

## ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I С АКТИНОМИЦИНОМ Д НА БИОСИНТЕЗ ДНК В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

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

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биохимии», Новосибирск, e-mail: Nataliya.V.T@yandex.ru*

Химиотерапия является одним из основных способов коррекции роста злокачественных новообразований. Однако этот способ терапии связан с риском интоксикации организма противоопухолевыми препаратами и их метаболитами. 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. В данной работе в качестве переносчика противоопухолевого препарата актиномицина Д использовали аполипопротеин А-I. Показано, что актиномицин Д в комплексе с аполипопротеином А-I в концентрации ниже пороговой снижал скорость биосинтеза ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха по сравнению с препаратом без переносчика. Полученные результаты позволяют сделать вывод о повышении цитостатического эффекта актиномицина Д при использовании его в составе комплекса с аполипопротеином А-I.

Ключевые слова: аполипопротеин А-I, транспортные формы противоопухолевых препаратов, актиномицин Д, гепатоциты, асцитная карцинома Эрлиха, химиотерапия.

## INFLUENCE OF COMPLEX APOLIPOPROTEIN A-I IN WITH ACTINOMYCIN D OF DNA BIOSYNTHESIS IN NORMAL AND TUMOR CELLS

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

*Federal State Scientific Institution "Research Institute of Biochemistry", Novosibirsk, e-mail: Nataliya.V.T@yandex.ru*

Chemotherapy is one of the main ways of correction growth of malignant neoplasms. However, this method of therapy associated with the risks of intoxication anticancer drugs and their metabolites. Therefore, one of the pressing issues of modern pharmacology is the development of drugs aimed antitumor action or creating dosage forms selective cytostatics already known to enhance the effectiveness of chemotherapy and reduce general toxic effect on the patients. In this paper as a carrier of anticancer drug actinomycin D was used apolipoprotein A-I. It is shown that the actinomycin D in a complex with apolipoprotein A-I in a concentration below the threshold reduced speed DNA biosynthesis in cells of Ehrlich ascites carcinoma in comparison with the preparation without a carrier. These results suggest a cytostatic effect increasing actinomycin D, when used in the complex with apolipoprotein A-I.

Keywords: apolipoprotein A-I, transport form of anticancer drugs, actinomycin D, hepatocytes, Ehrlich ascites carcinoma, chemotherapy.

Терапевтический эффект препарата во многом зависит от способности лекарственной формы достигать патологических участков. В последние годы наблюдается рост научных исследований в области таргетной терапии опухолей, разработаны наночастицы, способные выступать в качестве переносчиков лекарственных средств [6]. Ранее нами была показана способность аполипопротеина А-I (апоА-I) образовывать комплексы с такими противоопухолевыми препаратами, как актиномицин Д и винбластин, изучено влияние этих комплексов на биосинтез ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха [1,2]. В своей работе мы использовали актиномицин Д – препарат из группы противоопухолевых антибиотиков, продуцируемых актиномицинами *Streptomyces parvullus*. Его противоопухолевое действие обусловлено интеркаляцией между парами азотистых оснований гуанин-цитозин ДНК и

препятствием движению РНК-полимеразы, нарушая, таким образом, транскрипцию антиапоптозных генов [10]. Актиномицин Д представляет собой один из химиотерапевтических препаратов, которые используют в лечении различных видов рака, и является составной частью комбинированной терапии опухолей у детей [12].

**Целью** настоящей работы явилось изучение влияния апоА-I в комплексе с актиномицином Д на скорость биосинтеза ДНК в культуре клеток асцитной карциномы Эрлиха и гепатоцитов.

### **Материалы и методы**

#### **Выделение аполипопротеина А-I**

Белок получали путем делипидирования липопротеиновых фракций высокой плотности (ЛПВП), охлажденной смесью этанол-ацетон (1:1). Осадок белков многократно отмывали охлажденным эфиром и высушивали в токе азота. Смесью белков (20–30 мг), солюбилизировали в растворе (2 мл), содержащем 3 %  $D_S$ -Na (m/V), 1 мМ меркаптоэтанол и наносили на колонку (1,6 x 100 см,  $V_0 = 55$  мл) с Сефарозой 6В-CL («Pharmacia», Швеция). Элюировали 0,01 М трис-HCl буфером (рН 8,6), содержащим мочевины (6 М), азид натрия (0,01%) и фенилметансульфонилфторид (1 мМ).

Скорость потока элюента при хроматографии составляла 10 мл/ч, продолжительность сбора одной фракции – 20 мин, скорость самописца – 0,015 см/мин. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе при длине волны 280 нм и уровне чувствительности 1,28. Проверку чистоты апоА-I осуществляли методом диск-электрофореза в ПААГ с  $D_S$ -Na. Для разделения смеси белков использовали 3 % концентрирующий и 12,5 % разделяющий гель (V/V), содержащие 0,1 %  $D_S$ -Na. Объем пробы составлял 10–20 мкл. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (рН 8,3), содержащем 0,1 %  $D_S$ -Na, при комнатной температуре в течение 3 ч при силе тока 10–20 мА на  $см^2$  [5]. Белковые полосы визуализировали 0,1 % Кумасси G-250 в смеси метанола и 10 % уксусной кислоты (1:1, V/V). В качестве маркеров использовали набор белков-стандартов («Page Ruler Prestained Protein Ladder» 10-170 кДа «Thermo Scientific», США).

Обессоливание апоА-I проводили методом гель-фильтрации. Раствор белка в мочевины (1,5–2 мл) наносили на колонку (0,8 x 20 см,  $V_0 = 6$  мл) с Сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция), и элюировали 0,05 М калий-фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl. Скорость потока – 1 мл/мин, скорость самописца – 0,15 см/мин. Профиль элюции регистрировали на УФ-детекторе при длине волны 280 нм. Концентрация обессоленного белка составляла 0,2 мг/мл [4].

#### **Оценка скорости биосинтеза ДНК в культуре клеток**

Определение скорости биосинтеза ДНК оценивали по включению  $^3\text{H}$ -тимидина. Для этого за 2 ч до окончания эксперимента в клеточную культуру добавляли 2мкКи/мл  $^3\text{H}$ -тимидина («Amersham», Англия). После окончания культивирования клетки лизировали 0,2н раствором NaOH. Для измерения радиоактивности содержимое лунки (100 мкл) переносили на целлюлозные фильтры («Whatman 3 ММ», Англия), предварительно обработанные 10 % трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Далее последовательно отмывали от несвязавшейся метки холодным раствором 10 % трихлоруксусной кислоты, затем в горячем 5 % ТХУ и смесью этанол-эфир (1:1). Радиоактивность образцов измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Дельта-300» (ТМ Analytic, Нидерланды) и выражали в имп/мин на 1 мг белка [8]. В работе использовали 1 мМ исходный маточный раствор актиномицина Д («Applichem», Германия).

### **Выделение клеток асцитной карциномы Эрлиха**

Для эксперимента использовали мышей-самцов линии Black, массой 20–25 г. Клетки асцитной карциномы получали из перитонеального экссудатана 10 день после перевивания. Асцитную жидкость вносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 150g для осаждения клеточных элементов. Осадок клеток трижды промывали холодным раствором Рингера – Кребса.

### **Изолирование и фракционирование клеток печени**

Процедура получения гепатоцитов включала четыре основных этапа: (1) перфузия печени *in situ* раствором Хэнкса без  $\text{Ca}^{++}$ ; (2) рециркуляционная перфузия печени *in vitro* раствором коллагеназы; (3) механическая дезагрегация ткани; (4) дифференциальное центрифугирование при 50g для получения осадка очищенных гепатоцитов [11]. Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Жизнеспособность клеток оценивали по исключению трипанового синего [3].

Свежевыделенные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия), pH 7,4, содержащей 20 мМ HEPES («ICN Biomedicals, Inc», США), 2 мМ L-глутамин («Вектор», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина, 5,6 мМ глюкозы. Планшеты предварительно покрывали раствором коллагена (0,1 мг/мл) в 0,1 % уксусной кислоте. После сорбции коллагена планшеты отмывали 0,9 % раствором NaCl и подсушивали. Инкубацию клеток (плотность 800 клеток/мм<sup>2</sup>) проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («Cole-Parmer», США) при температуре 37 °С, влажности 85 % в атмосфере, содержащей CO<sub>2</sub> (5 %) и воздуха (95 %) [7]. Среду заменяли через 2 ч после посева клеток и образования монослоя.

**Определение связывающей способности аполипопротеина А-I с противоопухолевым препаратом методом тушения триптофановой флуоресценции**

Комплекс апоА-I с актиномицином Д получали, выдерживая их смесь в 0,05 М калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl, в течение 15 мин при комнатной температуре. Образование комплексов апоА-I с актиномицином Д подтверждали методом тушения триптофоновой флуоресценции. Для этого проводили титрование в термостатируемой кювете при температуре 20 °С с добавлением аликвотцитостатика (по 1мкл) к 2 мл апоА-I в ФСБ (рН 7,4). Снижение флуоресценции составило 73 %. Данное снижение можно расценивать как результат образования комплекса аполипопротеин А-I–актиномицин Д [1]. Комплекс апоА-I–актиномицин Д добавляли к культуре клеток и инкубировали в течение 5 ч. Актиномицин Д применяли в двух концентрациях: 0,1 и 1 мкг/мл [10]. В качестве контроля выступали клетки, которым в среду инкубации добавляли физиологический раствор.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы StatPlus 2009 Professional5.8.4. (США). Статистическую значимость полученных результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования

На культуре клеток асцитной карциномы Эрлиха показано, что сам апоА-I не изменял скорость биосинтеза ДНК в клетках (рис. 1). Однако присутствие в среде инкубации одного актиномицина Д, а также в составе комплекса апоА-I-актиномицин Д (концентрация актиномицина Д 1мкг/мл среды) резко снижает скорость биосинтеза ДНК в клетках (рис.1). Следует отметить, что различия в этих двух группах между собой были незначительны.

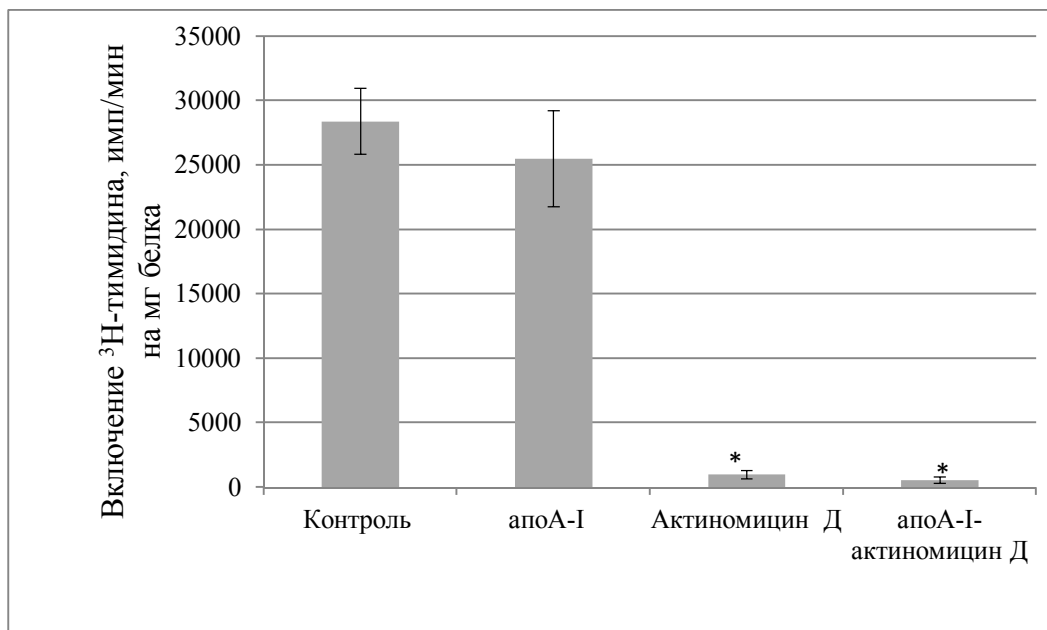


Рис.1. Скорость биосинтеза ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха. Концентрация актиномицина Д 1 мкг/мл

\* – достоверное различие по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ).

Мы уменьшили концентрацию цитостатика в 10 раз, т.о. она составила 0,1 мкг/мл среды. Оказалось, что в этой концентрации один актиномицин Д (0,1 мкг/мл) не оказывал цитотоксического эффекта – скорость включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК практически не изменялась (рис. 2). Не влиял на включение метки в ДНК и апоА-I без цитостатика. Однако актиномицин Д в составе комплекса сапоА-I снижал биосинтез ДНК в клетках на 60 % по сравнению с контрольными величинами.

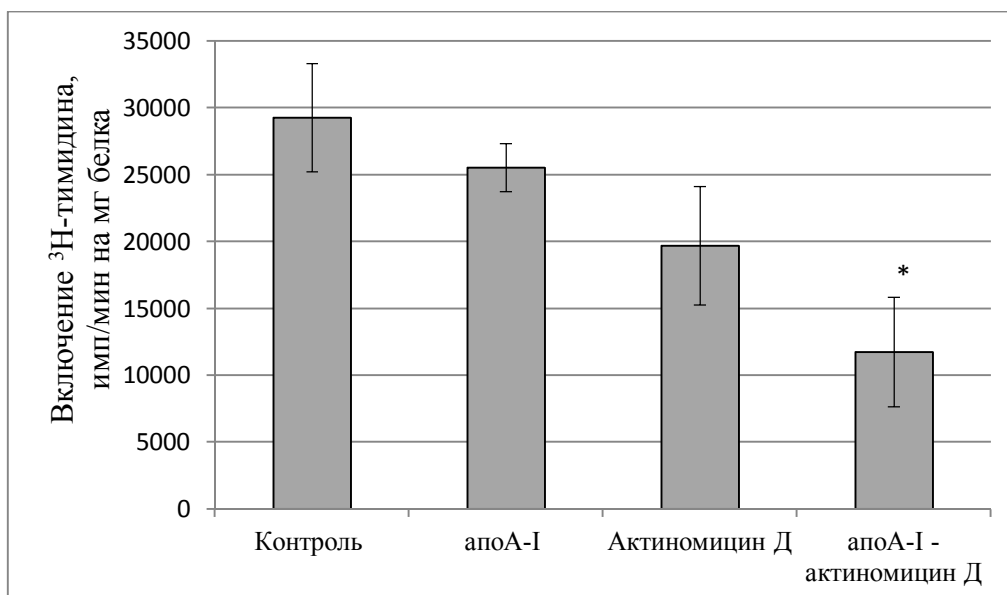
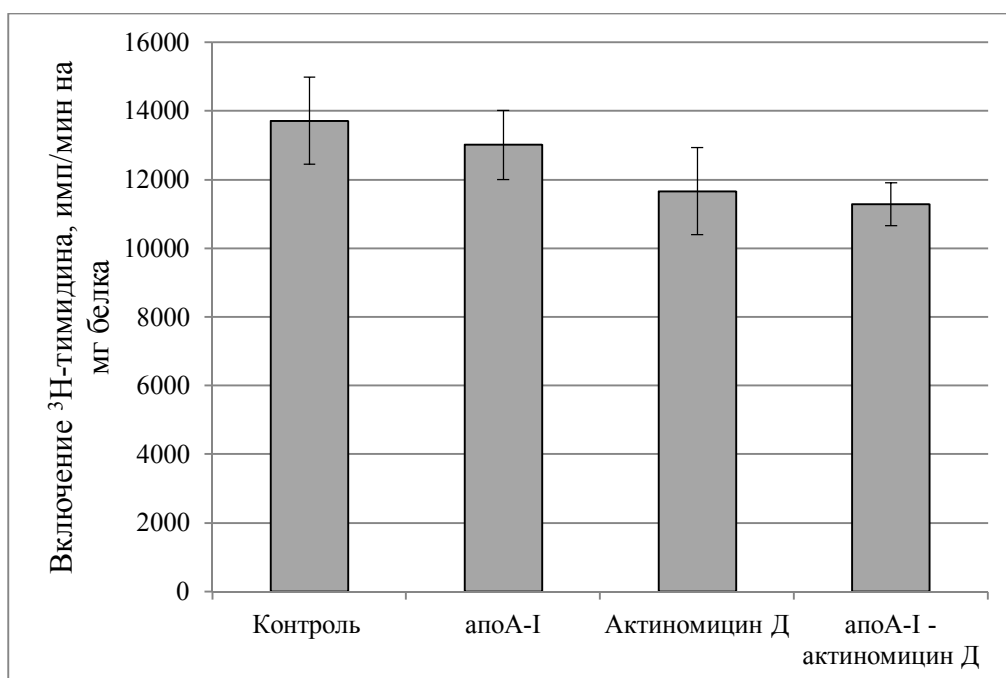


Рис. 2. Скорость биосинтеза ДНК в клетках асцитной карциномы Эрлиха. Концентрация актиномицина Д 0,1 мкг/мл

\* – достоверное различие по сравнению с контролем ( $p < 0,04$ ).

Следует задать вопрос: а как влияет в этой концентрации цитостатик (0,1 мкг/мл) на здоровые клетки? На культуре гепатоцитов здоровых крыс мы показали, что ни один из этих компонентов, в том числе и актиномицин Д в концентрации 0,1 мкг/мл, не оказывал статистически значимого влияния на скорость включения меченого тимидина в ДНК (рис. 3).



*Рис. 3. Скорость биосинтеза ДНК в гепатоцитах.  
Концентрация актиномицина Д 0,1 мкг/мл*

### **Выводы**

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что комплекс апоА-I с актиномицином Д обладает выраженным цитостатическим действием даже в минимальных концентрациях по сравнению с отдельно взятым противоопухолевым препаратом. Это можно объяснить наличием на мембране опухолевых клеток большого количества специфических рецепторов к апоА-I [9], что, по-видимому, позволяет препарату эффективнее попадать внутрь клетки и проявлять противоопухолевую активность.

### **Список литературы**

1. Князев Р.А., Трифонова Н.В., Поляков Л.М. Изучение способности липопротеинов высокой плотности и аполипопротеина А-I связывать и транспортировать противоопухолевые препараты в клетки асцитной карциномы Эрлиха // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2015. – № 11-4. – С. 538-542.
2. Князев Р.А., Трифонова Н.В., Поляков Л.М. Изучение эффективности цитостатического действия комплекса аполипопротеина А-I с винбластином // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 6; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=23832>.

3. Панин Л.Е., Белоногова Ж.И., Князев Р.А., Чешенко И.О. Влияние кортизола в комплексе с липопротеинами очень низкой плотности на развитие и гепатомы HA-1 и карциномы Эрлиха // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 3 (57). – С.43–46.
4. Поляков Л.М., Суменкова Д.В., Князев Р.А., Панин Л.Е. Анализ взаимодействия липопротеинов и стероидных гормонов // Биомедицинская химия. – 2011. – 57(3). – С. 308-313.
5. Brace R.J., Sorrenson B., Sviridov D., McCormick S.P.A. A gel-based method for purification of apolipoprotein A-I from small volumes of plasma // Journal of Lipid Research. – 2010. – V.51. – P.3370. – 3376.
6. Cho K., Wang X.U., Nie S., Shin D.M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer // Clinical cancer research. – 2008. – Т. 14. – №. 5. – P. 1310-1316.
7. Fan Y., Liu C., Huang Y., Zhang J., Cai L., Wang S., Zhang Y., Duan X., Yin Z. Dipyrithione induces cell-cycle arrest and apoptosis in four cancer cell lines in vitro and inhibits tumor growth in a mouse model // BMC Pharmacology and Toxicology. – 2013. – P.14-54.
8. Ganta C., Chiyo D., Ayuzawa R., Rachakatla R., Pyle M., Andrews G., Weiss M., Tamura M., Troyer D. Rat Umbilical Cord Stem Cells Completely Abolish Rat Mammary Carcinomas with No Evidence of Metastasis or Recurrence 100 Days Post-Tumor Cell Inoculation // Cancer Research. – 2009. – V.69. – I.5. – P. 1815–1820.
9. Li J., Wang J., Li M., Yin L., Li X.A., Zhang T.G. Up-regulated expression of scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) is associated with malignant behaviors and poor prognosis of breast cancer // Pathology-Research and Practice. – 2016. – Т. 212. – № 6. – P. 555-559.
10. Lu D., Wang Y., Li Ch., Wei G., Chen R., Dong D., Yao M. Actinomycin D inhibits cell proliferations and promotes apoptosis in osteosarcoma cells // Int J ClinExp Med. – 2015. – Т. 8. – №. 2. – P. 1904-11.
11. Papeleu P., Vanhaecke T., Henkens T., Elaut G., Vinken M., Snykers S., Rogiers V. Isolation of rat hepatocytes // Cytochrome P450 Protocols. – 2006. – P. 229-237.
12. Tzaridis T., Milde T., Pajtler K.W., Bender S., Jones D.T., et al. Low-dose Actinomycin-D treatment re-establishes the tumoursuppressive function of P53 in RELA-positive ependymoma // Oncotarget. – 2016.