



# ФОТОАКТИВНОСТЬ АКТИНОМИЦИНОВЫХ НАНОКОМПЛЕКСОВ

Н. Векшин\*, д.б.н. / nvekshin@rambler.ru

**П**рименение многих гетероциклических антибиотиков при лечении опухолевых заболеваний основано на их способности формировать устойчивый наноконкомплекс с ядерной ДНК и ингибировать РНК полимеразную реакцию. В результате подавляются синтез белка и клеточное деление. Некоторые гетероциклические антибиотики при низких концентрациях образуют прочные нестэкинговые (антибиотик не встроен между основаниями ДНК) наноконкомплекс с расплетенными участками ДНК, тем самым стабилизируя такую молекулу. Типичными среди них являются актиномицины. Вместе с тем большинство гетероциклических антибиотиков плохо проникает внутрь опухолевых клеток [1]. Повысить проникаемость можно с помощью нагрева или формирования наноконкомплексов антибиотика с имеющими форму шпильки (шпилечными) олигонуклеотидами [2]. В статье на примере природного антибиотика актиномицина Д (АМД) и его флуоресцирующего аналога 7-амино-актиномицина Д (7ААМД) показано, что их накопление в модельных опухолевых клетках HeLa и последующее интенсивное световое облучение вызывают быстрое повреждение и даже деструкцию таких клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались АМД и 7ААМД (Reanal, Венгрия и Fluka, Швейцария), ДНК из фага лямбда (№ 25250-010 GibcoBRL, США), химически чистый кофеин. Растворы готовились на бидистиллированной воде в день опыта. Концентрация АМД и 7ААМД определялась фотометрически из коэффициента экстинкции.

Спектры поглощения используемых актиномицинов регистрировались в диапазоне 220–600 нм на спектрофотометре Specord M-40 в кюветках с оптическим путем от 0,1 до 1 см, а спектры флуоресценции 7ААМД – в диапазоне 560–790 нм (длина волны возбуждения – 530 нм) на спектрофлуориметре Perkin-Elmer MPF-44B или SLM-4800 (США) при 20°С в односантиметровых кварцевых кюветках.

## Проникновение антибиотика в клетки HeLa

Исследование проникновения микромолярных концентраций АМД и 7ААМД в модельные опухолевые клетки HeLa проводилось в "мягких" (инкубация 5 мин при 20°С) и "жестких" (30 мин при 37°С) условиях, соответственно. Клетки культивировались на питательной среде RPMI 1640. Средой для работы был 20-мМ трис с 200-мМ сахарозой (рН = 7,5). Образцы с антибиотиком после инкубации для осаждения клеток, в которых оставались только связанные с ними 7ААМД или АМД, центрифугировались при 600 об/мин. После этого жидкость, располагающаяся над твердым слоем, отбиралась, а осадок разбавлялся до нужной концентрации.

## Фотоактивация и микроскопия

Облучение 7ААМД в растворе производилось 450-Вт ксенонной лампой. Свет проходил через 5%-ный раствор сернокислой меди (тепловой фильтр), интерференционный светофильтр на 540 нм и нейтральный

\*ФГБУН "Институт биофизики клетки РАН" (Пущино).



ослабляющий светофильтр НС-3. После этого он попал на 200 мкл раствора образца, помещенного в герметично закрытую 0,4-см зеркальную микрокювету, усиливающую флуоресцентный сигнал и ускоряющую фотохимические реакции. Световой пучок проходил через весь объем раствора, нагрев которого в ходе облучения не превышал 1<sup>o</sup>С. Эксперименты по фотоактивации АМД в растворе и клетках проводились с помощью той же лампы. Образцы, термостабируемые при 20<sup>o</sup>С, помещались в 1-см зеркальные кюветы и освещались через тепловой фильтр без светофильтров. Аналогичным образом облучался антибиотик, накопившийся в клетках при инкубации. Микрофотографии клеток HeLa были получены с помощью оптического микроскопа Carl Zeiss и цифровой фотокамеры Sony Cyber Shot (5 Мпикселей).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучено проникновение АМД и 7ААМД в модельные опухолевые клетки HeLa. При "мягких" условиях инкубации эти антибиотики в микромолярных концентрациях плохо проникают в такие клетки. Однако в "жестких" условиях наблюдалось их хорошее проникновение. В табл.1 приведены данные по проникновению 7ААМД из раствора внутрь клеток. Видно, что в исходном растворе антибиотик присутствует, а после инкубации его практически нет. Таким

Таблица 1. Интенсивность флуоресценции 7ААМД в клетках HeLa

Состояние	Флуоресценция, отн. ед.
<i>Исходное состояние</i>	
7ААМД в растворе	1
Клетки с 7ААМД	1,24
Клетки без антибиотика	1,04
<i>После инкубирования (30 мин при 37<sup>o</sup>С)</i>	
Остаток 7ААМД в растворе	0,04
Клетки с накопившимся 7ААМД	8
Клетки без антибиотика	2,64

Примечание. Образцы флуориметрировались в зеркальных микрокюветах. Возбуждение – 540 нм, эмиссия – 610 нм, концентрация 7ААМД – 10 мкМ.

Таблица 2. Влияние внутриклеточного АМД на интенсивность триптофановой флуоресценции белков клеток HeLa

Состав пробы	Интенсивность триптофановой флуоресценции, отн. ед.
Клетки	14
Клетки с АМД	7
Клетки и АМД в присутствии кофеина	12

Примечание. Возбуждение – 295 нм, излучение – 338 нм, концентрация АМД – 10 мкМ.

образом, он почти весь входит в клетки. При этом важно отметить исходную неаддитивность его флуоресценции и фоновой интенсивности самих клеток. Это свидетельствует о том, что, находясь внутри клеток, 7ААМД излучает гораздо слабее, чем в растворе. Значит, либо он, входя в клетки, хуже поглощает возбуждающий свет, либо чем-то сильно дезактивируется в клетках. Однако когда в клетках накапливается довольно много антибиотика, он начинает флуоресцировать почти на порядок сильнее, чем в растворе.

Обнаружено, что при проникновении актиномицинов внутрь клеток они способны уменьшать триптофановую флуоресценцию клеточных белков. Данные для АМД приведены в табл.2. С целью исключения экранирования (при 295 нм) и реабсорбции (при 338 нм) триптофановой флуоресценции находящимися в растворе молекулами АМД измерения проводились на клетках, инкубированных в течение 30 мин, с их повторным переосаждением с накопившимся внутри антибиотиком. При этом, однако, нельзя исключать микроэкранировку возбуждающего света (при 295 нм) и микрореабсорбцию (при 338 нм) триптофановой флуоресценции скопившимися внутри клеток молекулами АМД. Величина таких оптических эффектов рассмотрена в [3]. Действительно, хотя коэффициент экстинкции АМД при указанных длинах волн в несколько раз ниже, чем при 445 нм, однако за счет высокого внутриклеточного концентрации АМД (клетки при оптическом микроскопировании в проходящем свете окрашиваются в желтоватый цвет) локальные оптические плотности АМД при 295 и 338 нм суммарно составляли около 0,2 (оптическая плотность 0,2 соответствует светопропусканию 50%). Это означает, что интенсивность триптофановой флуоресценции белков должна быть снижена примерно на половину, что и наблюдалось в опыте.



Добавление в среду кофеина в миллимолярной концентрации заметно снижало этот эффект. По-видимому, избыточные кластеры кофеина в растворе сорбировали АМД, не давая ему перераспределяться к внутриклеточной ДНК и препятствуя накоплению АМД в клетках HeLa, что согласуется с результатами, полученными на дрожжевых клетках [1].

Для визуализации антибиотика в клетках оптической микроскопией и цифровой фотосъемкой зарегистрировано, что АМД или его наноконкомплекс с кофеином при 20°C сорбируется на плазматической мембране клеток HeLa в течение первых 10 мин, а затем при 30-мин инкубации при комнатной температуре медленно проникает внутрь клеток.

### Фотодеструкция антибиотика

АМД в наноконкомплексе с ДНК обладает фотодинамической активностью: в электронно-возбужденном состоянии принимает электрон с ДНК, что приводит к генерации свободных радикалов [1]. Важно отметить, что АМД сам также обладает такой активностью. При облучении его водного раствора в зеркальной микрокювете светом 450-Вт ксеноновой лампы (с использованием 5%-ного раствора сульфата меди в качестве теплового фильтра) по фотоблэчингу (выцветанию в спектре поглощения) обнаруживается фотохимическое превращение антибиотика (рис.1).

Фотоблэчинг происходит за счет прямой фотохимической трансформации АМД и в результате его фотоокисления молекулярным или синглетным

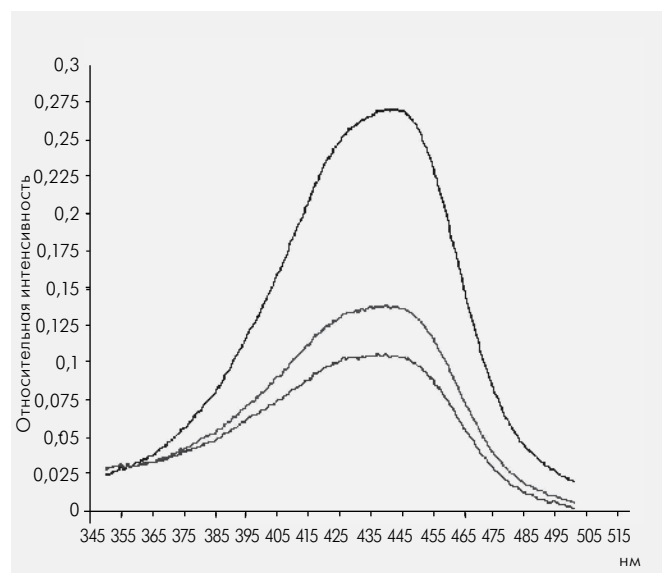


Рис.1. Фотоблэчинг АМД в водном растворе: спектр поглощения исходный (вверху); после облучения (внизу); после облучения в присутствии кофеина (в середине). Спектры поглощения измерены после 18-мин облучения

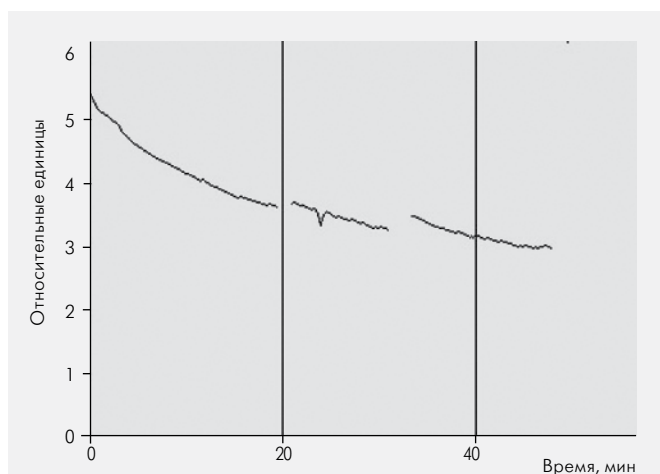


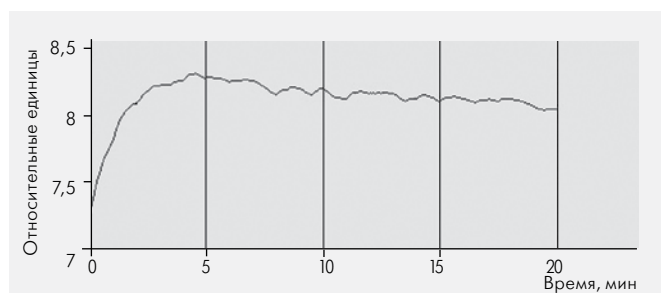
Рис.2. Изменение интенсивности флуоресценции (отн.ед.) 7ААМД в водном растворе под действием облучения 540 нм (освещаемый объем – 200 мкл, в зеркальной микрокювете). Разрыв на графике – выдерживание пробы в темноте. Концентрация 7ААМД – 5 мкМ

кислородом, образующимся при взаимодействии с триплетным возбужденным АМД [1]. Кофеин в миллимолекулярных концентрациях увеличивает степень фотоблэчинга АМД. Вероятно, это связано с тем, что при сорбции на поверхности кофеиновых кластеров антибиотик существенно экранирован от воды, забирающей энергию электронного возбуждения на свои колебательные моды [4].

В случае 7ААМД, при очень малых концентрациях антибиотика, выцветание проявляется в уменьшении интенсивности флуоресценции. Например, при измерениях на флуоресцентном корреляционном микроскопе ConfoCor обнаружено, что причиной этого был переход фотовозбужденных молекул 7ААМД в триплеты вследствие высокой плотности лазерного возбуждающего света [5]. При описании двухэкспоненциальной зависимости получены примерно равные компоненты с характерным временем в 2 и 34 с, т.е. 7ААМД в водном растворе существует в двух отличающихся по фотостабильности состояниях.

На рис.2 показан флуоресцентный фотоблэчинг 7ААМД в воде, измеренный в зеркальной микрокювете на обычном спектрофлуориметре. Он вряд ли вызван переходом в триплетное состояние, поскольку сохраняется в течение нескольких минут. После прерывания освещения и выдерживании пробы в темноте в течение 1 или 2 мин (20–21-я и 30–32-я мин) интенсивность флуоресценции слегка повышается и не возвращается к исходной.

При связывании с ДНК фотохимическая активность 7ААМД способна повышаться, что можно



**Рис.3.** Изменение интенсивности флуоресценции (отн.ед.) 7-ААМД в присутствии лямбда-ДНК под действием облучения 540 нм. Концентрация 7-ААМД – 5 мкМ, концентрация лямбда-ДНК – 50 мкМ (пар нуклеотидов)

использовать в фотодинамической терапии. Наиболее фотохимически активный – наноконкомплекс с фрагментированной ДНК из тимуса телят, наименее фоточувствительный – с плазмидой рGEM3Zf(+) [5], которая в отличие от тимусной ДНК практически не содержит разрывов и расплетенных участков, фотоблэчинг по сравнению с 7ААМД в воде заметно снижается (рис.3). В первые минуты происходит заметное возрастание интенсивности, а после 5-й мин – медленное ее снижение. Возрастание вызвано, по-видимому, повышением связывания дополнительных молекул антибиотика в ходе облучения макромолекулой лямбда-ДНК. После того, как такое фотоиндуцированное связывание в основном завершается, наблюдается

**Таблица 3.** Гибель клеток HeLa при их фотосенсибилизации

Состав пробы	Нативные клетки, %	Поврежденные клетки, %	Разрушенные клетки, %
Клетки	100	0	0
5 мин облучения	80	12	8
5 мин без облучения	99	1	0
Клетки с накопленным АМД	100	0	0
5 мин облучения	40	15	45
5 мин без облучения	98	2	0

Примечание. Микрофотографии клеток HeLa получены с помощью микроскопа Carl Zeiss и цифровой фотокамеры Sony Cyber Shot (5 Мпикселей). Концентрация АМД – 10 мкМ.

**Таблица 4.** Параметры спектра поглощения АМД при фоторазрушении клеток HeLa

Состав пробы	Максимум спектра поглощения, нм	Спектральная полуширина, нм	Оптическая плотность в максимуме
Клетки с накопившимся АМД	450	90	0,105
То же, после 5 мин облучения	445	102	0,134

Примечание. Фотодеструкция проводилась в течение 5 мин с помощью 450-Вт ксеноновой лампы через 5%-ный раствор сульфата меди. Образцы при облучении и последующем спектрофотометрировании находились в стандартных 1-см кварцевых кюветках. Концентрация АМД – 10 мкМ.

медленный фотоблэчинг. Не исключено, что после 5-й мин имеет место наложение процессов связывания и фотоблэчинга.

### Фотодеструкция опухолевых клеток

АМД заметно способствует фотодеструкции клеток HeLa (табл.3). Без антибиотика при облучении светом (450-Вт ксеноновая лампа с тепловым фильтром) в течение 5 мин повреждается и разрушается около 20% клеток, а при проникновении внутрь их АМД – около 60%. Повреждение и разрушение клеток без антибиотика вызвано фотосенсибилизацией внутриклеточных хромофоров (флавопротеинов, цитохромов). Клетки HeLa, прокрашенные антибиотиком, фотосенсибилизируются молекулами АМД, "налипшими" снаружи и проникшими внутрь. При этом большинство клеток полностью разрушается.

При фотодеструкции клеток HeLa связанный с ДНК антибиотик попадает вместе с ней в раствор, и оптическая плотность повышается (табл.4). Это свидетельствует о том, что светопоглощительная способность АМД внутри клеток существенно ниже, чем в растворе. Это позволяет предположить, что в случае 7ААМД (см. табл.1) первоначально низкая интенсивность его флуоресценции в клетках вызвана слабым светопоглощением, а не тушением.

Коротковолновый сдвиг максимума поглощения АМД после фотодеструкции клеток HeLa составлял 5 нм. Так как АМД довольно гидрофобен, по-видимому, его спектр, регистрируемый после фотодеструкции клеток, обусловлен в основном связанными с ДНК молекулами антибиотика, поскольку с белками антибиотик вообще не связывается.



Интересно, что полуширина спектра АМД в клетках в исходном состоянии и после облучения заметно выше, чем в чистом водном растворе (около 70 и 100 нм, соответственно). По-видимому, это вызвано гетерогенным взаимодействием АМД с плазматической мембраной клетки, с ядерной ДНК с другими внутриклеточными структурами.

Можно предложить несколько механизмов фотодеструкции клеток HeLa. Во-первых, она происходит за счет сильного внутриклеточного неравновесного теплового нагрева при поглощении квантов света накопившимися внутри клеток молекулами АМД. Например, квант с длиной волны 450 нм при поглощении молекулой АМД будет трансформироваться в колебательную тепловую энергию 63 ккал/моль. Во-вторых, процесс протекает вследствие фотохимических реакций фотовозбужденных (триплетных) молекул антибиотика с клеточными мембранами, органеллами и ДНК. В-третьих, нельзя исключить перекисное окисление мембранных липидов, индуцируемое синглетным кислородом, генерируемым триплетным АМД.

### Кофеин и актиномициновые фармакосомы

Кластеры кофеина при миллимолярных концентрациях в воде формируются спонтанно, причем каждый из них состоит из 8-12 молекул [4]. При добавлении АМД или 7ААМД к таким кластерам они сорбируются на поверхности кластеров. Эквивалентный наноконкомплекс АМД с кофеином, присутствующим в микро-, а не в миллимолярной концентрации, довольно легко проникает в делящиеся клетки (сам АМД проникает хуже), поэтому блокирующее действие таких наноконкомплекс на опухолевые клетки достаточно хорошо выражено. Перераспределение антибиотика к ДНК в ходе диссоциации наноконкомплекс АМД/кофеин обусловлено большей прочностью комплексов АМД/ДНК и наличием в ДНК большого количества мест связывания [4, 6].

Известно, что кофеин уменьшает действие многих гетероциклических канцерогенов, в частности, бромистого этидия, вероятно, за счет образования между ними прочного интеркаляционного наноконкомплекс [1]. Хотя кофеин может снижать действие гетероциклических противоопухолевых препаратов, сорбируя их и уменьшая тем самым их эффективную концентрацию в крови, однако он препятствует "размазыванию" лекарства по стенкам кровеносных сосудов и капилляров, а также существенно пролонгирует время его действия. Следует еще раз подчеркнуть, что во многих случаях важна не столько

концентрация лекарственного вещества в крови, сколько его способность проникать к молекулярно-биологическим "мишеням" в раковых клетках.

При введении наноконкомплекс из АМД, кофеина и олигонуклеотида НР1 мышам с саркомой продолжительность их жизни увеличивалась вдвое [1, 2]. В то же время введение антибиотика отдельно продлевало их жизнь на 1-2 дня, а введение одного олигонуклеотида или кофеина вообще не влияло на продолжительность жизни подопытных животных.

Для доставки гетероциклических антибиотиков, в частности, актиномицинов к ДНК раковых клеток был предложен способ [7] с использованием фармакосом - частиц диаметром 1-10 нм, состоящих из антибиотика, одноцепочечного шпильчатого олигонуклеотида и кластера кофеина. Фармакосомы обеспечивают защиту антибиотика от сорбции на стенках кровеносных капилляров и, что очень важно, увеличивают его проникновение в опухолевые клетки. Этот подход может быть использован при лечении сарком, лимфом, меланом. Одиночные не слипающиеся фармакосомы способны легко проходить по кровеносным капиллярам, доставлять антибиотик к ДНК делящихся опухолевых клеток и успешно проникать через их плазматическую и ядерную мембраны. В заключение отметим, что использование данного способа позволит во много раз снизить лечебную концентрацию антибиотика.

*Работа поддержана грантом 2012 года "Фундаментальные науки - медицине".*

*Автор выражает искреннюю признательность студентам А.Кучину, М.Бычкову, Н.Ещенко и Я.Ким за активное участие в проведении предварительных экспериментов.*

### Литература

1. Векшин Н.Л. Биофизика ДНК-актиномициновых наноконкомплекс. - Пушино: Фотон-век, 2009.
2. Векшин Н.Л., Савинцев И.В. - Биофизика, 2009, вып.54 (6), с.1037-1041.
3. Векшин Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. - Пушино, Фотон-век, 2008.
4. Битехтина М.А., Векшин Н.Л. - Биоорганическая химия, 2008, вып.34 (2), с.256-261.
5. Ковалев А.Э., Яковенко А.А., Векшин Н.Л. - Биофизика, 2004, вып.49 (6), с.1030-1037.
6. Vekshin N., Kovalev A. - J. Biochem., 2006, №140, p.185-191.
7. Патент РФ № 2372073, 2009. Доставка гетероциклических антибиотиков к раковым клеткам с помощью нано-нуклеотидных фармакосом/ Векшин Н.Л.