

ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

ЛИПОПРОТЕИНЫ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ КАК ТРАНСПОРТНАЯ ФОРМА ДАУНОРУБИЦИНА В КЛЕТКИ ГЕПАТОМЫ МЫШЕЙ

Д. В. Суменкова, Л. М. Поляков, Л. Е. Панин¹

На культуре клеток HA-1 гепатомы мышей показана целесообразность применения липопротеинов высокой плотности в качестве транспортной формы противоопухолевого лекарственного препарата даунорубицина (рубомидина гидрохлорид). Использование липопротеинов высокой плотности в комплексе с препаратом приводило к увеличению эффективности его транспорта и цитотоксического действия в отношении опухолевых клеток по сравнению с гепатоцитами здоровых животных.

Ключевые слова: липопротеины высокой плотности, даунорубицин (рубомидина гидрохлорид), HA-1 гепатома, направленный транспорт лекарственных препаратов

ВВЕДЕНИЕ

Одним из приоритетных направлений современной фармакологии является создание комплексов лекарственных средств и носителей, позволяющих осуществлять направленный транспорт препаратов в клетки-мишени с целью увеличения их терапевтического действия и снижения побочных эффектов. Использование переносчиков в онкотерапии позволит решить проблему низкой избирательности действия противоопухолевых лекарственных средств. В последнее время изучается возможность применения липопротеинов плазмы крови как наноразмерной транспортной системы [7]. Преимущества данных носителей обусловлены рядом свойств: способностью связывать вещества различной химической природы и проникать в клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, длительностью периода полувыведения, легкой биodeградацией, неиммуногенностью, способностью избегать элиминации с участием макрофагов. Следует отметить, что активно пролиферирующие опухолевые клетки имеют повышенную потребность в липидах как в структурных компонентах, поэтому отличаются большей способностью захватывать липопротеиновые частицы [8]. В литературе хорошо освещена роль липопротеинов низкой плотности в транспорте цитостатиков [10–12], однако ряд работ указывают на возможность использования с этой целью липопротеинов высокой плотности [6, 9, 13].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на культуре клеток асцитной HA-1 гепатомы, полученных от мышей-самцов линии A/Sn(A) 3–4-месячного возраста массой 20–24 г в лог-фазе опухолевого роста (ИЦиГ СО РАН). Для сравнения использовали гепатоциты здоровых крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г, выделенные методом ферментативной перфузии с использованием коллагеназы

(“ICN Biomedicals Inc”). Животных забивали декапитацией под легким эфирным наркозом. Жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения трипанового синего, составляла не менее 95 %. Клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 20 мМ HEPES (pH 7,4), 10 % эмбриональной сыворотки коров, 2 мМ L-глутамин, 5,6 мМ глюкозы, 10 нМ инсулина, 100 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина. Инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе “Cole-Parmer” в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ и 95 % воздуха, при температуре 37 °С, используя 6-луночные планшеты, покрытые коллагеном. Плотность монослоя составляла 800 клеток/мм².

Липопротеины высокой плотности (ЛПВП) выделяли из плазмы крови методом изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе KBr в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ на центрифуге “Optima L-90K, Beckman-Coulter” с использованием углового ротора 70.1 Ti при 105000 г в течение 24 ч при 4 °С. Полученные липопротеины диализовали при 4 °С против 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 0,15 М NaCl.

В качестве противоопухолевого средства использовали антибиотик антрациклинового ряда даунорубицин (“Лэнс-фарм”), лиофилизат которого растворяли в физиологическом растворе в концентрациях 1, 3, 6, 10 мкг/мл.

Связывание препарата с ЛПВП изучали методами электрофореза в геле 1 % агарозы с расчетом коэффициента подвижности, равновесного диализа с последующей спектрометрией по флуоресценции даунорубицина (длина волны возбуждения 536 нм, эмиссии — 555–557 нм) и методом тушения триптофановой флуоресценции с расчетом количества мест связывания. Поглощение ЛПВП клетками изучали методом флуоресцентной микроскопии с использованием 1 % раствора флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ, “Fluka”) в диметилсульфоксиде. Флуорохромирование ЛПВП проводили по методике, описанной в литературе [5]. Анализ поглощения препарата и его комплекса с ЛПВП клетками проводили методом спектрофлуориметрии лизатов с учетом спектральных характеристик даунорубицина. Комплекс ЛПВП-дауноруби-

¹ НИИ биохимии СО РАМН, 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

цин готовили с учетом обнаруженного нами соотношения связывания компонентов (1:60 моль). Для лизирования клеток использовали 0,1 М трис-НСl буфер (рН 7,4), содержащий 0,1 % додецилсульфата натрия, 1 мМ ЭДТА-Na₂. Цитотоксический эффект препарата оценивали путем выявления апоптотических клеток с применением флуоресцентного красителя Hoechst 33258 ("Fluka", 20 мкг/мл) в 10 мМ трис-НСl буфере, содержащем 0,15 М NaCl (рН 7,4). Для верификации апоптоза использовали методы флуоресцентной микроскопии и спектрофлуориметрии с учетом спектральных характеристик красителя (длина волны возбуждения 374 нм, эмиссии — 460 нм). Процедуру окрашивания и подсчета клеток проводили в соответствии с методикой, описанной в литературе [1]. Для флуоресцентных исследований использовали спектрофлуориметр "Shimadzu" RF-5301 PC" и флуоресцентный микроскоп AxioImager Z1 ("Zeiss").

Все эксперименты проводили дважды в трех параллелях, статистическую обработку результатов — по общепринятому методу, используя *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение связывания даунорубина с ЛПВП выявило увеличение электрофоретической подвижности последних в 1,5 раза, что свидетельствует об изменении заряда частиц в результате образования комплексов с препаратом (коэффициент подвижности 0,36 против 0,23 в контроле). Максимальное тушение триптофановой флуоресценции ЛПВП, обусловленное изменением конформации их белкового компонента вследствие комплексообразования при добавлении алиquot даунорубина, составило 55 %. Расчет количества мест связывания на основании кривых тушения флуоресценции и результатов исследований методом равновесного диализа показал, что одна частица ЛПВП способна связать около 60 молекул препарата, вероятно, за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий.

Инкубация клеток НА-1 гепатомы при 37 °С в течение 30 мин с ФИТЦ-мечеными ЛПВП и последующая флуоресцентная микроскопия подтвердили способность частиц проникать в опухолевые клетки. Обнаружено также, что поглощение клетками комплекса ЛПВП-даунорубин происходит путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и является специфическим. Так, через 3 ч инкубации опухолевых клеток с комплексом при 37 °С интенсивность флуоресценции лизатов была в 4,4 раза больше, чем после инкубации клеток при 4 °С ($204,55 \pm 9,27$ и $47,05 \pm 10,42$ усл. ед., $p < 0,05$). Низкая интенсивность свечения в последнем случае характеризует взаимодействие типа рецептор-лиганд и свидетельствует о связывании комплекса с рецепторами цитоплазматических мембран без интернализации в клетку. Инкубация клеток НА-1 гепатомы при 37 °С в присутствии комплекса ЛПВП-даунорубин и избытка нативных ЛПВП (без препарата) приводила к снижению интенсивности свечения: при 5-кратном избытке — на 20 %, а при 10-кратном — на 60 %, что свидетельствует о насыщаемом характере рецепторного связывания и его специфичности. Рецеп-

тор-опосредованный механизм транспорта подтверждают и результаты экспериментов с предварительной обработкой опухолевых клеток 0,25 % раствором трипсина в течение 5 мин. Гидролитическое повреждение рецепторного аппарата цитоплазматических мембран приводило к выраженному снижению поглощения комплекса, что сопровождалось флуоресценцией низкой интенсивности ($10,34 \pm 2,45$ усл. ед.) на уровне контроля без добавления препарата ($6,7 \pm 1,23$ усл. ед.).

Об эффективности использования ЛПВП в качестве транспортной формы даунорубина свидетельствуют результаты сравнительной оценки поглощения препарата и его цитотоксического действия. Поглощение даунорубина клетками НА-1 гепатомы в составе комплекса было в 1,6 раза выше по сравнению с контролем без ЛПВП ($204,55 \pm 9,27$ и $130,45 \pm 8,14$ усл. ед., $p < 0,05$) при использовании одной и той же дозы препарата (10 мкг/мл). При этом поглощение комплекса гепатоцитами здоровых животных было в 1,7 раза ниже ($118,4 \pm 12,63$ усл. ед.). Обнаруженный факт свидетельствует о преимущественной доставке препарата в комплексе с ЛПВП именно в опухолевые клетки. Возможно, клетки гепатомы в связи с высокой потребностью в холестерине имеют большее количество рецепторов для ЛПВП или более высокий их аффинитет. Отмечено значительное снижение ЛПВП-холестерина у больных лейкемией [4]. Показано, что у онкологических больных независимо от вида опухоли и степени ее роста в сыворотке крови снижено содержание апоА-I — основного белкового компонента ЛПВП [3].

Цитотоксический эффект препарата в отношении опухолевых клеток также был выше при использовании его в составе комплекса. Для сравнительной оценки противоопухолевого действия разных форм использования даунорубина клетки НА-1 гепатомы инкубировали в течение 24 ч в присутствии свободного препарата и в составе комплекса в концентрациях 1, 3 и 6 мкг/мл. Последующее окрашивание клеток флуоресцентным красителем Hoechst 33258 и спектрофлуориметрический анализ лизатов обнаружили дозозависимый характер цитотоксического эффекта препарата, наиболее выраженный при использовании ЛПВП в качестве носителя и концентраций даунорубина 1 и 3 мкг/мл (табл. 1). В этом случае ин-

Таблица 1. Оценка противоопухолевой эффективности даунорубина в комплексе с липопротейнами высокой плотности (спектрофлуориметрия лизата клеток НА-1 гепатомы в спектре красителя Hoechst 33258)

Группа	Интенсивность флуоресценции, усл. ед. $M \pm m$, $n = 6$
Контроль без препарата	$7,3 \pm 1,32$
Даунорубин, 1 мкг/мл	$48,7 \pm 8,24$
ЛПВП-даунорубин, 1 мкг/мл	$158,5 \pm 17,14$ *
Даунорубин, 3 мкг/мл	$176,2 \pm 15,73$
ЛПВП-даунорубин, 3 мкг/мл	$278,4 \pm 16,22$ *
Даунорубин, 6 мкг/мл	$203,2 \pm 14,78$
ЛПВП-даунорубин, 6 мкг/мл	$220,5 \pm 15,31$

* — $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой, но без ЛПВП.

Таблица 2. Количество апоптотических клеток HA-1 гепатомы (% от общего числа) после воздействия даунорубицина и его комплекса с липопротеинами высокой плотности

Показатель	Даунорубицин, мкг/мл			ЛПВП-даунорубицин, мкг/мл		
	1	3	6	1	3	6
% клеток	4,7 ± 1,5	14 ± 2,7	44,2 ± 7,3	16 ± 3,2 *	36,7 ± 6,1*	63,2 ± 9,2

* — $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой, но без ЛПВП.

тенсивность флуоресценции, обусловленная количеством связавшегося с ДНК красителя, была выше в 3,3 и 1,6 раза соответственно. С увеличением дозы препарата различия в формах его применения нивелировались.

Результаты флуоресцентной микроскопии с расчетом количества апоптотических клеток представлены в табл. 2. Как видно, применение препарата в составе комплекса с ЛПВП приводило к статистически значимому повышению числа апоптотических клеток в зависимости от используемой концентрации даунорубицина: 1 мкг/мл — в 3,4 раза, 3 мкг/мл — в 2,6 раза.

На основании полученных результатов и ранее проведенных нами исследований по изучению взаимодействия лекарственных соединений с липопротеинами плазмы крови можно предположить, что при внутривенном введении даунорубицина образуются комплексы препарата с ЛПВП. Так, в ранних работах было изучено распределение меченого тритием бензилпенициллина между фракциями липопротеинов при внутривенном введении препарата крысам. Показано, что из 40 % связанного с липопротеинами бензилпенициллина большая часть (17,6 %) находится в комплексе с ЛПВП, 60 % препарата взаимодействует с белками плазмы крови [2]. Однако использование предварительно образованного комплекса даунорубицина с ЛПВП позволит значительно уменьшить связывание препарата с белками плазмы и захват клетками нормальной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Липопротеины высокой плотности способны связывать молекулы даунорубицина с образованием комплекса в молярном соотношении 1:60.

2. Транспорт даунорубицина в клетки HA-1 гепатомы наиболее эффективен в составе комплекса с липопротеинами высокой плотности и обусловлен рецептор-опосредованным эндоцитозом.

3. Использование липопротеинов высокой плотности в качестве транспортной формы даунорубицина повышает избирательность действия препарата, который захватывается преимущественно клетками гепатомы в сравнении с гепатоцитами здоровых животных.

4. Цитотоксический эффект даунорубицина, определяемый по числу апоптотических клеток HA-1 гепатомы, выше при использовании в комплексе с липопротеинами высокой плотности и реализуется при низких дозах препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. О. Данченко, *Вопр. мед. химии*, **47**(2), 236 – 242 (2001).
2. Л. М. Поляков, *Бюл. СО РАМН*, **89**(3), 23 – 29 (1998).
3. О. Н. Потеряева, Г. С. Русских, *Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов*, Новосибирск (2009), сс. 195 – 196.
4. S. Baroni, D. Scribano, L. Pagano, et al., *Leuk Res.*, **18**(8), 643 – 644 (1994).
5. H. Hidaka, E. Hidaka, M. Tozuka, et al., *J. Lipid. Res.*, **40**(6), 1131 – 1139 (1999).
6. A. Kader, A. Pater, *J. Control Release.*, **80**(1 – 3), 29 – 44 (2002).
7. A. G. Lacko, M. Nair, L. Prokai, W. J. McConathy, *Expert Opin. Drug. Deliv.*, **4**(6), 665 – 675 (2007).
8. M. Lenz, W. P. Mische, F. Vahrenwald, et al., *Anticancer Res.*, **17**(2A), 1143 – 1146 (1997).
9. B. Lou, X. L. Liao, M. P. Wu, et al., *World J. Gastroenterol.*, **11**(7), 954 – 959 (2005).
10. M. Masquelier, B. Lundberg, C. Peterson, S. Vitols, *Leuk. Res.*, **30**(2), 136 – 144 (2006).
11. M. Nikanjam, A. R. Gibbs, C. A. Hunt, et al., *J. Control. Release.*, **124**(3), 163 – 171 (2007).
12. R. S. Teixeira, C. J. Valduga, L. A. Benvenuti, et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**(10), 1287 – 1295 (2008).
13. X. Zhang, B. Chen, *Cancer Lett.*, **298**(1), 26 – 33 (2010).

Поступила 09.11.11

HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS AS A FORM OF DAUNORUBICIN TRANSPORT IN HEPATOMA CELLS OF MICE

D. V. Sumenkova, L. M. Polyakov, and L. E. Panin

Institute of Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. akad. Timakova 2, Novosibirsk, 630117, Russia

The efficiency of using high-density lipoproteins (HDLs) as the transport form of an antineoplastic drug daunorubicin (rubomycin hydrochloride, daunoxome) has been shown on the culture of HA-1 hepatoma cells of mice. The use of HDLs in a complex with daunorubicin led to an increase in the efficiency of drug transport and cytotoxic action with respect to tumor cells in comparison with hepatocytes of healthy animals.

Key words: High density lipoproteins, daunorubicin (rubomycin hydrochloride, daunoxome), HA-1 hepatoma cells, targeted drug delivery