

Механизм пониженной гемолитической активности бесфосфорных алкильных катионных глицеролипидов: исследование на модельных мембранах

А.А. Маркова¹, С.А. Окороченков², Н.В. Плявник³, А.А. Штиль¹

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН», 115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация

² Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University, 77900, Hnevotinska 5, Olomouc, Czech Republic

³ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова», 119571, Проспект Вернадского, д. 86, Москва, Российская Федерация

РЕФЕРАТ

Бесфосфорные алкильные катионные глицеролипиды вызывают гибель опухолевых клеток при минимальном повреждении эритроцитов. В работе установлено, что низкая гемолитическая активность обусловлена слабой способностью указанных соединений нарушать целостность липосом, моделирующих состав клеточных мембран. Слабая гемолитическая активность определяет преимущество бесфосфорных алкильных катионных глицеролипидов перед фосфорсодержащим липидом эдельфозином, вызывающим гемолиз.

Ключевые слова: бесфосфорные алкильные катионные глицеролипиды, эдельфозин, модельные липосомы, карбоксифлуоресцеин, гемолиз.

Принято в печать: 5 мая 2014 г.

А.А. Маркова — аспирант лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза, +7 499 612 7834, alenmark25@gmail.com

С.А. Окороченков — канд. хим. наук, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Institute of Molecular and Translational Medicine of Palacky University in Olomouc, Czech Republic, Olomouc, + 420585632191, repina32@yandex.ua

Н.В. Плявник — канд. хим. наук, ассистент кафедры химии и технологии биологически активных соединений +7 495 936 8901, nplyavnik@mail.ru

А.А. Штиль — д-р мед. наук, заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза, +7 499 612 7834, shtilaa@yahoo.com

Для переписки: А.А. Маркова, 115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация, +7 499 612 7834, alenmark25@gmail.com

Для цитирования: Маркова А.А., Окороченков С.А., Плявник Н.В., Штиль А.А. Механизм пониженной гемолитической активности бесфосфорных алкильных катионных глицеролипидов: исследование на модельных мембранах. Клини. онкогематол. 2014; 7(3): 278–81.

Mechanism of Low Hemolytic Activity of Alkyl Type Nonphosphorous Cationic Glycerolipids: A Study on Model Membranes

А.А. Markova¹, С.А. Okorochenkova², Н.В. Plyavnik³, А.А. Shtil¹

¹ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Kashirskoye shosse, 24, Moscow, 115478, Russian Federation

² Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University, Hnevotinska 5, Olomouc, 77900, Czech Republic

³ M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Prospekt Vernadskogo, 86, Moscow, 119571, Russian Federation

ABSTRACT

Nonphosphorous alkyl cationic glycerolipids cause death of tumor cells with minimal damage of erythrocytes. In this article we demonstrate, that low hemolytic activity of these compounds can be explained by their weak ability to damage the integrity of liposomes whose composition models that of cell membranes. Poor hemolytic activity makes non-phosphorous alkyl cationic glycerolipids potentially advantageous over the hemolytic, phosphorus containing lipid drug edelfosine.

Keywords: non-phosphorous cationic alkyl glycerolipids, edelfosine, artificial liposomes, carboxyfluorescein, hemolysis.

Accepted: May 05, 2014

А.А. Markova — Graduate student, Laboratory of mechanisms of tumor cell death in the Scientific Research Institute of Carcinogenesis under N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, +7 499 612 7834, alenmark25@gmail.com

С.А. Okorochenkova — PhD, Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Institute of Molecular and Translational Medicine of Palacky University in Olomouc, Czech Republic, Olomouc, + 420585632191, repina32@yandex.ua

N.V. Plyavnik — PhD, Assistant, Chair of chemistry and biologically active compounds of M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, +7 495 936 8901, nplyavnik@mail.ru

A.A. Shtil' — DSci, Head of the laboratory of mechanisms of tumor cell death in the Scientific Research Institute of Carcinogenesis under N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, +7 499 612 7834, shtilaa@yahoo.com

Address correspondence to: A.A. Markova, Kashirskoye shosse, 24, Moscow, 115478, Russian Federation, +7 499 612 7834, alenmark25@gmail.com

For citation: Markova A.A., Okorochenkov S.A., Plyavnik N.V., Shtil' A.A. Mechanism of Low Hemolytic Activity of Alkyl Type Nonphosphorous Cationic Glycerolipids: A Study on Model Membranes. *Klin. onkogematol.* 2014; 7(3): 278–81 (In Russ.).

ВВЕДЕНИЕ

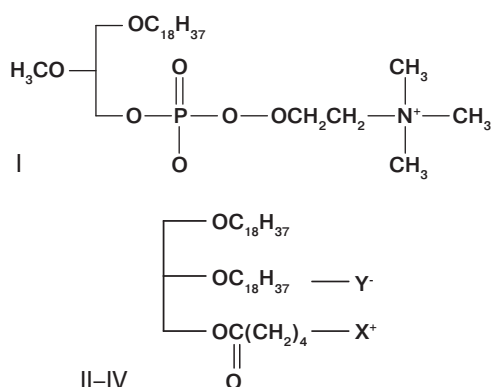
Алкильные глицеролипиды с короткоцепочечным гидрофобным заместителем, присоединенным ко 2-му атому глицеринового остова простой эфирной связью, — перспективный класс противоопухолевых соединений. Наиболее известен эдельфозин (1-октадецил-2-метил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин (**I**; рис. 1) — препарат с преимущественной токсичностью для опухолевых клеток различного тканевого происхождения. Показана способность **I** вызывать апоптоз клеток линий HL-60 (лимфоцитарный лейкоз), СЕМ (Т-клеточный лейкоз), HUT-78 (Т-клеточная лимфома) [1, 2].

Основным недостатком эдельфозина является его выраженная способность разрушать эритроциты [3]. С целью снижения гемолитического эффекта эдельфозин заключают в липосомы, содержащие диолеилфосфатидилэтаноламин, холестерин или диолеилфосфатидилхолин (ДОФХ) [4]. При использовании липосом, содержащих холестерин, гемолитическая способность эдельфозина ослабляется [5, 6]. Необходимость снижения гемолитического эффекта послужила причиной проведения струк-

турно-функциональных исследований, цель которых — создание аналогичных по противоопухолевому действию соединений, не повреждающих эритроциты.

Химическая структура и свойства бесфосфорных алкильных катионных глицеролипидов и эдельфозина сходны [7]. Мы выявили наиболее активные бесфосфорные алкильные катионные глицеролипиды, катионные домены которых представлены гетероциклическими производными: *rac*-*N*-{4-[(2-этокси-3-октадецилокси)проп-1-илоксикарбонил]бутил}пиридинийбромид (**II**), *rac*-*N*-{4-[(2-этокси-3-октадецилокси)проп-1-илоксикарбонил]бутил}-*N'*-метилимидазолийиодид (**III**), *rac*-*N*-{4-[(2-этокси-3-октадецилокси)проп-1-илоксикарбонил]бутил}-*N'*-этилимидазолийиодид (**IV**) (см. рис. 1). Обнаружен существенно менее выраженный гемолитический эффект соединений **II–IV** по сравнению с **I** [8]. Эти данные получены для цитотоксических концентраций **II–IV** (12–25 мкМ) и эквитоксических концентраций **I** (2–8 мкМ).

Механизм гемолиза — повреждение плазматической мембраны эритроцитов. В настоящем исследовании изучена возможность такого повреждения в физико-химической системе: соединения **I–IV** инкубировали с искусственными липосомами, в состав которых входят важнейшие липиды клеточных мембран: фосфатидилхолины и холестерин [9]. Внутрь таких частиц помещают краситель карбоксифлюоресцеин, не образующий химические связи с компонентами липосомы. Если целостность стенки липосомы нарушается экзогенным соединением, карбоксифлюоресцеин вытекает в окружающее пространство, что обнаруживается по нарастанию флуоресценции в растворе с суспендированными липосомами. Мы использовали этот тест для анализа способности **I–IV** нарушать целостность липосом — модель прямого повреждения клеточных мембран.



Соединение	X	Y
II		Br
III		I
IV		I

Рис. 1. Структурные формулы противоопухолевых липидов **I** — эдельфозин; **II–IV** — бесфосфорные алкильные катионные глицеролипиды; X — полярный домен; Y — противоион.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление липосом

Все реактивы приобретены в компании Sigma-Aldrich (США). Липосомы, нагруженные карбоксифлюоресцеином, получали по ранее опубликованному методу [9]. Смесь 5 мг ДОФХ и 5 мг холестерина растворяли в 200 мкл хлороформа, упаривали в токе азота и высушивали в течение 1 ч при давлении 0,1 мм рт. ст. К полученной липидной пленке добавляли 1 мл буферного раствора, содержащего 10 мМ Трис-основания, 10 мМ 2-N-морфолиноэтансульфоновой кислоты, 100 мМ калия хлорида и 70 мМ карбоксифлюоресцеина (буфер А), обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин и подвергали пяти циклам замораживания-оттаивания, встряхивая взвесь после каждого цикла. Полученную

смесь мультиламеллярных липосом пропускали через поликарбонатный фильтр с порами диаметром 0,1 мкм, используя мини-экструдер (Avanti Polar Lipids, США). Не включившийся в липосомы карбоксифлюоресцеин отделяли гель-хроматографией на колонке 0,5 × 18 см, заполненной сефадексом G-50 и уравновешенной буфером А, не содержащим карбоксифлюоресцеина.

Изучение вытекания карбоксифлюоресцеина под действием I–IV

Суспензию липосом, очищенных от несвязанного карбоксифлюоресцеина, помещали в кювету, добавляли буфер А до конечного объема 2 мл и вносили соединения I–IV. Изменение флюоресценции регистрировали через 20 мин инкубации на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Флюоресценцию карбоксифлюоресцеина возбуждали при длине волны 490 нм и регистрировали при 520 нм (ширина щелей 5 нм). Долю вытекшего красителя рассчитывали по формуле:

$$\alpha = (F_i - F_0) / (F_m - F_0) \times 100 \%,$$

где F_0 и F_i — интенсивность флюоресценции до и после добавления соединений, F_m — интенсивность флюоресценции после полного разрушения липосом детергентом Тритон X-100 (конечная концентрация 2,4 %). Эксперименты повторяли не менее 3 раз, статистическая погрешность значений не превышала 5 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 показана зависимость вытекания карбоксифлюоресцеина из липосом от количественного соотношения соединений I–IV и липосомального липида (т. е. от количества добавленных соединений I–IV, т. к. количество липосомального липида оставалось неизменным). Флюоресценция буфера после добавления Тритона X-100 к липосомам принята за 100 %.

Из представленных данных следует, что фосфорсодержащее соединение эдельфозин (I) вызывает существенно более выраженное вытекание карбоксифлюоресцеина из липосом, чем бесфосфорные липиды II–IV, в диапазоне соотношений исследуемое соединение/липосомальный липид от 0,008 до 0,2. Эти данные подтверждают полученные ранее результаты исследования гемолиза для цитотоксических концентраций I (2–8 мкМ) и II–IV (12–25 мкМ) [8]. При увеличении концентрации противоопухолевых липидов (возрастании соотношения исследуемое соединение/липосомальный липид до 1) мембранолитические свойства бесфосфорных катионных липидов II–IV различались: соединение II с пиридиниевым катионным доменом вызывало наибольшее вытекание красителя из липосом, сравнимое с эффектом I. Для III и IV, различающихся заместителем в имидазолиевой катионной головке, эффект вытекания красителя при увеличении концентраций существенно не повышался, т. е. эти соединения не повреждали липосомы даже в относительно высоких концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что низкая способность катионных бесфосфорных глицеролипидов

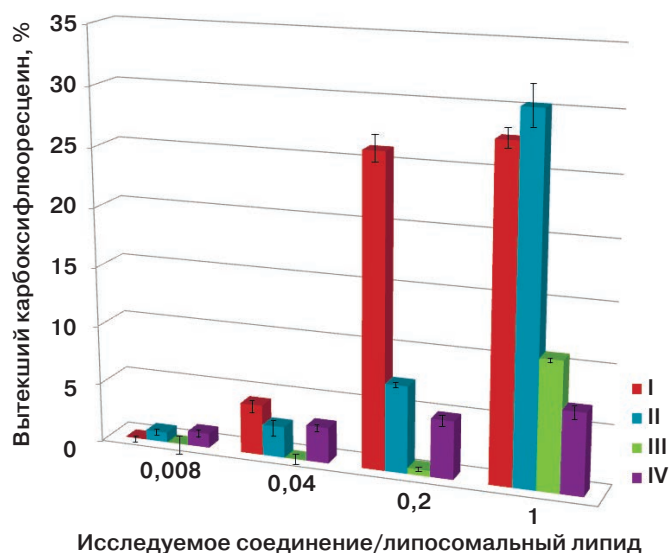


Рис. 2. Вытекание карбоксифлюоресцеина из липосом при действии соединений I–IV

вызывать гемолиз обусловлена слабым повреждением липидных мембран. Напротив, эдельфозин вызывает гемолиз и повреждает модельные липосомы. Наличие фосфатной группы в молекуле эдельфозина увеличивает размер его полярного домена по сравнению с бесфосфорными алкильными катионными глицеролипидами, что может способствовать более высокой способности повреждать липидные мембраны. Таким образом, результаты экспериментов на модели прямого повреждения мембран согласуются с исследованиями повреждения эритроцитов [8].

Низкая гемолитическая активность бесфосфорных аналогов эдельфозина при сопоставимой цитотоксичности позволяет считать перспективной дальнейшую разработку бесфосфорных алкильных катионных глицеролипидов как противоопухолевых соединений.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Duclos R., Hwa Hwoy C., Abdelmageed O. et al. Syntheses of racemic and nearly optically pure ether lipids and evaluation of in vitro antineoplastic activities. *J. Med. Chem.* 1994; 37: 4147–54.
2. Naseer A., Bok Hee B., Jongki H. et al. Additional bioactive lyso-PAF congeners from the sponge *Spirastrella abata*. *J. Nat. Prod.* 2001; 6: 533–5.
3. Ahmad I., Filep J., Franklin J. et al. Enhanced therapeutic effects of liposome-associated 1-O-octadecyl-2-O-methyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. *Cancer Res.* 1997; 57: 1915–21.
4. Busto J., del Canto-Janes E., Goni F. et al. Combination of the anti-tumor cell ether lipid edelfosine with sterols abolishes haemolytic side effects of the drug. *J. Chem. Biol.* 2008; 1(1–4): 89–94.
5. Mayhew E., Ahmad I., Bhatia S. et al. Stability of association of 1-O-octadecyl-2-O-methyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine with liposomes is composition dependent. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1329: 139–48.
6. Perkins W.R., Dause R.B., Li X. et al. Combination of antitumor ether lipid with lipids of complementary molecular shape reduces its hemolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997; 1327: 61–8.
7. Плявник Н.В., Крамарева Т.В., Серебрянникова Г.А. Синтез катионных алкильных глицеролипидов с гетероциклическими азотистыми основаниями в качестве полярного домена. *Биоорган. хим.* 2011; 37(4): 552–8.

[Plyavnik N.V., Kramareva T.V., Serebrennikova G.A. Synthesis of cationic alkyl glycerolipids with heterocyclic nitrous bases as a polar domain. *Bioorgan. khim.* 2011; 37(4): 552–8. (In Russ.)].

8. Маркова А.А., Плявник Н.В., Плетнева М.В., Серебренникова Г.А., Штиль А.А. Противоопухолевые бесфосфорные алкильные катионные глицеролипиды с гетероциклическими полярными доменами вызывают значительно меньший гемолиз, чем препарат-прототип эдельфозин. *Клин. онкогематол.* 2012; 5(2): 141–3.

[Markova A.A., Plyavnik N.V., Pletneva M.V., Serebrennikova G.A., Shtil' A.A. Anti-tumor non-phosphorous alkyl cationic glycerolipids with heterocyclic polar

domains cause significantly less hemolysis than the prototype drug edelfosine. *Klin. onkogematol.* 2012; 5(2): 141–3. (In Russ.)].

9. Стоилова Т.Б., Дуцева Е.А., Пашковская А.А. и др. Различные типы ионных каналов, индуцированные в липидных мембранах производными грамицидина А, несущими на С-конце катионную последовательность. *Биоорган. хим.* 2007; 33(5): 511–9.

[Stoilova T.B., Duceva E.A., Pashkovskaja A.A. et al. Different types of ion channels induced in lipid membranes by gramicidin A derivatives bearing a cationic sequence on their C-terminus. *Bioorgan. him.* 2007; 33(5): 511–9. (In Russ.)].

