

НАНОБИОМЕДИЦИНА И НАНОФАРМАЦЕВТИКА

УДК 615.357:616.133-007.272

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОНАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ P-ГЛИКОПРОТЕИНА *IN VITRO*

© 2024 г. М. А. Копаница^{1,*}, И. В. Черных¹, А. В. Шулькин¹, П. Ю. Мыльников¹, А. Ю. Ершов²,
И. В. Лагода³, А. А. Мартыненко², Е. Н. Якушева¹

¹Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань, Россия

²Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

³Научно-исследовательский испытательный центр (медико-биологической защиты)

Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Минобороны РФ,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: kopanitsa412@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.10.2023 г.

После доработки 15.02.2024 г.

Принята к публикации 26.02.2024 г.

Изучено влияние наночастиц золота с поверхностью, модифицированной остатками фукозы (Au-Fuc), лактозы (Au-Lac) и галактозы (Au-Gal), на функциональную активность и экспрессию белка-транспортера P-гликопротеина (Pgp). Исследование выполнено на клетках Caco-2 и HEK-293, которые инкубировали 2 и 8 ч с растворами Au-Fuc, Au-Lac и Au-Gal в питательной среде (450 и 300, 700 и 490, 400 и 250 мкг/мл соответственно). Количество Pgp на мембранах клеток Caco-2 оценивали методом вестерн-блоттинга, активность Pgp — по накоплению в клетках фексофенадина — Fex (150 мкМ) методом ВЭЖХ с масс-детектированием. Au-Fuc, Au-Gal не изменяли количество Pgp. Au-Lac увеличивали уровень транспортера в 1.9 и 1.8 раза соответственно при инкубации в течение 2 и 8 ч. Au-Fuc, Au-Lac и Au-Gal повышают содержание Fex в клетках через 8 ч инкубации в 2.6, 3.5 и 5.3 раза, что свидетельствует о снижении активности Pgp. При инкубации частиц с клетками HEK-293 роста уровня Fex не выявлено, что говорит об отсутствии неспецифического увеличения проницаемости мембран. Протестированные наночастицы золота снижают функциональную активность Pgp *in vitro*.

DOI: 10.56304/S1992722323600988

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания — вторая по частоте причина смертности населения, которая в 2018 г. привела к гибели 9.6 млн человек [1]: до 70% — в странах с низким и средним уровнем дохода, что связано с запоздалой постановкой диагноза и поздней стадией заболевания при первом выявлении [2]. В этом случае хирургическая резекция уже не может служить обнадеживающей стратегией, поэтому на первый план выходит химиотерапия. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) является серьезным препятствием противоопухолевой терапии. В данном феномене ведущая роль принадлежит активному эффлюксу химиопрепаратов мембранным белком-транспортером P-гликопротеином (Pgp, ABCB1-белок), количество и активность которого повышаются при опухолевой трансформации клеток [3].

Pgp представляет собой АТФ-зависимый мембранный транспортер, принадлежащий к супер-

семейству ABC-транспортеров (Adenosine-Binding-Cassete), функционирующий как насос, удаляющий из клеток во внеклеточное пространство липофильные вещества эндогенной и экзогенной природы. Спектр его субстратов включает в себя ~50% современных лекарственных средств различных фармакологических групп [4]. В связи с вариабельной активностью, которая может изменяться под действием различных факторов, в том числе в результате приема лекарственных средств [5], актуальной является оценка эффлюксной активности Pgp для прогнозирования возможных межлекарственных взаимодействий. Кроме того, подобный анализ позволит осуществлять поиск веществ с ингибирующим потенциалом по отношению к транспортеру с перспективой их дальнейшего применения при патологиях, в патогенезе которых лежит его гиперактивность (МЛУ опухолей, резистентная к фармакотерапии эпилепсия и др. [6]).

С развитием нанотехнологий появляются надежды на перспективность использования нано-

материалов во всех областях медицины, в том числе в химиотерапии. Значительные преимущества были показаны для таргетной доставки лекарственных средств с помощью наноагентов для повышения эффективности диагностики и терапии опухолей [7]. Например, серебряные наночастицы (8 нм) с поверхностью, модифицированной белком, повышающим мембранную проницаемость (cell-penetrating peptide), обладают потенциальной противоопухолевой активностью и не распознаются эффлюксным мембранным транспортером Pgp [8]. Выявлена способность серебряных наночастиц ингибировать данный белок-транспортер, причем частицы размером 75.3 ± 18.1 нм показали более высокую эффективность, чем более мелкие (5.1 ± 1.8 нм) [9]. Аналогичные результаты получены для золотых наночастиц: частицы диаметром 22.1 нм (несущие на поверхности противоопухолевое вещество 2-(9-антраценилметил)-гидразинкарботиоамид) более эффективно преодолевали МЛУ *in vitro*, чем частицы диаметром 3.8 нм, что доказано повышением цитотоксичности по отношению к доксорубицин-резистентной клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7/ADR [10]. Для графеновых квантовых точек показана способность взаимодействовать с обогащенными углеродом регионами промоторов генов, кодирующих Pgp, MRP1 и BCRP, и ингибировать их экспрессию [11].

В ряде работ показана принадлежность наночастиц золота, диоксида титана к числу субстратов ABC-транспортеров [12], что может также свидетельствовать об их ингибирующем потенциале по отношению к данным белкам [13].

В исследовании [14] с помощью метилтетразолиевого теста (МТТ) была показана цитотоксичность золотых гликонаночастиц, поверхность которых модифицирована остатками фукозы, лактозы и галактозы, диаметром 18–21 нм по отношению к культуре клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2, сопоставимая с препаратом сравнения фторурацилом и реализуемая, вероятно, путем интенсификации липопероксидации и влияния на транскрипционный фактор p53. При этом цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам превосходила таковую для клеток, дифференцированных в эпителиоциты тонкого кишечника [15]. Были рассчитаны значения концентраций полумаксимального ингибирования (IC_{50}), а также найдены максимальные концентрации, которые не вызывали достоверного снижения выживаемости клеток. Именно эти концентрации были выбраны для оценки влияния наночастиц на функционирование Pgp, так как сохранение жизнеспособности клеток подразумевает возможность нормальной работы транспортера. Предполагалось, что ингибирование Pgp может служить дополнитель-

ным механизмом цитотоксичности золотых гликонаночастиц. Так, в [16] показано, что белок-транспортер способен подавлять апоптоз за счет ингибирования ключевых ферментов запрограммированной клеточной смерти.

С другой стороны, выявление модулирующего потенциала гликонаночастиц золота на Pgp позволит прогнозировать межлекарственные фармакокинетические взаимодействия на уровне данного белка-транспортера с участием веществ, принадлежащих к числу его субстратов. Так, индукция активности Pgp, локализованного в слизистой оболочке тонкого кишечника, в почках и печени может привести к неэффективности фармакотерапии веществами-субстратами в связи с их недостаточной энтеральной абсорбцией. И наоборот, сниженная активность транспортера может послужить причиной относительной передозировки веществом-субстратом [17].

Цель проведенного исследования — оценка влияния гликонаночастиц золота на функциональную активность и экспрессию белка-транспортера Pgp *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная культура. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) и линии эмбриональных клеток почки человека (НЕК-293) (Центр коллективного пользования “Коллекция культур клеток позвоночных” Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5%-ном содержании CO_2 в инкубаторе WS-189C (“WorldScience”, Корея) на питательной DMEM-среде с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (“Sigma-Aldrich”, Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ) (“Sigma-Aldrich”, Германия), 100 Ед/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (“Sigma-Aldrich”, Германия) соответственно. При инкубировании клеток линий Caco-2 и НЕК-293 использовали 15 и 10% бычьей сыворотки (“Sigma-Aldrich”, Германия) соответственно. После достижения 70–90% конfluenceности клетки снимали с культуральных флаконов путем добавления раствора трипсин-ЭДТА (трипсин-этилендиаминтетраацетат: 0.25% трипсина и 0.2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”, Германия) и высевали в 24-луночный планшет (“Corning”, США) из расчета 10^6 клеток на лунку (для анализа влияния веществ на функциональную активность транспортера) или в 6-луночный планшет (“Corning”, США) из расчета 10^7 клеток на лунку (только клетки Caco-2 для анализа влияния веществ на экспрессию Pgp). Клетки культивировали в течение 48 ч после достижения монослоя. Смену питательной среды проводили ежедневно.

Объект исследования. В работе использовали следующие маточные водные коллоидные растворы модифицированных наночастиц золота диаметром 18–21 нм [14], синтезированные в лаборатории полимерных наноматериалов и композиций для оптических сред Института высокомолекулярных соединений РАН (г. Санкт-Петербург):

- золото-меркаптогексаноилгидразид-L-фукоза (**Au-MNH-Fuc**) (1 мг/мл);
- золото-меркаптопропаноилгидразид-D-лактоза (**Au-MPH-Lac**) (2 мг/мл);
- золото-меркаптопропаноилгидразид-D-галактоза (**Au-MPH-Gal**) (1 мг/мл).

В исследовании [15] данные наночастицы проявили цитотоксичность по отношению к клеточной культуре Сасо-2 при 2- и 8-часовой инкубации.

Оценку относительного количества *Pgp* на мембранах клеток Сасо-2 проводили методом вестерн-блоттинга. Для этого клетки инкубировали в течение 2 и 8 ч на питательной среде с добавлением исследуемых гликонаночастиц золота в концентрациях 450 и 300, 700 и 490, 400 и 250 мкг/мл для Au-MNH-Fuc, Au-MPH-Lac и Au-MPH-Gal соответственно. Указанные значения соответствовали максимальным концентрациям, при которых наночастицы не проявляли цитотоксичности по отношению к клеткам Сасо-2 (интенсивность клеточного метаболизма достоверно не отличалась от 100% по данным МТТ-теста). Затем клетки снимали с планшета раствором трипсин-ЭДТА (Sigma-Aldrich, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера с pH = 7.2 (Bio-Rad, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил) флуорида гидрохлорид (AEBSF) – 2 мМ, апротинин – 0.3 мкМ, бестатин – 130 мкМ, ЭДТА – 1 мМ, транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4-гуанидино)бутан (E-64) – 14 мкМ, лейпептин – 1 мкМ, Sigma-Aldrich, Германия) в течение 30 мин при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 13000 g в течение 10 мин (Avanti JXN-3; Beckman Coulter, США).

Количество белка в пробах определяли методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, США) [18]. Надосадочный слой после центрифугирования (30 мкг) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit (Bio-Rad). Перед загрузкой в лунку электрофоретической системы образцы обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad. Смешивали в соотношении 1 : 3 с буфером Laemmli (Bio-Rad), содержащим 2.5% 2-меркаптоэтанола

(“Helicon”, Россия), инкубировали 5 мин при температуре 70°C, электрофорез проводили в течение 90 мин при 100 В.

Для определения относительного количества *Pgp* использовали первичные моноклональные антитела мыши P-Glycoprotein Antibody MA5-13854 (“Invitrogen”, США) в разведении 1 : 200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных антител кролика (Rabbit anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США) в разведении 1 : 4000.

Молекулярная масса *Pgp* была подтверждена путем сравнения с предварительно установленными маркерами молекулярного размера (Precision Plus Protein Standards Dual Color, “Bio-Rad”).

Белки визуализировали с помощью хемилюминесценции, используя Chemi Doc XRS+ (“Bio-Rad”, США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения Image Lab (“Bio-Rad”, США). Количество *Pgp* оценивали относительно содержания GAPDH (белок домашнего хозяйства, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), первичные антитела к GAPDH – Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R, США), DyLight 68, Invitrogen, разведение 1 : 1000, вторичные антитела кролика к первичным антителам GAPDH – Rabbitanti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, разведение 1 : 4000).

Каждый анализ повторяли трижды. В качестве контроля использовали клетки после инкубации с питательной средой, разведенной водой для инъекций, аналогично рабочим растворам наночастиц золота.

Функциональную активность *Pgp* на клеточных мембранах исследовали путем оценки внутриклеточного накопления маркерного субстрата транспортера – фексофенадина (150 мкМ, 2 ч совместно с растворами наночастиц, хинидина или фторурацила после преинкубации) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС). Фексофенадин – блокатор H_1 -гистаминовых рецепторов III поколения, проникновение которого внутри клеток контролируется *Pgp* [19]. В этой связи его содержание в клетках может характеризовать функциональную активность транспортера.

Клеточную культуру преинкубировали в 24-луночных планшетах в течение 2 и 8 ч с растворами гликонаночастиц на питательной среде в концентрациях, соответствующих максимальным значениям, при которых интенсивность клеточного метаболизма достоверно не отличалась от 100%. После этого клетки снимали со дна лунок, промывали трижды 1 мл фосфатного буферного раствора (pH 7.2) с последующим центрифугиро-

Таблица 1. Соотношение компонентов подвижной фазы по объему в зависимости от времени хроматографического анализа

Время, мин	Раствор муравьиной кислоты (0.1%)	Ацетонитрил
0	75%	25%
0.2	30%	70%
6	1%	99%
8	75%	25%

ванием при 1500 g в течение 5 мин и удалением надосадочного слоя. Далее осадок клеток разводили в 350 мкл раствора фосфатного буфера и лизировали в трехкратном цикле заморозка–разморозка.

Непосредственно перед хроматографическим анализом пробы размораживали при комнатной температуре, к каждой пробе добавляли 300 мкл ацетонитрила (“PanReac AppliChem”, Испания), содержащего внутренний стандарт – амантадин (амантадин гидрохлорид, United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, США) в концентрации 10 нг/мл, перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия) и центрифугировали при 25000 g в течение 10 мин при температуре 4°C. В дальнейшем 20 мкл пробы вводили в автосемплер хроматографа для количественного анализа фексофенадина.

В качестве вещества сравнения с известной способностью снижать функциональную активность Pgp был использован хинидин (Acros Organics, Бельгия) в концентрации 200 мкМ [20, 21] и сроками преинкубации, соответствующими таковым для гликонаночастиц золота (2 и 8 ч). Также в качестве препарата, не влияющего, согласно [22], на функциональную активность и экспрессию Pgp, использовали фторурацил (Nantong Jinhua Pharmaceutical Co., Ltd.) – препарат для адъювантной терапии колоректальных опухолей [23].

Чтобы подтвердить, что накопление фексофенадина внутри клеток Сасо-2 происходило именно за счет снижения эффлюксной активности Pgp под действием гликонаночастиц золота, а не за счет повышения проницаемости клеточных мембран, аналогичный эксперимент проводили с применением клеточной культуры НЕК-293. Pgp не экспрессируется на мембранах данных клеток [24], поэтому отсутствие возрастания внутриклеточного содержания фексофенадина при инкубации с тестируемыми веществами будет свидетельствовать о реализации эффекта за счет влияния на транспортер.

Внутриклеточное содержание фексофенадина (нг/мл) пересчитывали на количество белка в пробе (мг/мл), которое оценивали методом Бред-

форда. На каждый анализ было выполнено по пять повторений. В качестве контроля использовали клетки после инкубации с разведенной водой для инъекций питательной средой по аналогии с рабочими растворами наночастиц золота.

Количественный анализ фексофенадина в лизате клеток проводили методом ВЭЖХ/МС на хроматографе “Ultimate 3000” с тройным квадрупольным масс-детектором TSQ Fortis (“ThermoFisher”, США), колонкой UCT Selectra C18 4.6 мм × 100 мм × 5 мкм в градиентном режиме элюирования (табл. 1). Скорость подвижной фазы – 0.3 мл/мин, объем пробы – 20 мкл, режим ионизации – положительный.

Количественный анализ проводили методом внутреннего стандарта (амантадин). Рабочий диапазон концентраций фексофенадина в лизатах клеток Сасо-2 составлял 5.0–500.0 нг/мл (коэффициент корреляции превышал 0.99), точность и прецизионность не превышали 15%. Нижний предел обнаружения вещества в лизате клеток Сасо-2 составил 0.5 нг/мл [25].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0. Распределение данных анализировали, используя критерий Шапиро–Уилка. Различия количества Pgp, а также концентраций фексофенадина в клеточном лизате оценивали с помощью критерия Даннета, так как распределение данных не отличалось от нормального. Приемлемым уровнем значимости считали значение p , не превышающее 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом вестерн-блоттинга показано, что инкубация клеток Сасо-2 с гликонаночастицами золота (Au-MNH-Fuc, Au-MPH-Gal), а также фторурацилом (веществом, не изменяющим экспрессию транспортера по данным [22]) не приводила к достоверному изменению относительного количества Pgp в лизате ($p > 0.05$). При этом Au-MPH-Lac увеличивали уровень транспортера в 1.9 ($p = 0.013$) и 1.8 ($p = 0.021$) раза при инкубации в течение 2 и 8 ч соответственно по сравнению с контролем (рис. 1, табл. 2).

Оценка накопления фексофенадина внутри клеток Сасо-2 при их инкубации с наночастицами золота показала, что частицы с фукозой, лактозой и галактозой увеличивали внутриклеточное содержание вещества через 8 ч инкубации в 2.6 (уровень тенденции $p = 0.097$), 3.5 ($p = 0.0025$) и 5.3 ($p < 0.0001$) раза соответственно по сравнению с контролем. Наночастицы с лактозой увеличивали данный показатель также через 2 ч инкубации в 4.1 раза ($p = 0.0001$). Полученные результаты свидетельствуют о снижении эффлюксной активности Pgp.

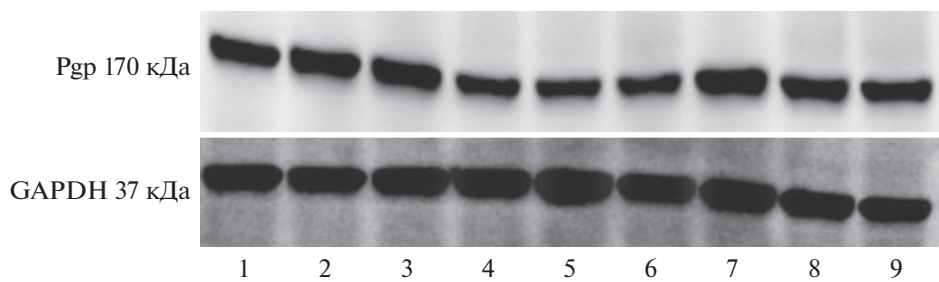


Рис. 1. Результаты анализа (вестерн-блоттинг) относительного количества Pgp в лизате клеток Caco-2: 1 – контроль, 2 – фторурацил (2 ч), 3 – Au-MPH-Lac (2 ч), 4 – Au-MNH-Fuc (8 ч), 5 – Au-MPH-Gal (8 ч), 6 – Au-MPH-Gal (2 ч), 7 – Au-MPH-Lac (8 ч), 8 – фторурацил (8 ч), 9 – Au-MNH-Fuc (2 ч).

Восьмичасовая инкубация клеток с хинидином (веществом, оказывающим ингибирующее действие на функционирование Pgp [26]) приводила к увеличению количества фексофенадина внутри клеток Caco-2 в 3 раза ($p = 0.024$), что подтверждает адекватность примененной методики. Фторурацил (препарат, не изменяющий активность Pgp по данным [22]) в проведенном исследовании также не влиял на количество маркерного субстрата транспортера в клетках ($p > 0.05$) (табл. 3).

При анализе проникновения фексофенадина в клетки HEK-293 на фоне инкубации с наночастицами с фукозой, лактозой и галактозой выявлено снижение его внутриклеточного количества при 2- и 8-часовой инкубации в 3.9 ($p < 0.0001$) и 3.4 ($p < 0.0001$), в 8.1 ($p < 0.0001$) и 9.1 ($p < 0.0001$), в 2.8 ($p = 0.00025$) и 2.1 ($p = 0.0023$) раза соответственно (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сегодня утверждены отечественные [27] и зарубежные рекомендации [28], предписывающие тестирование всех вновь разрабатываемых лекарственных средств на принадлежность к субстратам и ингибиторам Pgp. При этом на первом этапе анализ проводится *in vitro* (путем оценки транспорта маркерных субстратов транспортера, таких как фексофенадин, дигоксин, домперидон и другие средства, на гиперэкспрессирующих его клеточных культурах), а в случае положительных результатов – *in vivo* (анализируется фармакокине-

тика маркерных субстратов транспортера на животных).

Исследование было посвящено оценке влияния золотых гликонаночастиц с поверхностью, модифицированной через тиольные группы остатками моно- и дисахаридов, на функциональную активность и количество эффлюксного транспортера Pgp. Концентрации тестируемых веществ были выбраны на основе данных предварительного исследования, в котором с помощью МТТ найдены те их значения, при которых 2- и 8-часовая инкубация с клетками не вызывает достоверного снижения интенсивности клеточного метаболизма [15]. В многочисленных исследованиях, преимущественно *in vitro*, выявлена способность наночастиц металлов ингибировать функционирование данного белка, что повышает цитотоксичность противоопухолевых лекарственных средств, являющихся его субстратами, и дает надежду на преодоление феномена МЛУ [9, 10, 29].

В ходе работы снижения экспрессии Pgp на фоне инкубирования клеток с протестированными наночастицами не продемонстрировано. Напротив, Au-MPH-Lac увеличивали уровень транспортера на клеточных мембранах. Остальные гликонаночастицы не изменяли количества Pgp. Данный эффект может быть реализован путем индукции транскрипционного фактора p53, продемонстрированной в [30]. Данный белок (ряд его мутантных форм) способен взаимодействовать с промотором гена MDR1, кодирующего Pgp, и индуцировать его экспрессию [29]. Индукция Pgp (увеличение количества иРНК и эф-

Таблица 2. Результаты анализа (вестерн-блоттинга) относительного количества Pgp в лизате клеток Caco-2 на фоне их 2- и 8-часовой инкубации с гликонаночастицами золота и фторурацилом

Время, ч	Относительное количество Pgp в лизате клеток Caco-2, нг/мг GAPDH				
	Контроль	Au-MNH-Fuc	Au-MPH-Lac	Au-MPH-Gal	Фторурацил
2	1.0	1.8 ± 1.05	1.9 ± 0.4*	1.7 ± 0.8	1.0 ± 0.2
8		1.4 ± 0.5	1.8 ± 0.3*	0.9 ± 0.5	1.3 ± 0.3

* Достоверные различия по сравнению с контрольным значением ($p < 0.05$).

Таблица 3. Количество фексофенадина в лизате клеток Сасо-2 на фоне их 2- и 8-часовой инкубации с гликонаночастицами золота, хинидином (эталонный ингибитор Pgp) и фторурацилом

Время, ч	Содержание фексофенадина в лизате клеток Сасо-2, нг/мг белка					
	Контроль	Хинидин	Au-MNH-Fuc	Au-MPH-Lac	Au-MPH-Gal	Фторурацил
2	132.7 ± 36.5	141.8 ± 16.4	270.4 ± 106.6	543.7 ± 106.4*	343.6 ± 223.2	198.8 ± 65.6
8		393.4 ± 188.3*	346.4 ± 108.7**	459.9 ± 188.2*	706.8 ± 245.6*	311.4 ± 90.6

* Достоверные различия по сравнению с контрольным значением ($p < 0.05$). ** Различия по сравнению с контрольными значениями на уровне тенденции ($0.05 < p < 0.1$).

Таблица 4. Количество фексофенадина в лизате клеток НЕК-293 на фоне их 2- и 8-часовой инкубации с гликонаночастицами золота

Время, ч	Содержание фексофенадина в лизате клеток НЕК-293, нг/мг белка			
	Контроль	Au-MNH-Fuc	Au-MPH-Lac	Au-MPH-Gal
2	453.6 ± 152.3	116.1 ± 16.2*	55.7 ± 5.6*	163.6 ± 28.5*
8		132.9 ± 30.2*	50.0 ± 9.5*	212.5 ± 24.8*

* Достоверные различия по сравнению с контрольным значением ($p < 0.05$).

флюксной активности транспортера) под действием немодифицированных золотых наночастиц (3, 15 и 80 нм в диаметре) описана в литературе. В [12] показано, что она также реализуется посредством влияния на транскрипционные факторы (Nrf2 и PXR).

В случае Au-MPH-Lac индукция экспрессии транспортера может быть объяснена адаптивным механизмом на фоне интенсификации перекисного окисления липидов (в предварительном исследовании было выявлено резкое снижение количества общих сульфгидрильных групп в клеточном лизате при инкубации с тестируемыми наночастицами [30]), так как транспортер способен выбрасывать из клеток окисленные производные глутатиона (глутатион-дисульфид, S-нитрозоглутатион и др.) подобно MRP [30]. Возможно, увеличение количества Pgp также является неспецифическим компенсаторным механизмом в ответ на действие токсикантов [12].

С другой стороны, гликонаночастицы золота ингибировали эффлюксную активность белка-транспортера через 8 ч инкубации. Двухчасовой инкубации оказалось недостаточно для подобного действия, что, вероятно, связано с необходимостью проникновения частиц внутрь клеток путем эндоцитоза — механизма, требующего определенного времени [31]. Отсутствие корреляции между количеством и активностью Pgp (продемонстрированное здесь для Au-MPH-Lac) было выявлено в ряде научных работ, что может быть связано с подверженностью белка-транспортера большому числу регуляторных влияний уже после его синтеза [32].

Отметим, что при инкубации гликонаночастиц золота с клетками НЕК-293 не выявлено

увеличения внутриклеточного накопления фексофенадина, что свидетельствует об отсутствии неспецифического увеличения проницаемости клеточных мембран. Напротив, наблюдалось снижение содержания фексофенадина внутри клеток. Это может быть связано с тем, что протестированные наночастицы способны неспецифически адсорбироваться на поверхности клеточных мембран, снижая адсорбцию маркерного субстрата Pgp и его внутриклеточный транспорт путем простой диффузии или фильтрации [33]. При этом для клеток Сасо-2 характерен более интенсивно протекающий эндоцитоз [34]. Таким образом, адсорбированные гликонаночастицы подвергаются абсорбции, и подобного препятствия внутриклеточному накоплению фексофенадина не наблюдается.

Препарат сравнения фторурацил не изменял функциональную активность и количество Pgp при инкубации с клетками Сасо-2. Опубликованные сведения по этому вопросу противоречивы [35–37]. Однако согласно [38] фторурацил представляет собой субстрат транспортера, что в данном случае является недостатком вещества в связи с высокой вероятностью резистентности к нему опухолевых клеток из-за феномена МЛУ [22].

Наиболее вероятный механизм прямого ингибирования Pgp — непосредственный контакт вещества-ингибитора с местами связывания субстратов на трансмембранном домене транспортера и их вытеснение, что возможно при сходстве химической структуры ингибитора и субстратов [13], а также при соответствии размеров ингибитора размерам субстратсвязывающего сайта Pgp (с диаметром в экстрацеллюлярной части ~5 нм, сужающимся по направлению к внутриклеточно-

му пространству) [39]. Таким образом, для наночастиц ключевым параметром, характеризующим их ингибирующий потенциал, является диаметр, и протестированные частицы попадают в ингибирующий диапазон. Так, на культуре клеток MCF-7/ADR показано, что золотые наночастицы размером 4.1–5.4 нм обладают максимальной способностью ингибировать Pgr. При этом частицы с меньшим диаметром более подвержены эффлюксу транспортером из клеток [3]. Согласно [40, 41] молекула Pgr богата SH-группами, что повышает вероятность образования ковалентных связей между наночастицами металла и аминокислотными остатками транспортера со снижением его функциональной активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что одним из механизмов цитотоксичности протестированных наночастиц может быть угнетение функционирования Pgr. Кроме того, выявленную динамику активности транспортера следует учитывать в случае использования гликонаночастиц золота в клинической практике: ингибирование Pgr способно приводить к нежелательным колебаниям фармакокинетики его субстратов (дабигатрана этексилата, дигоксина и ряда других), что повышает риск их относительной передозировки [17].

Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World Health Organization (WHO). Cancer. Simple. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. // *Int. J. Cancer*. 2019. V. 144. P. 1941. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Jiang Y., Wang Z., Duan W. et al. // *Nanoscale*. 2020. № 12. P. 16451. <https://doi.org/10.1039/d0nr03226c>
- Spudich A., Kilic E., Xing H. et al. // *Nat. Neurosci.* 2006. № 9. P. 487. <https://doi.org/10.1038/nn1676>
- Черных И.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. // *Наука молодых*. 2019. Т. 7. № 3. С. 349. <https://doi.org/10.23888/HMJ201973349-357>
- Hartz A.M., Notenboom S., Bauer B. // *Drug News Perspect.* 2009. V. 22. № 7. P. 393. <https://doi.org/10.1358/dnp.2009.22.7.1401354>
- Черных И.В., Копаница М.А., Шулькин А.В. и др. // *Химико-фармацевтический журнал*. 2021. Т. 55. № 9. С. 34. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2021-55-9-34-42>
- Liu J.H., Zhao Y.X., Guo Q.Q. et al. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 26. P. 6155. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.035>
- Gopisetty M.K., Kovacs D., Igaz N. et al. // *J. Nanobiotechnology*. 2019. V. 17 (1). № 9. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0448-4>
- Wang R.H., Bai J., Deng J. et al. // *Appl. Mater. Interfaces*. 2017. № 9. P. 5828. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15200>
- Luo C., Li Y., Guo L. et al. // *Adv. Healthc. Mater.* 2017. V. 6. № 21. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700328>
- Tongkuo Y., Jiaojiao S., Jingjing T. et al. // *Toxicology*. 2021. V. 455. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152762>
- Callaghan R., Higgins C.F. // *Br. J. Cancer*. 1995. № 71. P. 294. <https://doi.org/10.1038/bjc.1995.59>
- Ершов А.Ю., Мартыненко А.А., Лагода И.В. и др. // *Журнал общей химии*. 2020. Т. 91. № 2. С. 260. <https://doi.org/10.31857/S0044460X21020098>
- Черных И.В., Копаница М.А., Шулькин А.В. и др. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2023. Т. 31. № 2. С. 255. <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ112525>
- Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. V. 9. № 3. P. 231. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Якушева Е.Н., Черных И.В., Бирюкова А.С. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2011. Т. 19. № 3. С. 142.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 7. № 72. P. 248. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Черных И.В. и др. // *Биохимия*. 2021. Т. 86. № 2. С. 236. <https://doi.org/10.31857/S0320972521020081>
- Черных И.В., Шулькин А.В., Мильников П.Ю. и др. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2022. Т. 16. № 3. С. 47. <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.3.6>
- Якушева Е.Н., Шулькин А.В., Черных И.В. и др. // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2019. Т. 17. № 1. С. 71. <https://doi.org/10.7816/RCF17171-78>
- Jing J., Min H., Huai-Ling W. et al. // *World J. Gastroenterol.* 2002. V. 8. № 6. P. 1029. <https://doi.org/10.4061/2011/967419>
- Blondy S., David V., Verdier M. et al. // *Cancer Sci.* 2020. V. 111. № 9. P. 3142. <https://doi.org/10.1111/cas.14532>
- Pluchino K.M., Esposito D., Moen J.K. et al. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136396>
- Копаница М.А., Транова Ю.С., Черных И.В. и др. // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2023. № 2. С. 60. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-2-60-68>
- Wacher V.J., Wu C.Y., Benet L.Z. // *Mol. Carcinog.* 1995. V. 13. № 3. <https://doi.org/10.1002/mc.2940130302>
- Методические рекомендации по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекар-

- ственных средств: дизайн исследований, анализ данных: руководство по экспертизе лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2014. Т. 3. 343 с.
28. Clinical Drug Interaction Studies – Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) // Clinical Pharmacology. 2020. 24 p.
29. *Lopes-Rodrigues V., Seca H., Sousa D. et al.* // Int. J. Cancer. 2013. V. 135. № 2. P. 253.
<https://doi.org/10.1002/ijc.28500>
30. Черных И.В., Копаница М.А., Шулькин А.В. и др. // Химико-фармацевтический журнал. 2023. Т. 57. № 9. С. 16.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-9-16-20>
31. *Tongkuo Y., Steinmeier J., Dringen R. et al.* // Neurochem. Res. 2019. V. 44. P. 1167.
<https://doi.org/10.1007/s11064-019-02760-02761>
32. *Lesniak A., Salvati A., Santos-Martinez M.J. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. № 4. P. 1438.
<https://doi.org/10.1021/ja309812z>
33. *De Lange E.C.M., Berg D.J., Bellanti F. et al.* // Eur. J. Pharm. Sci. 2018. V. 124. № 1. P. 61.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.022>
34. Балабаньян В.Ю., Гельперина С.Э. // Фармакокинетика и фармакодинамика. 2012. № 2. С. 3.
35. *Van Breemen R.B., Li Y.* // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2005. V. 1. № 2. P. 175.
<https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>
36. *Wan J., Ling X. A., Wang J. et al.* // J. Cell. Mol. Med. 2020. V. 24. № 21. P. 12840.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15875>
37. *Yotsumoto K., Akiyoshi T., Wada N. et al.* // Biopharm. Drug Dispos. 2017. V. 38. № 9. P. 509.
<https://doi.org/10.1002/bdd.2102>
38. *Shibayama Y., Iwashita Y., Yoshikawa Y. et al.* // Biol. Pharm. Bull. 2011. V. 34. № 9. P. 1418.
<https://doi.org/10.1248/bpb.34.1418>
39. *Hesham El-M., El-Husseiny A., Kandil Y. et al.* // Life Sci. 2020. V. 262. P. 118518.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118518>
40. *Silva R., Vilas-Boas V., Carmo H. et al.* // Pharmacol. Ther. 2015. V. 149. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
41. Якушева Е.Н., Шулькин А.В., Попова Н.М. и др. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014. Т. 12. № 2. С. 3.
<https://doi.org/10.17816/RCF1223-11>
42. *Sim H.M., Bhatnagar J., Chufan E.E.* // Biochemistry. 2013. V. 52. № 41. P. 7327.
<https://doi.org/10.1021/bi4007786>