

УДК 577.112.856:615.277.3:616-600.6

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ЛИПОПРОТЕИНОВ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ И АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I СВЯЗЫВАТЬ И ТРАНСПОРТИРОВАТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ В КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Князев Р.А., Трифонова Н.В., Поляков Л.М.

ФГБУН «Научно-исследовательский институт биохимии», Новосибирск,
e-mail: knjazev_roman@mai.ru

Разработка новых, современных и высокоэффективных средств противоопухолевой терапии является одной из приоритетных задач современной фармакологии. В данной работе представлено одно из решений данной проблемы, связанное с разработкой транспортных форм противоопухолевых препаратов. Методами тушения флуоресценции и гель-фильтрации показано, что липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и аполипопротеин А-I (апоА-I) обладают способностью образовывать стабильные комплексы с актиномицином Д и винбластин. Полученные величины констант ассоциации комплексов ЛПВП и апоА-I с данными препаратами подтверждают возможность использования их в качестве транспортных форм в опухолевые клетки. С помощью флуоресцентного маркера (FITC) показана способность комплексов ЛПВП и апоА-I с данными препаратами проникать в цитоплазму и ядра клеток асцитной карциномы Эрлиха. Полученные результаты позволяют считать реальную возможность использования ЛПВП и апоА-I в качестве транспортных форм актиномицина Д и винбластина.

Ключевые слова: липопротеины высокой плотности, аполипопротеин А-I, транспортные формы противоопухолевых препаратов, асцитная карцинома Эрлиха, химиотерапия

STUDY THE ABILITY OF HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN AND APOLIPOPROTEIN A-I BIND AND TRANSPORT OF ANTICANCER DRUGS IN EHRlich ASCITES CARCINOMA CELL

Knyazev R.A., Trifonova N.V., Polyakov L.M.

Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk, e-mail: knjazev_roman@mai.ru

Development of new, modern and highly effective anti-cancer therapy is one of the priority tasks of modern pharmacology. This paper presents a one of the solutions to this problems associated with the creation of the transport forms of anticancer drugs. Using methods of fluorescence quenching, and gel filtration show that high density lipoproteins (HDL) and apolipoprotein A-I (apoA-I) have the ability to form stable complexes with actinomycin D and vinblastine. The constants of binding of HDL and apoA-I with anticancer drugs, which confirm the possibility of using them as a form of active transport in the body. Using a fluorescent marker – FITC, the ability of HDL and apoA complexes-I with anticancer drugs to penetrate into the cytoplasm and the nucleus of Ehrlich ascites tumor cells. Thus, the results suggest the real possibility of using HDL and apoA-I as a transport form of actinomycin D and vinblastine.

Keywords: high density lipoproteins, apolipoprotein A-I, a transport form of anticancer drugs, Ehrlich ascites carcinoma, and chemotherapy

Химиотерапия является одним из основных способов коррекции роста злокачественных новообразований. Однако этот способ терапии связан с риском интоксикации организма цитостатическими препаратами и их метаболитами. Такой эффект обусловлен использованием высоких доз цитостатиков, которые в свою очередь, не обладая избирательностью эффекта в отношении раковых клеток, действуют на все органы и системы организма [2]. Поэтому одним из актуальных вопросов современной фармакологии остается разработка препаратов направленного противоопухолевого действия либо создание лекарственных форм избирательного действия уже известных цитостатиков с целью усиления эффективности химиотерапии и снижения общего токсического эффекта на организм пациента [3].

В качестве потенциальных переносчиков противоопухолевых препаратов могут

выступать липопротеины высокой плотности (ЛПВП), а также их главный белковый компонент – аполипопротеин А-I (апоА-I). В литературе представлены работы, в которых показана возможность использования ЛПВП и апоА-I в качестве транспортных формы для различных биологически активных соединений, в том числе лекарственных препаратов [4,5].

Целью настоящей работы явилось изучение способности ЛПВП и апоА-I связывать и транспортировать актиномицин Д и винбластин в цитоплазму и ядра клеток асцитной карциномы Эрлиха.

Материалы и методы исследования

Выделение липопротеинов из плазмы крови человека проводили методом изоплотного ультрацентрифугирования в растворах КВг в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ на центрифуге «Optima L-90K, Beckman-Coulter» (Австрия) с использованием ротора 70.1 Ti [6]. Получали три основные фракции липо-

протеинов: липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП, $0,94 < d < 1,006$ г/мл), липопротеины низкой плотности (ЛПНП, $1,006 < d < 1,063$ г/мл) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП, $1,063 < d < 1,21$ г/мл).

Поскольку апоА-I является основным белковым компонентом ЛПВП, то для его выделения мы брали именно эту фракцию. Делипидирование проводили охлажденной смесью хлороформ-метанол (1:1) из расчета 20 мл смеси на 1 мл ЛПВП с последующей многократной отмывкой эфиром. Для получения апоА-I (апоА-I) суммарные белки ЛПВП в растворе 3% Ds-Na и 0,1% меркаптоэтанола наносили на колонку (1,6 x 100 см) с Сефарозой 6В-CL («Pharmacia», Швеция) и элюировали 5мМ Трис-НСI буфером, рН 8,6, содержащим 6 М мочевины, 0,01% азид натрия и 1 мМ фенилметансульфонилфторид. Скорость потока – 10 мл/ч, скорость самописца – 9 мм/ч. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе 2151 «LKB» (Швеция) при длине волны 280 нм. Проверка чистоты апоА-I осуществлялась с помощью электрофореза в 10% ПААГ с Ds-Na. Белковые полосы визуализировали 0,1% Кумасси G-250 в смеси метанола и 10% уксусной кислоты (1:1). В качестве маркеров использовали набор низкомолекулярных белков-стандартов (фосфорилаза – 94 кДа, альбумин – 67 кДа, овалбумин – 43 кДа, карбоангидраза – 30 кДа и лактальбумин – 14,4 кДа).

Обессоливание апоА-I проводили методом гель-фильтрации (колонка: 40 ´ 0,8 см, Сефадекс G-25 («Pharmacia», Швеция), элюент: 5мМ трис-НСI буфер, рН 7,4, содержащий 0,15 М NaCl, скорость элюции – 30 мл/ч, скорость самописца – 9 см/ч). Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе при длине волны 280 нм. Концентрация обессоленного белка составляла 0,2 мг/мл.

Изучение спектров поглощения противоопухолевых препаратов в оптической области электромагнитного излучения проводили на спектрофотометре Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для подтверждения возможности попадания комплекса ЛПВП-цитостатик и апоА-I-цитостатик в опухолевые клетки использовали флуоресцентный маркер – флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ). ЛПВП и апоА-I метили 1% раствором ФИТЦ в 0,1 М Na₂HP0₄. Процесс конъюгации проводили при 4°C в течение 18 ч в 0,1 М бикарбонатном буфере (рН 9,0) и в молярном соотношении белок/краситель 10/1 [7]. От свободной метки освобождались методом гель-фильтрации.

В работе использовали 1 мМ маточные растворы актиномина Д (AppliChem, Германия) и винбластин (ЛЭНС, ФАРМ, Россия).

Взаимодействие ЛПВП и апоА-I с противоопухолевыми препаратами изучали методом спектрофлуориметрии при длине волны возбуждения 285 нм и эмиссии в диапазоне от 300 до 450 нм (Шиматзу) [8]. Титрование проводили добавлением аликвот противоопухолевого препарата (по 20 мкл) к 2 мл ЛПВП или апоА-I. Расчет константы связывания осуществляли по методу Аттала и Лата [6]. Молекулярные массы ЛПВП и апоА-I принимались за 200 кДа и 28 кДа, соответственно.

Результаты исследования и их обсуждение

Метод тушения триптофановой флуоресценции используется с конца 70-х годов

и зарекомендовал себя, как объективный, высокоинформативный метод анализа взаимодействий типа «белок-лиганд» [9]. Исследование максимумов флуоресценции ЛПВП и апоА-I показало, что они отличаются по значениям длин волн. Класс ЛПВП имел максимум испускания – 336 нм, тогда как апоА-I в физиологическом растворе – 348 нм, что по литературным данным соответствует собственной флуоресценции триптофана 330-350 нм. Отличие значений можно объяснить структурной организацией липопротеиновой частицы, в которую помимо белкового компонента входят триглицерды, эфиры холестерина, холестерин и фосфолипиды.

Анализ спектров ЛПВП с исследуемыми препаратами показал снижение триптофановой флуоресценции для винбластина – 80%, для актиномина Д – 84%, а для апоА-I этот показатель составил 77% и 84%, соответственно. Снижение флуоресценции можно характеризовать как результат образования комплекса ЛПВП-противоопухолевый препарат и апоА-I-противоопухолевый препарат [6]. На рис.1 представлены кривые тушения для комплексов ЛПВП с винбластином (А) и апоА-I с винбластином (Б).

На рисунке видны кривые тушения собственно ЛПВП и апоА-I – кривая-1, а также снижение интенсивности флуоресценции при добавлении равных аликвот винбластина. Похожие графики были получены для актиномина Д с ЛПВП и апоА-I. Изучение временной зависимости тушения флуоресценции при одномоментном добавлении насыщающих количеств препаратов показало, что полное насыщение связывающих областей ЛПВП-частиц и апоА-I наблюдалось уже через 20 мин от начала титрования.

На основании кривых тушения флуоресценции были рассчитаны константы ассоциации при взаимодействии противоопухолевых препаратов с ЛПВП и с апоА-I и количество молекул связанных лигандов на 1 молекулу комплексообразователя (табл. 1).

Полученные данные говорят о том, что связывание характеризуется не достаточно высоким сродством, поэтому его нельзя назвать высокоспецифическим. На сегодняшний момент есть данные о реализации своего биологически активного действия для комплексов апоА-I со стероидными гормонами с константами ассоциации аналогичного порядка – 10^5 М⁻¹ [10]. Основываясь на этих данных, можно было бы предположить, что и в нашем случае комплекс попадет в цитоплазму и ядра клетки мишени, а невысокая специфичность связывания белок-лиганд будет способствовать освобождению препарата внутри клетки и эффективной реализации его цитостатического эффекта.

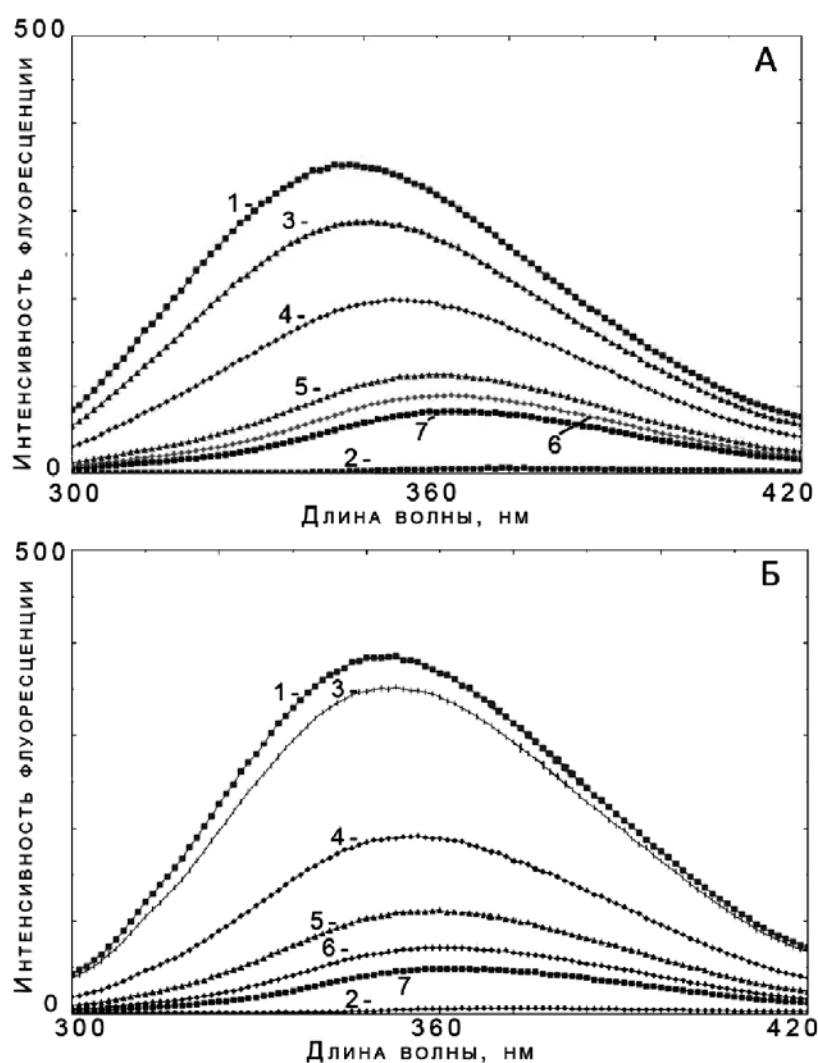


Рис. 1. Спектры триптофановой флуоресценции ЛПВП с винбластином (А) и апоА-I в комплексе с винбластином (Б):
1 – Аполипопротеин А-I; 2 – Винбластин; 3-7 – добавление аликвот винбластина к ЛПВП (А) и апоА-I (Б)

Таблица 1
Качественные и количественные характеристики взаимодействия ЛПВП и апоА-I с винбластином и актиномицином Д

Комплекс	Константа связывания (Kf)	Количество молекул связанных лигандов на 1 молекулу комплексообразователя
ЛПВП-винбластин	$2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	28
апоА-I-винбластин	$3,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	45
ЛПВП-актиномицин Д	$3,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	26
апоА-I-актиномицин Д	$1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	12

Для подтверждения процесса комплексообразования, а также оценки устойчивости комплекса ЛПВП-цитостатик и апоА-I-цитостатик мы использовали метод гельфилтрации на сефадексе G-25. Предварительно мы просканировали исследуемые противоопухолевые препараты на спектрофотометре Evolution 300 для измерения спектров поглощения этих соединений в оптической области электромагнитного излучения. Концентрации препаратов были подобраны экспериментально, с учетом разрешающей способности прибора. Для актиномицина Д были определены два максимума поглощения на длинах волн 213 нм и 440 нм. Для винбластина так же были определены два максимума поглощения на длинах волн 220 нм и 275 нм. На рис. 2. Представлен профиль элюции комплекса апоА-I с актиномицином Д.

Актиномицин Д имеет максимум поглощения на длине волны 440 нм. На рис.2 вид-

но, что актиномицин Д также поглощает в области 280 нм, кривая -1, второй пик – 13-15 мл, однако эта способность слабо выражена. При проведении элюирования на длине волны 440 нм, мы получили два пика: один совпал с пробой, в которой вышел апоА-I – это первый пик (5-9 мл) кривая под номером 2. Избыток несвязавшегося препарата вышел значительно позже – пик 2 (13-15мл). Для комплекса апоА-I с винбластином была получена аналогичная картина с визуализацией препарата на длине волны 220 нм.

Методом флуоресцентной микроскопии, используя маркер ФИТЦ, была показана возможность проникновения исследуемых комплексов в цитоплазму и ядра клеток асцитной карциномы Эрлиха. На рис. 3 можно увидеть культуру опухолевых клеток, которым в инкубационную среду был добавлен апоА-I без маркера (А). На рис. 3 (Б) комплекс апоА-I, меченного FITC с винбластином.

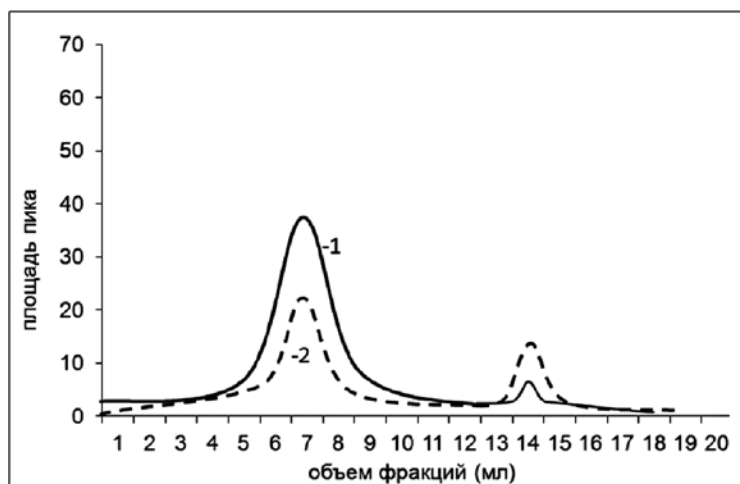


Рис. 2. Хроматографический профиль элюирования апоА-I с актиномицином Д:
1 – длина волны 280 нм; 2 – длина волны 440 нм

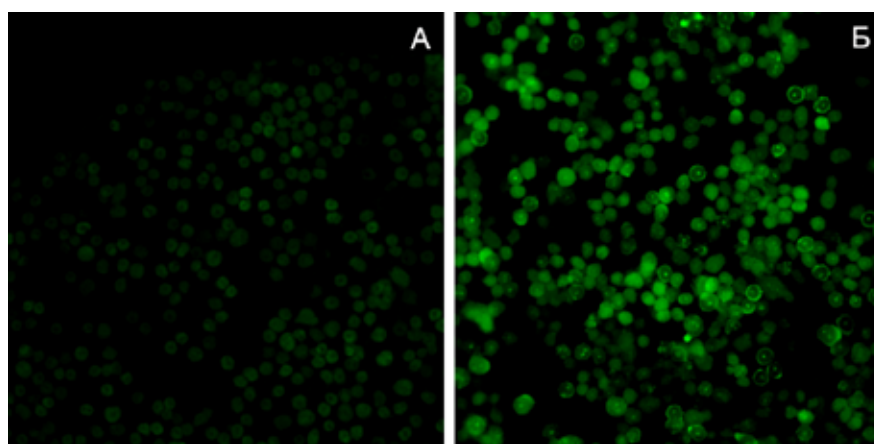


Рис. 3. Флуоресцентная микроскопия (ув. 200):
А – клетки карциномы Эрлиха при добавлении апоА-I без маркера (FITC). Б – клетки карциномы Эрлиха при добавлении комплекса апоА-I, меченного FITC с винбластином

Яркое зеленое свечение в цитоплазме и ядрах клеток рисунок 3-Б подтверждает возможность проникновения комплекса апоА-I-цитостатик в опухолевые клетки. Аналогичные результаты были получены для комплексов ЛПВП и апоА-I с актиномицином Д.

Таким образом, методами тушения флуоресценции и гель-фильтрации показано, что липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и аполипопротеин А-I (апоА-I) обладают способностью образовывать стабильные комплексы с противоопухолевыми препаратами: винбластин, актиномицин Д. Рассчитаны константы связывания и количество молекул связанных цитостатиков на 1 молекулу комплексообразователя. Показана принципиальная возможность проникновения исследуемых комплексов в цитоплазму и ядра клеток асцитной карциномы Эрлиха. Полученные результаты позволяют считать реальной возможность использования ЛПВП и апоА-I в качестве транспортных форм актиномицина Д и винбластина.

Список литературы

1. Горбунова В.А., Маренич А.Ф., Пчелин Ю.Ю. Современные возможности химиотерапии при немелкоклеточном раке легкого // Вестник московского онкологического общества. – 2006. – № 1. – С. 2.
2. Torchilin V.P. Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example // *Drug Delivery*. – 2010. – V.197. – PP. 3-53.
3. Han Baea Y., Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility // *Journal of Controlled Release*. – 2011. – V.153. – P.198-205.
4. Поляков Л.М. Липопротеины плазмы крови: транспортная система для ксенобиотиков и биологически активных веществ // *Бюллетень СО РАМН*. – 1998. – № 4. – С. 23.
5. Glickson J.D., Lund-Katz S., Zhou R., Choi H., Chen I.W., Li H., Corbin I., Popov A.V., Cao W., Song L., Qi C., Marotta D., Nelson D.S., Chen J., Chance B., Zheng G. Lipoprotein nanoplatfom for targeted delivery of diagnostic and therapeutic agents // *Mol Imaging*. 2008. V.7(2), P.101-110.
6. Polyakov L.M., Sumenkova D.V., Knyazev R.A., Panin L.E. The analysis of interaction lipoproteins and steroid hormones // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010. – № 4. – P.362 – 365.
7. Wischke C., Borchert H.-H. Fluorescein isothiocyanate labelled bovine serum albumin (FITC-BSA) as a model protein drug: opportunities and drawbacks // *Pharmazie*. – 2006. – V.61. – P.770–774.
8. Amar B., Ghisaidoobe and Sang T., Chung J. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V.15, P.22518-22538.
9. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed.; Spinger: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006. P.964.
10. Панин Л.Е., Поляков Л.М., Усынин И.Ф., Суменкова Д.В., Князев Р.А. Влияние кортикостероидов в комплексе с аполипопротеином А-I на биосинтез белка в культуре гепатоцитов // *Проблемы эндокринологии*. – 2009. – № 3. – С. 45 – 47.