерении картин двумерной дифракции угол падения излучения на поверхность воды составлял $0.8 \times \theta_C$ (θ_C — критический угол полного внешнего отражения для воды). В каждой серии экспериментальные исследования проводили в течение 3 ч после поджата слоя. Перед каждым новым измерением лентгмюровскую ванну сдвигали в поперечном направлении на 200 мкм, что позволило снизить радиационные повреждения фосфолипидного слоя. Поверхностное давление поддерживалось постоянным во время измерений.

Анализ экспериментальных данных

Для анализа экспериментальных кривых рентгеновской рефлектометрии использовали приближение “свободной формы”, позволяющее проводить поиск профиля распределения электронной плотности без каких-либо ограничений на форму профиля. Такой подход имеет ряд существенных преимуществ при решении обратных задач рентгеновской рефлектометрии для систем со сложными границами раздела и заведомо неизвестной структурой. Возможности метода были продемонстрированы в исследованиях периодических многослойных структур [23], тонкопленочных систем [24], а также полимерных тонких пленок на поверхности жидкости [25].

В классическом подходе к анализу экспериментальных данных рентгеновской рефлектометрии планарную систему представляют в виде набора слоев, где каждый слой определяется тремя параметрами: толщиной, оптической константой и толщиной переходного слоя [26]. Влияние границ раздела на кривую отражения моделируется ослабляющими коэффициентами типа Невотто-Кроузе для интенсивности френелевского отражения. Такой способ учета шероховатостей границ применим только для фиксированной формы профиля с нормальным распределением высот шероховатости и справедлив только для малых значений шероховатости. Специфика классического подхода заключается в том, что корректное решение удастся найти в том случае, если используется адекватная модель планарной системы. По сути в рамках классического подхода

проводится тестирование гипотезы о соответствии структуры образца выбранной модели с уточнением ее параметров в некоторых пределах. В случае значительных структурных перестроек в образце либо для неизвестной структуры образца принятая модель становится недостаточной для описания реальной структуры и требует усложнения путем введения дополнительных подслоев, при этом появляется новая степень свободы формы профиля.

В приближении “свободной формы” планарная система представляется в виде массива тонких ламелей заданного химического состава и плотности по аналогии с методом “Groove-Track” [27]. Все ламели имеют одинаковую толщину $d_{\min}$, величина которой определяется максимальным угловым диапазоном ($\theta_{\max}$) экспериментально полученной кривой зеркального отражения: $d_{\min} = \pi/q_{z(\max)}$, где $q_{z(\max)} = 4\pi \sin(\theta_{\max})/\lambda$ — максимальная длина вектора рассеяния, на котором наблюдается значимая картина зеркального отражения; λ — длина волны падающего излучения. Число ламелей определяется максимальной толщиной образца. Варьируемым параметром являются числовые кодификаторы ламелей, значение которых определяется возможными вариациями базовых материалов планарной системы. Таким образом, в расчете прямой задачи рентгеновской рефлектометрии используется массив ламелей равной толщины, для каждой из которых в комплексном показателе преломления сохраняется соотношение Крамерса—Кронига и наследуются свойства плотности и химического состава базовых материалов системы [23]. Для предотвращения появления выбросов и осциллирующего поведения профиля распределения электронной плотности вблизи истинного решения в процессе независимого варьирования большого числа несвязанных ламелей используется регуляризация Тихонова. Критерий согласия в этом случае дополняется средним значением квадрата производной второго порядка от профиля: $\text{GOF} = \chi^2 + \Lambda \sum (-p_{i-1} + 2p_i - p_{i+1})^2$, где p_i — числовой кодификатор ламели, Λ — параметр регуляризации.

Верификацию стабильности и корректности восстановления профиля распределения электронной плотности в лентгмюровских пленках проводили для монослоев четырех фосфолипидов — ДПФХ, ДПФЭ, ДПФГ, ДОФС, сформированных на поверхности чистой воды при давлении 25 мН/м. Экспериментальные кривые рентгеновского отражения для всех четырех монослоев имеют характерную форму с ярко выраженными осцилляциями (рис. 1а). Небольшие различия наблюдаются в периоде осцилляций (позициях интерференционных минимумов), что связано с различной длиной углеводородных хвостов и раз-

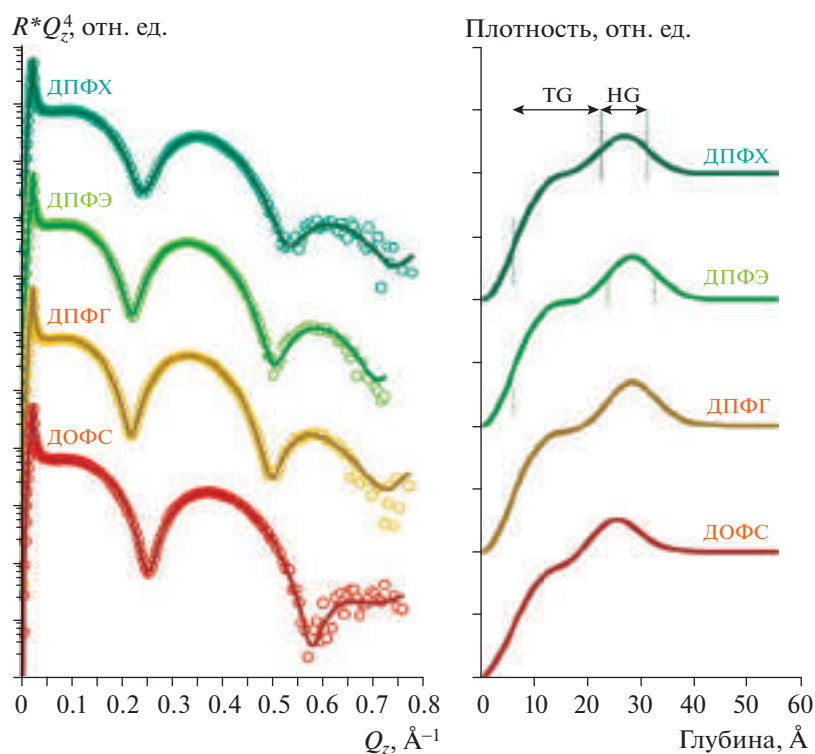


Рис. 1. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоев фосфолипидов – ДПФХ, ДПФЭ, ДПФГ, ДОФС, сформированных на поверхности чистой воды. Сплошные линии – расчетные кривые отражения, соответствующие наилучшему совпадению (а). Распределение электронной плотности в монослоях фосфолипидов – ДПФХ, ДПФЭ, ДПФГ, ДОФС. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали (б).

личным химическим составом головной группы. Результаты анализа экспериментальных данных рентгеновской рефлектометрии представлены на рис. 1б в виде профилей распределения электронной плотности по глубине структуры, нормированных на значение в водной субфазе. На всех профилях четко различаются две области: область голов молекул фосфолипидов (HG) на глубине 20–35 Å с повышенной электронной плотностью, а также область хвостов фосфолипидов (TG) на глубине до 20 Å с плотностью, сравнимой или меньшей, чем плотность водной субфазы. Поскольку модель фосфолипидного монослоя получена в приближении свободной формы, она не параметризована в традиционном представлении

толщин слоев голов и хвостов молекул; физически значимой является сама форма профиля. Количественные оценки этих параметров, для их сравнения со структурой липидной молекулы и результатами других исследований, получаются из анализа первых производных профиля как расстояния между экстремумами (табл. 1).

Как видно из рис. 1а, использование приближения “свободной формы” для определений молекулярной организации липидных монослоев, сформированных на поверхности жидкости, позволяет добиться хорошего согласия между теоретической кривой и экспериментальными данными. Полученные профили распределения электронной плотности не содержат артефактов восстановления и являются физически значимыми с полным соответствием общепринятой модели ленгмюровского слоя. Количественные параметры моделей адекватно отражают различия в структурах четырех липидов и демонстрируют высокую чувствительность к деталям структуры. Таким образом, предложенный подход позволяет получать информацию о молекулярной организации ленгмюровского слоя, а также о структурных изменениях в монослое, возникающих при взаимодействии молекул монослоя с компонентами

Таблица 1. Параметры монослоев фосфолипидов, полученные из анализа экспериментальных данных рентгеновской рефлектометрии

	$D_{TG}, \text{\AA}$	$D_{HG}, \text{\AA}$	ρ_{TG}/ρ_{sub}	ρ_{HG}/ρ_{sub}
ДПФХ	16.6	8.8	0.96	1.26
ДПФЭ	17.9	8.7	0.97	1.34
ДПФГ	18.0	8.7	0.94	1.34
ДОФС	13.9	9.2	0.88	1.25

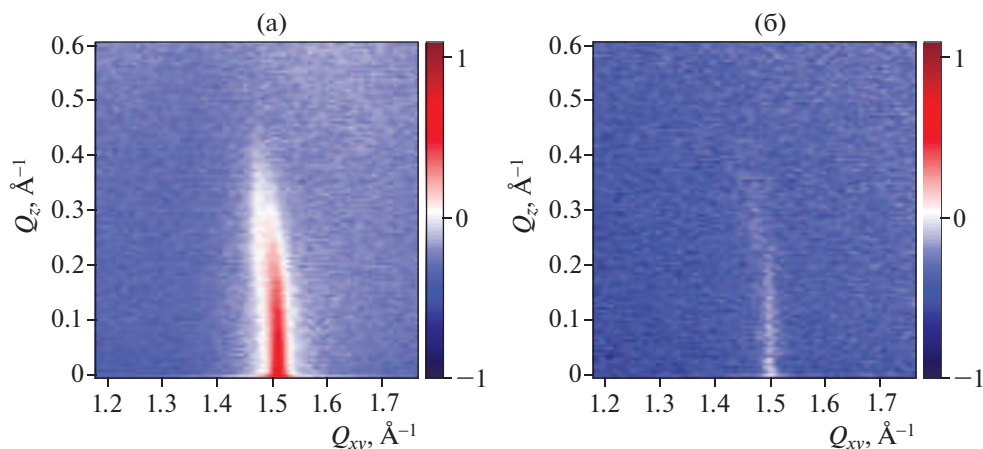


Рис. 2. Двумерные картины дифракционного рассеяния от монослоя ДПФГ до (а) и после (б) введения доксорубина.

жидкой субфазы, включая полное разрушение пленки.

Подчеркнем, что экспериментальные измерения, а также анализ данных рентгеновской рефлектометрии в биоорганических слоях, сформированных на поверхности жидкости, представляют собой достаточно нетривиальную задачу. Это связано с самой спецификой формирования таких систем, когда органические и биоорганические молекулы, сохраняющие свою подвижность, могут свободно распределяться в приповерхностных слоях жидкой субфазы. Кроме того, функционально значимые молекулы, присутствующие в жидкой субфазе, могут концентрироваться под слоем, оказывая заметное влияние на упаковку молекул в слое, и/или встраиваться в слой. Все эти факторы существенно затрудняют процесс математической обработки и интерпретации данных рентгеновской рефлектометрии при исследовании биоорганических систем на поверхности. В связи с этим методы анализа кривых отражения, не требующие какой бы то ни было априорной информации о распределении электронной плотности в планарной системе, представляют особый интерес для развития рентгеновской нанодиагностики молекулярных слоев на поверхности жидкой субфазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отрицательно заряженные фосфолипиды

Монослой ДПФГ. Наглядное представление о резких нарушениях молекулярной организации слоя ДПФГ под действием доксорубина дают результаты измерений с помощью метода рентгеновской дифракции в скользящей геометрии. В случае, когда монослой ДПФГ формировали на растворе доксорубина в первом измерении, за-

писанном через 40 мин после поджата слоя, не удалось зарегистрировать ни одного дифракционного пика, что однозначно указывает на сильное повреждение кристаллической структуры монослоя. Во второй серии измерений, когда монослой ДПФГ формировали на чистой воде, а затем под монослой вводили раствор доксорубина, также наблюдалось разрушение двумерной упаковки монослоя (рис. 2). Через 40 мин после введения раствора доксорубина под монослой ДПФГ еще можно было наблюдать картину дифракционного рассеяния, которая оказалась идентична картине рассеяния, наблюдаемой для монослоя ДПФГ на чистой воде (рис. 2а). Однако с течением времени картина заметно размывается и спустя еще 30 мин дифракционный пик становится трудно различимым на фоне шума (рис. 2б).

Экспериментальные кривые рентгеновской рефлектометрии, записанные в этих измерениях, имеют четкую осцилляционную структуру и по форме схожи между собой (рис. 3а). Эти кривые заметно отличаются от кривой рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДПФГ на чистой воде. Отметим, что в первой серии измерения на кривых наблюдались сразу после поджата слоя. В измерениях, которые были проведены в течение последующих 3 ч, изменений формы кривой отмечено не было, что свидетельствует о стабильности слоя, сформировавшегося на растворе доксорубина. В случае, когда раствор доксорубина вводили под монослой ДПФГ, первая кривая была записана через 1 ч после введения доксорубина. В течение последующих 2 ч измерений форма кривой менялась незначительно.

Реконструированный профиль распределения электронной плотности в обеих сериях измерений имеет сходный характер: в монослой можно выделить область хвостов, плотность которой меньше, чем плотность водной субфазы, а толщи-

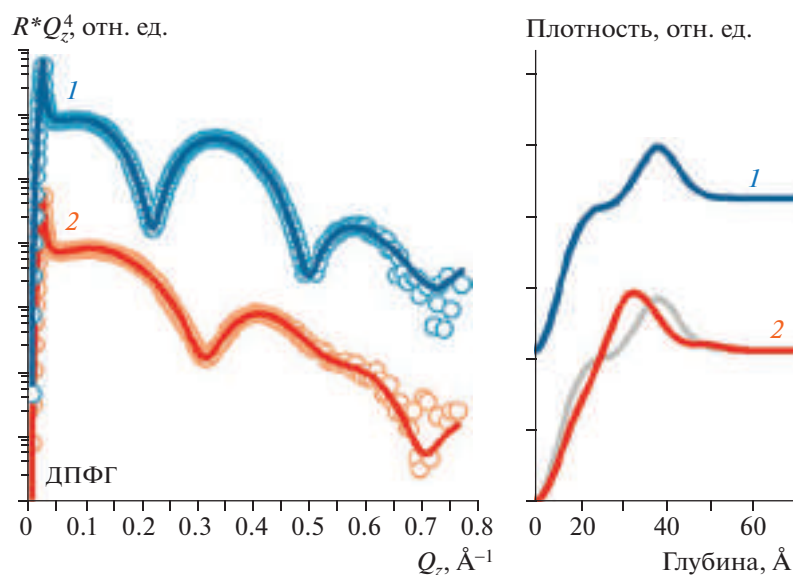


Рис. 3. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДПФГ: экспериментальные данные и соответствующие расчетные кривые до (1) и после (2) введения доксорубина (а). Распределение электронной плотности до (1) и после (2) введения доксорубина. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали. Серой линией показан профиль электронной плотности до введения доксорубина (б).

на D_{TG} составляет 8.2 и 10 $\text{\AA}$ в первой и второй серии измерений соответственно. Также на профиле хорошо видна область голов с повышенной электронной плотностью толщиной $D_{HG} = 10 \text{ \AA}$ в первой серии и $D_{HG} = 12 \text{ \AA}$ во второй серии. Плавные переходы между областью хвостов и голов молекул фосфолипида, а также на верхней и нижней границах связаны с наличием шероховатости поверхности жидкости и дисперсией наклона хвостов липидных молекул.

Обращает на себя внимание сильное размытие профиля распределения электронной плотности у верхней границы монослоя. Сопоставляя эти результаты с данными контрольных измерений для слоя ДПФГ на чистой воде (серая линия на рис. 3), можно сделать заключение, что в результате взаимодействия доксорубина с монослоем ДПФГ происходит заметное уменьшение толщины области хвостов монослоя, а также сильное размытие верхней границы и некоторое увеличение толщины области голов. Отметим, что в области голов фосфолипида сохраняется достаточно высокое значение электронной плотности.

Монослой ДОФС. Известно, что монослои ненасыщенных липидов не обладают дальним порядком, поскольку наличие в углеводородном хвосте двойных связей приводит к ослаблению межмолекулярных взаимодействий в области гидрофобных хвостов. Поэтому дифракционные измерения не дают какой-либо информации о латеральной организации в монослое ДОФС, имеющем две ацильные цепи ненасыщенной жирной

кислоты в *цис*-конфигурации. Важная информация об изменениях в монослое ДОФС была получена при измерениях с помощью рентгеновской рефлектометрии. На рис. 4а показаны кривые рентгеновского отражения для монослоя ДОФС до и после введения доксорубина, соответствующие профили электронной плотности представлены на рис. 4б. Как видно, доксорубин существенно изменяет молекулярную упаковку в монослое ДОФС. Примечательно, что эти изменения очень похожи как для насыщенного ДФПГ, так и для ненасыщенного ДПФХ: размытие границы раздела воздух/монослой, уменьшение толщины хвостовой области и увеличение электронной плотности в области головной группы. Повидимому, взаимодействие доксорубина с отрицательно заряженными монослоями происходит по сходному механизму.

На основании экспериментальных данных, полученных для монослоев фосфолипидов с отрицательно заряженными головными группами (ДПФГ и ДОФС), можно предположить, что взаимодействие доксорубина с анионными фосфолипидами происходит преимущественно за счет электростатических сил: положительно заряженные молекулы доксорубина встраиваются между отрицательно заряженными головками молекул фосфолипидов. Это оказывает выраженное влияние на молекулярную организацию монослоя, заметно разрыхляя плотную упаковку углеводородных хвостов. В результате в смешанном слое фосфолипид/доксорубин существенно

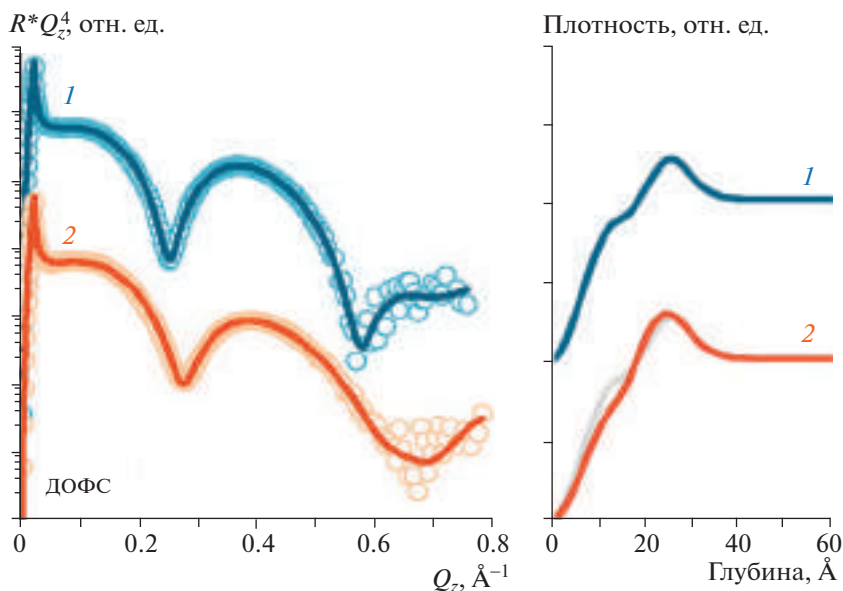


Рис. 4. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДОФС: экспериментальные данные и соответствующие расчетные кривые до (1) и после (2) введения доксорубина (а). Распределение электронной плотности до (1) и после (2) введения доксорубина. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали. Серой линией показан профиль электронной плотности до введения доксорубина (б).

увеличивается разброс углов наклона хвостов молекул фосфолипида, при этом в области голов сохраняется достаточно высокое значение электронной плотности. Важно подчеркнуть, что в случае отрицательно заряженного монослоя способность доксорубина встраиваться между полярными головками фосфолипидных молекул не зависит от ненасыщенности ацильной цепи. Согласно данным дифракционных измерений молекулы доксорубина встраиваются в конденсированный монослой насыщенного ДПФГ так же эффективно, как и в жидкий монослой ДОФС с двумя ацильными цепями ненасыщенной жирной кислоты.

Необходимо учитывать, что доксорубин является амфифильным соединением, содержащим как гидрофобную, так и гидрофильную части; поэтому координация с углеводородными хвостами молекул фосфолипидов может играть важную роль во взаимодействии доксорубина с липидным монослоем [11, 12]. Представленные данные рентгеновской рефлектометрии не дают прямой информации о локализации гидрофобной части молекулы доксорубина (ароматические циклы и метильные группы). Тем не менее полученные результаты, прежде всего наблюдаемое уменьшение толщины и плотности в области хвостов, свидетельствуют о том, что проникновения доксорубина в гидрофобную часть монослоев ДПФГ или ДОФС не происходит.

Нейтральные фосфолипиды

Исследованные нейтральные фосфолипиды относятся к цвистер-ионным соединениям с разделенными положительными и отрицательными зарядами в головной группе (в целом электронной-тральной). Отрицательный заряд локализован на фосфатной группе, а положительный — на аминогруппе.

Монослой ДПФЭ. Измерения для монослоя ДПФЭ проводили в течение 2 ч после введения доксорубина, в этот период наблюдались лишь слабые изменения на двумерных картах дифракционного рассеяния: интенсивность брэгговского пика незначительно снижалась со временем. Этот результат заметно отличается от данных для монослоя ДПФГ, когда брэгговский пик полностью исчезал в течение 1 ч. Двумерные карты дифракционного рассеяния для монослоя ДПФЭ, а также интегральная интенсивность дифракционного отражения в зависимости от компонент вектора рассеяния q_x и q_z представлены на рис. 5; соответствующие структурные параметры приведены в табл. 2. Согласно полученным данным после введения доксорубина параметры решетки в монослое ДПФЭ несколько увеличились по сравнению с монослоем ДПФЭ на чистой воде, также наблюдалось некоторое увеличение наклона ацильных цепей от вертикали. Эти изменения, хотя незначительные, указывают на “разрыхление” липидной упаковки в монослое ДПФЭ, что может быть связано с конформационными моди-

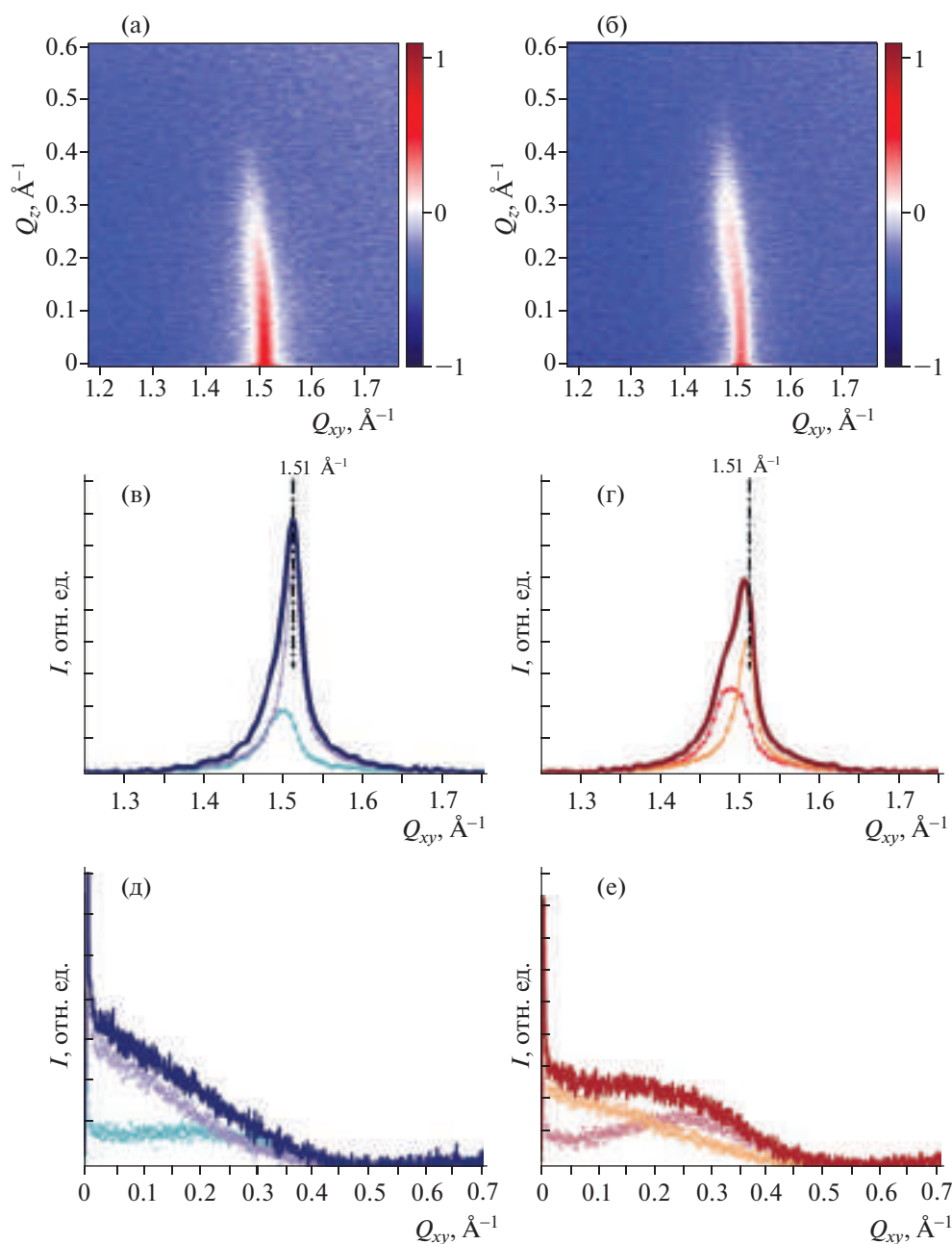


Рис. 5. Двумерные картины дифракционного рассеяния от монослоя ДПФЭ до (а) и после (б) введения доксорубицина. Интегральная интенсивность дифракционного отражения в зависимости от компонент вектора рассеяния q_{xy} и q_z до (в и г) и после (д и е) введения доксорубицина.

фикациями полярной группы молекул ДПФЭ в присутствии доксорубицина.

Измерения с помощью метода рентгеновской рефлектометрии, проведенные на монослое ДПФЭ в течение 2 ч после введения доксорубицина, не показали каких-либо изменений. Более того, форма кривых рентгеновской рефлектометрии оказалась практически идентичной кривой для монослоя ДПФЭ на чистой воде (рис. 6). Данные рентгеновских исследований, полученные для

ДПФЭ, однозначно указывают на то, что распределение электронной плотности в монослое ДПФЭ после введения доксорубицина оставалось неизменным, а двумерная решетка монослоя имеет практически такую же структуру, как и в монослое ДПФЭ на чистой воде. Таким образом, можно сделать вывод, что доксорубин не вызывал существенных изменений молекулярной упаковки в монослое ДПФЭ: проникновение гидрофобной части молекулы доксорубицина в область углево-

Таблица 2. Параметры решетки для монослоя ДПФЭ до и после введения доксорубина

	$a = b, \text{\AA}$	Угол наклона углеводородных хвостов, град	Площадь на углеводородную цепь, $\text{\AA}^2$	Направление наклона
До введения доксорубина	4.82	9.2	20.22	NN
После введения доксорубина	4.84	11.1	20.44	NN

дородных хвостов было затруднено благодаря плотной упаковке фосфолипидных молекул.

Монослой ДПФХ. Для фосфолипида дипальмитоил-фосфатидилхолина результаты рентгеновских измерений представлены на рис. 7 и 8. Как хорошо видно на рис. 8, после введения раствора доксорубина под монослой ДПФХ наблюдаются резкие изменения на кривых отражения со временем — заметно уменьшается амплитуда осцилляций. В случае, когда монослой ДПФХ формировали на растворе доксорубина (данные не представлены), уже на первой кривой были заметны существенные отличия от данных для монослоя ДПФХ на чистой воде. Весьма примечательно, что при резких изменениях, наблюдаемых на кривых рентгеновского отражения, картина дифракционного рассеяния на монослой ДПФХ в обоих случаях мало отличалась от данных, полученных для монослоя ДПФХ на чистой воде (рис. 7).

При обсуждении результатов, полученных для монослоя ДПФХ, следует учесть два фактора. Во-

первых, в положительно заряженной триметил-аммониевой группе гидрофильных головок молекул ДПФХ атом азота окружен тремя метильными группами, что обуславливает более сильное экранирование положительного заряда на азоте. Это в свою очередь снижает степень ион-дипольного отталкивания между молекулами доксорубина и головками ДПФХ по сравнению с молекулами ДПФЭ.

Во-вторых, полярные группы в молекулах ДПФХ имеют более сложный химический состав и конформацию благодаря наличию внутримолекулярных водородных связей [28]. В монослоях ДПФХ при поджати наблюдается одновременное существование двух фаз: кристаллические домены неправильной формы в окружении неупорядоченной фазы. При увеличении поверхностного давления выше фазового перехода (обычно при $\pi \sim 10\text{--}15$ мН/м) кристаллические домены сливаются вместе, однако при давлении 25 мН/м в монослой все еще присутствуют неупорядоченные области с менее плотной упаковкой молекул.

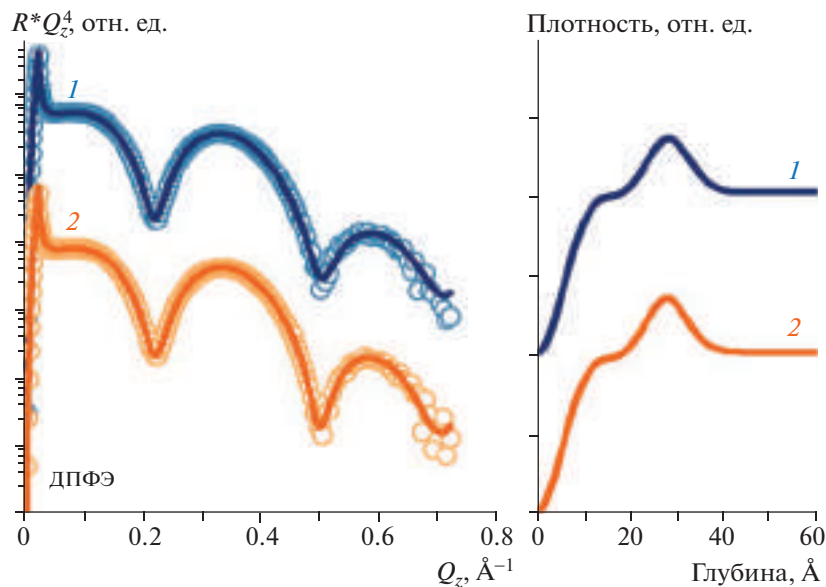


Рис. 6. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДПФЭ: экспериментальные данные и соответствующие расчетные кривые до (1) и после (2) введения доксорубина (а). Распределение электронной плотности до (1) и после (2) введения доксорубина. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали. Серой линией показан профиль электронной плотности до введения доксорубина (б).

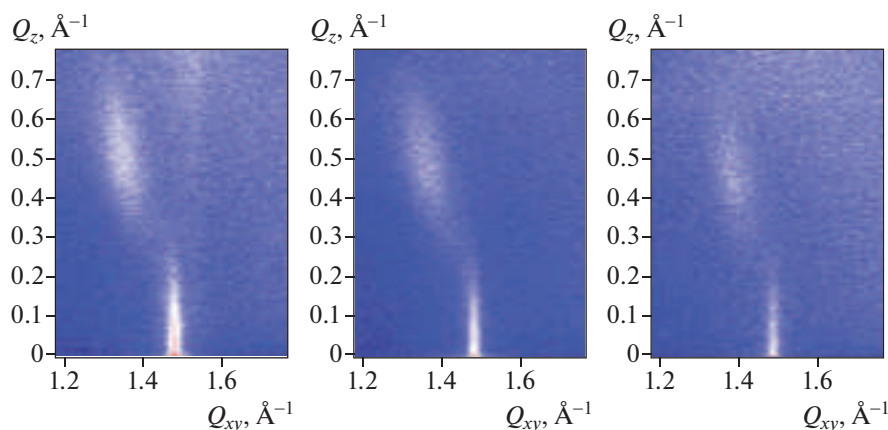


Рис. 7. Двумерные картины дифракционного рассеяния от монослоя ДПФХ до введения доксорубина, через 40 мин и через 3 ч после введения.

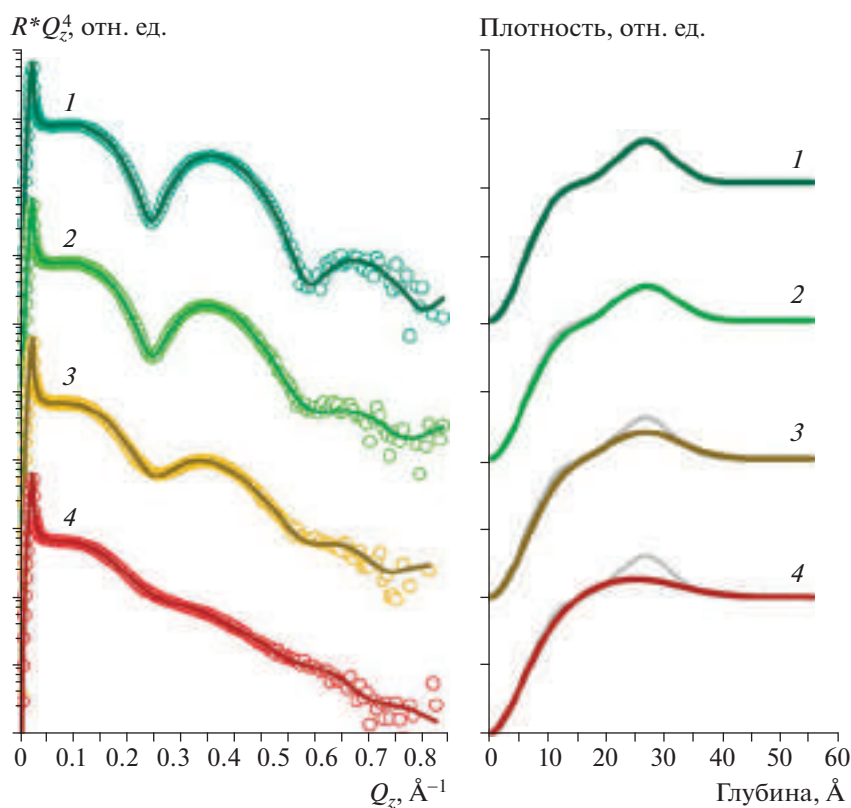


Рис. 8. Кривые рентгеновской рефлектометрии для монослоя ДПФХ: экспериментальные данные и соответствующие расчетные кривые до введения доксорубина (1), а также спустя различные интервалы после введения доксорубина: 30 мин (2), 1 (3), 8 ч (4) (а). Распределение электронной плотности до (1) и после (2, 3, 4) введения доксорубина. Профили распределения электронной плотности нормированы на значение плотности воды. Для наглядности кривые смещены по вертикали. Серой линией показан профиль электронной плотности до введения доксорубина (б).

Можно предположить, что на кристаллические домены с плотной упаковкой фосфолипидных молекул доксорубин не оказывает заметного действия, тогда как в неупорядоченных областях доксорубин может встраиваться между молекулами

фосфолипида. Действительно, в экспериментальных измерениях сохранение молекулярной организации в кристаллических доменах подтверждается отсутствием изменений на двумерных картах дифракционного рассеяния. В не-

упорядоченных областях благодаря наличию “потенциально свободного” объема в углеводородной части монослоя у молекул доксорубицина появляется возможность проникать в гидрофобную часть монослоя за счет взаимодействия ароматических колец доксорубицина с углеводородными хвостами фосфолипида.

В рамках таких предположений о взаимодействии доксорубицина с монослоем ДПФХ, экспериментальную кривую рентгеновского отражения можно рассматривать как сумму кривых от упорядоченной и неупорядоченной областей. При этом важно учесть, что в этих областях заметно различаются углы наклона углеводородных хвостов молекул ДПФХ, следовательно, заметно различаются периоды толщинных осцилляций. Понятно, что на кривых с различным значением периода толщинных осцилляций угловое положение минимумов и максимумов будет смещено друг относительно друга; и при сложении таких кривых на результирующей кривой рентгеновского отражения осцилляции могут заметно “размываться” вплоть до полного исчезновения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы двумерной дифракции и рентгеновской рефлектометрии были использованы для изучения процессов структурной реорганизации липидных моделей клеточных мембран под действием противоопухолевого антибиотика доксорубицина. Проведенные исследования выявили существенное влияние доксорубицина на монослой отрицательно заряженных фосфолипидов — ДФПГ и ДОФС. Изменения носили одинаковый характер как для насыщенного фосфолипида ДФПГ, так и для ненасыщенного ДОФС. Из этого можно сделать вывод, что механизмы действия антибиотика доксорубицина на монослой анионных фосфолипидов определяются в основном электростатическим взаимодействием: положительно заряженные протонированные аминокислотные группы доксорубицина встраиваются между отрицательно заряженными полярными головками фосфолипидов. Такой характер взаимодействия может заметно затруднить транспорт доксорубицина через клеточную мембрану. В случае нейтральных фосфолипидов превалирует гидрофобное взаимодействие: молекулы доксорубицина координируются с углеводородными хвостами фосфолипида в неупорядоченных областях, что позволяет доксорубицину проникать в гидрофобную область монослоя.

Обнаруженные закономерности представляют интерес для биомедицинских исследований, посвященных изучению механизмов цитотоксического действия доксорубицина, а также причин формирования множественной лекарствен-

ной резистентности к противоопухолевым препаратам.

Авторы выражают благодарность Европейскому центру синхротронного излучения за предоставленную возможность провести исследования на станции ID10, а также руководителю станции ID10 О.В. Коновалову за помощь в проведении экспериментальных измерений и ценные обсуждения полученных результатов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания, проект FSSM-2022-0003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brezesinski G., Möhwald H.* // Adv. Colloid Int. Sci. 2003. V. 100. P. 563.
[https://doi.org/10.1016/s0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/s0001-8686(02)00071-4)
2. *Stefaniu C., Brezesinski G.* // Curr. Opin. Colloid Int. Sci. 2014. V. 19. P. 216.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.01.004>
3. *Kaganer V.M., Mohwald H., Dutta P.* // Rev. Modern Phys. 1999. V. 71. № 3. P. 779.
<https://doi.org/10.1103/RevModPhys.71.779>
4. *Daillant J., Gibaud A.* X-ray and Neutron Reflectivity: Principles and Applications. Berlin: Springer, 2009. 348 p.
5. *Новикова Н.Н., Ковальчук М.В., Юрьева Э.А. и др.* // Кристаллография. 2012. Т. 57. № 5. С. 727.
6. *Novikova N., Kovalchuk M., Kononov O. et al.* // BioNanoSci. 2021. V. 10. P. 618.
<https://doi.org/10.1007/s12668-020-00742-0>
7. *Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G. et al.* // Biotechnol. Bioeng. 2000. V. 67. P. 704.
<https://doi.org/10.1002/bit.260110607>
8. *Thorn C.F., Oshiro C., Marsh S. et al.* // Pharmacogenet. Genomics. 2011. V. 21. P. 440.
<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
9. *Sritharan S., Sivalingam N.A.* // Life Sci. 2021. V. 278. P. 119527.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>
10. *Asensio-L'opez M.C., Soler F., Pascual-Figal D. et al.* // PLOS One. 2017. V. 12. P. e0172803.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172803>
11. *Alves A.C., Magarkar A., Horta M. et al.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 6343.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06445-z>
12. *Peetla C., Bhawe R., Vijayaraghavalu S. et al.* // Mol. Pharmaceutics. 2010. V. 7. P. 2334.
<https://doi.org/10.1021/mp100308n>
13. *Dadhich R., Kapoor S.* // Mol. Cell. Biochem. 2022. V. 477. P. 2507.
<https://doi.org/10.1007/s11010-022-04459-4>
14. *Ramu A., Glaubiger D., Magrath I.T. et al.* // Cancer Res. 1983. V. 43. P. 5533.
15. *Speelmans G., Staffhorst R.W., de Kruijff B. et al.* // Biochemistry. 1994. V. 33. P. 13761.
<https://doi.org/10.1021/bi00250a029>

16. *Chen L., Alrbyawi H., Poudel I. et al.* // AAPS Pharm-SciTech. 2019. V. 20. P. 99.
<https://doi.org/10.1208/s12249-019-1316-0>
17. *Alves A., Nunes C., Lima J. et al.* // Colloids Surf. B. 2017. V. 160. P. 610.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.058>
18. *Yacoub T.J., Reddy A.S., Szleifer I.* // Biophys. J. 2011. V. 101. P. 378.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.015>
19. *Hou Y., Li J., Liu X. et al.* // Chem. Phys. 2021. V. 541. P. 111036.
20. *Matyszevska D., Moczulska S.* // Electrochim. Acta. 2018. V. 280. P. 229.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.05.119>
21. *Gaber M.H., Ghannam M.M., Ali S.A. et al.* // Biophys. Chem. 1998. V. 70. P. 223.
[https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(97\)00125-7](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(97)00125-7)
22. *Marsh D.* // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1286. P. 183.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3)
23. *Zameshin A., Makhotkin I.A., Yakunin S.N. et al.* // J. Appl. Cryst. 2016. V. 49. P. 1300.
<https://doi.org/10.1107/S160057671601044X>
24. *Kondratev O.A., Makhotkin I.A., Yakunin S.N.* // Appl. Surf. Sci. 2022. V. 574. P. 151573.
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151573>
25. *Malakhova Y.N., Korovin A.N., Lapkin D.A. et al.* // Soft Matter. 2017. V. 13. P. 7300.
<https://doi.org/10.1039/c7sm01773a>
26. *Windt D.L.* // Comput. Phys. IEEE Comput. Sci. Eng. 1998. V. 12. P. 360.
<https://doi.org/10.1063/1.168689>
27. *Xiao-Lin Zh., Sow-Hsin Ch.* // Phys. Rev. E. 1993. V. 47. P. 3174.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.47.3174>
28. *Селеменев В.Ф., Рудакова Л.В., Рудаков О.Б. и др.* Фосфолипиды на фоне природных матриц. Воронеж: Научная книга, 2020. 318 с.