

УДК 578.064

©Коллектив авторов

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ ЭМБРИОНОВ РЫБ ВИДА *Danio rerio* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДОКСОРУБИЦИНА, ВСТРОЕННОГО В ФОСФОЛИПИДНУЮ ТРАНСПОРТНУЮ НАНОСИСТЕМУ

**Н.Ф. Саменкова, Ю.С. Кисриева*, Н.А. Петушкова, Г.П. Кузнецова,
О.В. Ларина, О.П. Трифонова, И.И. Карузина, О.М. Ипатова, А.В. Лисица**

Научно-исследовательский институт имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: +7 (499) 255-39-60; факс: +7 (499) 245-08-57;
эл. почта: juliaks@bk.ru

Исследовали белковый профиль эмбрионов рыб вида *Danio rerio*, выращенных в среде с доксорубицином, включенным в фосфолипидную транспортную наносистему (доксолип), используя сочетание одномерного электрофореза с последующей времяпролетной масс-спектрометрией с лазерной десорбцией и ионизацией (MALDI-TOF-PMF). При выращивании эмбрионов *D. rerio* в среде с доксолипом отмечено существенное увеличение количества цитоскелетных белков, снижение количества ядерных белков, участвующих в синтезе ДНК и РНК, и исчезновение вителлогенина 2 по сравнению с контролем (среда с фосфолипидной транспортной наносистемой). Анализ протеомных профилей эмбрионов, подвергнутых обработке доксолипом, свидетельствует о снижении эмбриотоксичности доксорубицина при включении его в фосфолипидную наносистему.

Ключевые слова: доксолип, *Danio rerio*, одномерный электрофорез, масс-спектрометрия, фосфолипидная транспортная наносистема.

DOI: 10.18097/PBMC20156103350

ВВЕДЕНИЕ

Протеомный подход, используемый для анализа белкового состава клеток, органов или целых организмов, даёт возможность регистрации токсических эффектов на молекулярном уровне. Рыбы вида *Danio rerio* (зебрафиш) в последние годы стали использовать как эффективный модельный организм на ранних этапах разработки лекарственных препаратов для обнаружения их эффективности и токсичности [1]. Основными преимуществами эмбрионов *D. rerio* является то, что они легко проницаемы для небольших молекул, добавленных непосредственно в инкубационную среду, развиваются быстро и проходят стадии от яйца до личинки всего за 3 дня. Кроме того, высокая степень соответствия между геномом человека и рыб вида *D. rerio* делает возможным исследование токсичности лекарственных препаратов на этом модельном организме [2, 3].

Одним из способов совершенствования существующих лекарственных форм, повышения биодоступности и эффективности является снабжение их транспортными наносистемами на основе соевых

фосфолипидов [4]. Такие наносистемы биodeградируемы и не вызывают аллергических реакций. Фосфолипидная транспортная наносистема используется для целенаправленной доставки лекарств. Например, она широко применяется в противоопухолевой терапии, для повышения терапевтического эффекта и снижения токсичности лекарственного препарата в сравнении с его свободной формой. Фосфолипидная мицелла, содержащая лекарства, имеет возможность трансмембранного транспорта внутрь клетки, поэтому легко проходит в клетку, высвобождая лекарство именно там, где оно необходимо. Фагоциты и прочие защитные клетки не “замечают” наночастицы лекарства размером 15-25 нм. Благодаря этому вещество может дольше находиться в кровеносной системе организма, покидая её в местах повышенной проницаемости сосудов, таких например, как очаги воспаления или опухоли. Таким образом, включение лекарства в состав фосфолипидных наночастиц защищает лекарство от преждевременной деградации и повышает адресность высвобождения препарата [4].

* - адресат для переписки

В лаборатории фосфолипидных нанолечств и транспортных систем ИБМХ была разработана фосфолипидная транспортная наносистема (ФТН), которая представляет собой ультрадисперсную эмульсию наночастиц диаметром 15-30 нм [5]. В то время как размер пор оболочки эмбриона *D. rerio* составляет ~100 нм. На основе этой транспортной системы получен доксолип: доксорубин снабженный ФТН в виде лиофильно высушенного порошка для инъекций [6]. Доксорубин – антрациклиновый антибиотик, ингибитор топоизомеразы II, один из самых востребованных цитостатиков, используемых в химиотерапии таких злокачественных опухолей как рак молочной железы, рак легкого. Тем не менее, его клиническое применение ограничивается дозозависимой токсичностью (кардиотоксичность), появлением множественной лекарственной устойчивости и низкой специфичностью против раковых клеток [6]. Нанотехнологии являются перспективной альтернативой для преодоления этих ограничений в терапии рака для уменьшения системных побочных эффектов и повышения терапевтической эффективности лекарственных препаратов. Действительно, многие терапевтические системы на основе наночастиц, разработанные в последние годы, обнаруживают низкую токсичность с замедленным высвобождением препарата [7].

Ранее для изучения механизмов индуцированной токсичности доксорубина на эмбрионы *D. rerio* нами был использован подход, основанный на комбинации одномерного электрофореза и MALDI-TOF MS (временнoлетная масс-спектрометрия с лазерной десорбцией и ионизацией) [8]. В настоящей работе этот подход использован для изучения белкового профиля эмбрионов *D. rerio*, выращенных в среде с доксолипом.

МЕТОДИКА

В работе использованы следующие реактивы: проназа (*Pronase Streptomyces griseus*, “Koch Light Laboratories”, Великобритания), трипсин свиной (“Promega”, США), 2,5-дигидроксibenзойная кислота (“Sigma”, США), трифторуксусная кислота (“Fluka”, Германия), ацетонитрил, меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (SDS), бромфеноловый голубой и глицерин (“Acros”, США); дитиотреитол, ЭДТА, Трис (“Sigma”, Германия); Bacto Agar (“FERAK”, Германия), а также реактивы отечественного производства квалификации “х.ч.”.

Фосфолипидные наночастицы размером 10-30 нм, включали фосфатидилхолин растительного происхождения (78-95%) и мальтозу [5].

Для получения эмбрионов использовали рыб в возрасте от 6 до 12 месяцев [9]. На стадии 16-32 бластомеров оплодотворенные эмбрионы переносили в пластиковые 24-луночные планшеты с вместимостью лунки 2 мл, где инкубировали в среде с доксолипом (0,08 мг/мл) и в среде с ФТН (0,32 мг/мл). Объектом исследования служили эмбрионы *D. rerio* на стадии развития 52 ч.

Дехорионизацию эмбрионов проназой с последующим удалением желточного мешочка проводили, как описано нами ранее [9]. Полученные осадки эмбрионов либо сразу использовали для разделения белков, либо хранили при -80°C. Непосредственно перед электрофоретическим разделением белков получали гомогенат из осадка путём ультразвуковой обработки (УЗ-гомогенат) [9], который затем центрифугировали в течение 40 с при 400 g. Осадок суспендировали в буфере, содержащем 0,5 М трис-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% глицерин, 5% 2-меркаптоэтанол, 0,5% бромфеноловый голубой, и инкубировали 4 мин при 95°C.

Электрофоретическое разделение проводили на 12% полиакриламидных гелях (7×11 см) по методу Laemmli [10] на приборе Mini-Protean III Cell (“Bio-Rad”, США). После разделения белков по массе проводили окрашивание гелей 0,1% кумасси бриллиантовым голубым R-250 (“Fluka”) как описано ранее [11]. Анализ гелей проводили с использованием программы Quantity One на денситометре GS-800 Calibrated Densitometer (“Bio-Rad”). Области геля соответствующие 15, 20-35 и 50-75 кДа нарезали ручным микротомом на тонкие (около 0,2 мм) срезы, каждый из которых (всего 20) как отдельную пробу трижды промывали водой для удаления красителя, инкубировали в обесцвечивающем буфере (50% раствора ацетонитрила (по объёму) в 100 мМ бикарбонате аммония, pH 8,9) в течение 20 мин при 56°C, а затем дегидратировали 20 мин в 100% ацетонитриле и подвергали трипсинолизу [12]. Надгелевый раствор пептидов отбирали для масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF PMF). Для этого на MALDI мишени AnchorChip смешивали 1 мкл надгелевого раствора с таким же объёмом матрицы (2,5-дигидроксibenзойной кислоты 20 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле, 0,1%-ной трифторуксусной кислоте) и высушивали на воздухе. Каждый образец (срез геля) наносили на две позиции MALDI мишени.

Масс-спектрометрический анализ проводили в рефлекторном режиме в диапазоне масс 800-4500 Да на масс-спектрометре с времяпролетным анализатором Autoflex III TOF (“Bruker Daltonics”, Германия). Полученные спектры (от 6 до 10 на срез) обрабатывали и калибровали по пикам трипсина с массой 842,509 Да и 2211,104 Да в программе FlexAnalysis 3.0 (“Bruker Daltonics”).

Поиск белков по набору масс пептидов проводили с использованием программы Mascot (<http://www.matrixscience.com>) со следующими параметрами: база данных – MSDB (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/MSDB/msdb.fasta.Z>), вид организма – *Danio rerio*, используемый фермент – трипсин, точность идентификации масс пептидов 70-120 ppm с шагом 10 ppm, допуская возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионина, гистидина и триптофана. Результаты идентификации с Mascot score от 55 и выше считались достоверными (p<0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа белков эмбрионов *D. rerio* традиционно используют протеомную технологию, основанную на разделении сложной белковой смеси с помощью двумерного электрофореза и дальнейшей масс-спектрометрии [1]. Однако разделение белков с использованием одномерного электрофореза не потеряло своей актуальности для быстрого выявления изменений протеома [13, 14].

Ранее нами было проведено исследование протеомного профиля эмбрионов *D. rerio* методом одномерного протеомного картирования – сочетания одномерного электрофореза с последующей MALDI-TOF масс-спектрометрией. Полученные данные показали, что инкубация эмбрионов в среде с доксорибицином приводила к значительным изменениям протеома, которые заключались в уменьшении (в 2 раза) количества продуктов расщепления вителлогенинов (Vtg), появлении белка апоптоза каспазы, исчезновении сердечных тропонинов [9]. В настоящей работе, используя предложенную нами технологию, исследовали протеомный профиль эмбрионов *D. rerio* в ответ на введение доксолипа в среду для выращивания эмбрионов. Контролем в наших экспериментах служили эмбрионы, выращенные в среде с ФТН.

На рисунке 1 представлены результаты электрофоретического разделения белков эмбрионов в присутствии и отсутствии доксолипа в среде для выращивания. Для электрофоретического разделения белков эмбрионов в обоих случаях мы наносили на дорожку геля аликвоту УЗ-гомогената, содержащую 4 эмбриона. Результаты денситометрического анализа электрофореграмм (рис. 1) показывают, что количество белковых полос в контроле и опыте было одинаковым. Однако, интенсивность окрашивания белковых полос в контроле выше, чем в опыте. Так, средняя

интенсивность белковых полос на геле в случае экспозиции эмбрионов ФТН составляла $0,26 \pm 0,018$ оптических единиц, тогда как при экспозиции эмбрионов доксолипом средняя интенсивность белковых полос была ниже и находилась в диапазоне $0,15 \pm 0,011$ оптических единиц. Из рисунка 1 видно, что наиболее интенсивно окрашенные полосы на геле находились в области молекулярных масс 75-55, 40, 33, 22, 17 и 13 кДа. Нами были проанализированы области 15, 20-30, 37-75 кДа. Для этого мы разрезали указанные области на 20 тонких срезов (рис. 1). В результате поиска масс-спектров в базе данных MSDB нами было идентифицировано 64 белка (таблица), из них 24 белка – общие для контроля и опыта. Среднее значение достоверности идентификации для всех идентифицированных белков составило 67 ± 13 , а для вителлогенинов – 77 ± 14 . Почти 50% белков были идентифицированы с достаточно низким показателем Mascot score, который составлял порядка 60 ± 5 . Так, например, белки актин, тропомиозин, пируватдегидрогеназа были идентифицированы методом картирования пептидных фрагментов с Mascot score 63, 59 и 56, соответственно. При этом степень покрытия аминокислотной последовательности пептидными фрагментами составила более 30%, что сопоставимо с результатами других авторов, которые также использовали MALDI-TOF PMF для идентификации белков эмбрионов *D. rerio* [15]. С каждой позиции MALDI мы получали от 4 до 6 масс-спектров. Объединение масс-спектрометрических данных позволило повысить качество идентификации белка в сложной многокомпонентной смеси. Например, степень покрытия аминокислотной последовательности актина (Q7ZU23) составила 34% для спектра *a* (рис. 2а). Однако с учётом пиков, детектируемых в другом спектре (рис. 2б), степень покрытия последовательности актина увеличилась до 48%.

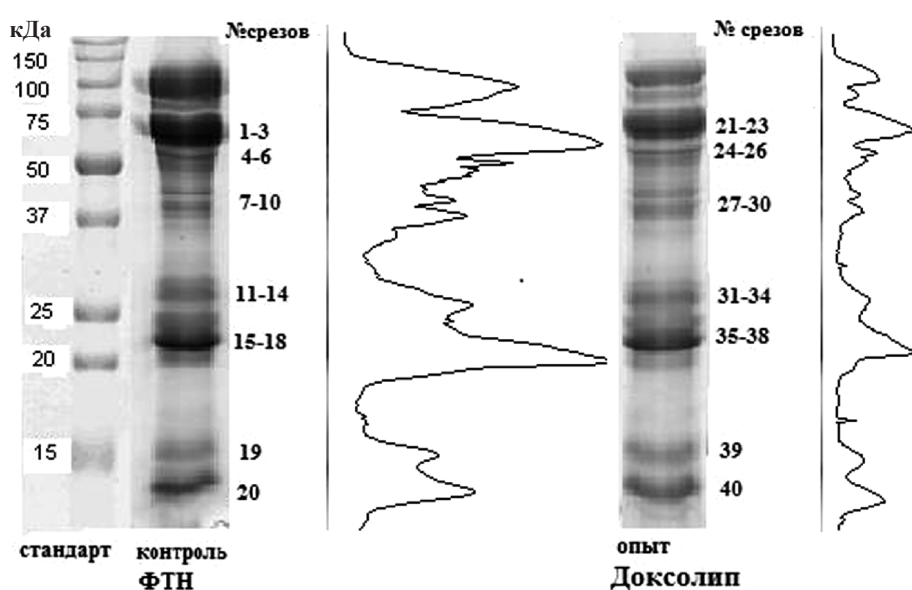


Рисунок 1. Схема нарезания одномерного электрофоретического геля на срезы и денситометрический анализ электрофореграмм белков эмбрионов *D. rerio* после инкубации их в среде с доксолипом и ФТН.

ОДНОМЕРНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ ЭМБРИОНОВ РЫБ *DANIO RERIO*

Таблица. Идентифицированные белки в эмбрионах рыб вида *Danio rerio* (48 ч) в контроле и после воздействия препаратом доксолип.

№ п/п	Название белка	Идентификатор	Молекулярная масса, Да	pI	Score	
					Контроль (ФТН 0,32 мг/мл)	Опыт (доксолип)
1	Vitellogenin 1	Q90YN8	149453	8,68	102±30	89±21
2	Vitellogenin 1 (Fragment)	Q8JH37	127954	8,69	81±18	72±13
3	Vitellogenin 1 (Fragment)	Q8JH36	21118	9,00	60±6	57±1
4	Vg1 protein	Q504J4	36409	9,23	63±15	60±5
5	Novel protein similar to vitellogenin 1 (Vg1)	Q1MTC6	147084	8,73	72±10	68±11
6	Vitellogenin 1	Q1LWN2	149140	8,74	112±34	93±24
7	Novel protein similar to vitellogenin 1 (Vg1) (Fragment)	Q1LWN5	149143	8,92	98±21	85±20
8	Novel protein similar to vitellogenin 1 (Vg1) (Fragment)	Q1LWN1	149169	8,84	96±26	84±16
9	Novel protein similar to vitellogenin 1 (Vg1) (Fragment)	Q1LWN4	149809	8,83	88±24	86±19
10	Novel protein similar to vitellogenin 1 (Vg1)	Q1MTC4	179783	8,70	90±27	75±17
11	Vitellogenin 2 (Fragment)	Q3T7B3	68994	7,84	71±11	не обн.
12	Vitellogenin 4 (Fragment)	Q3T7B1	31190	9,48	68±9	65±5
13	Vitellogenin 5 (Fragment)	Q3T7B0	72821	9,00	71±12	68±8
14	Vitellogenin 6 (Fragment)	Q3T7A9	38969	8,92	64±8	64±7
15	Vitellogenin 7 (Fragment)	Q3T7A8	24319	8,37	76±16	68±8
16	Novel protein similar to vertebrate signal-induced proliferation- associated 1 like family	Q5TYS4	187789	8,87	не обн.	71±9
17	KIAA0947-like	Q3HSD3	165857	5,41	57	не обн.
18	Vascular endothelial growth factor receptor 2	Q5GIT4	152854	6,60	55	не обн.
19	Pol-like protein	Q76IL7	151195	8,94	55	не обн.
20	SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase 2a	Q2I6J1	140336	6,03	не обн.	56
21	Reverse transcriptase	Q76IN6	132393	9,71	55	не обн.
22	Zgc:92107	Q5U3A6	119623	8,99	не обн.	57±2
23	Protein FAM214A	Q1LV22	113405	9,01	64±1	-
24	CASK	Q910A4	104254	6,12	не обн.	58
25	Heat shock protein 4	Q6NZU0	94672	5,10	не обн.	64
26	Zinc finger CCCH-type containing 5	Q802W8	78445	6,72	55	не обн.
27	Cut-like 1	Q6DI42	76993	5,18	55	не обн.
28	Tax1-binding protein 1 homolog A	Q1LWB0	76701	4,92	не обн.	56
29	Novel mcm domain containing protein (Fragment)	Q5SPR9	73236	5,44	55	62
30	IFN-inducible antiviral protein MxA	Q8JH68	73216	5,47	62	не обн.
31	Myxovirus (Influenza) resistance A	Q1ECX1	71549	5,78	62	не обн.
32	Novel protein similar to vertebrate meningioma expressed antigen 6 (Coiled-coil proline-rich) (MGEA6) (Fragment)	Q5SP05	69855	6,18	65	не обн.
33	BCO85673NID: <i>Danio rerio</i>	AAH85673	62892	5,17	57	не обн.
34	Srp72 protein	Q7SXT3	62050	6,17	55	не обн.
35	Pyruvate kinase, muscle	Q7ZVT2	58021	6,54	59±4	не обн.
36	Zgc:86863, CDK5 regulatory subunit associated protein 3	Q6IQA6	57310	5,04	не обн.	61±8
37	Transferrin-a	Q6P3G0	56868	5,58	55	55
38	Novel protein (Zgc:113267)	Q58EK1	56315	5,44	61	не обн.
39	Zgc:123281 protein, Threonine synthase-like2	Q2YDP8	53047	6,03	не обн.	60±1
40	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6- biphosphatase 1	Q803Y6	52913	6,84	61	55
41	Chimaerin	Q49NY1	52827	6,61	не обн.	55
42	Germ cell nuclear factor	Q9PU65	51139	6,82	не обн.	55
43	Zgc:92215, Histidil-tRNK synthetase	Q66HY3	49049	8,76	74	56
44	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	Q7SXX0	47177	4,99	55	не обн.

Примечание: не обн. - не обнаружен.

Таблица. Продолжение.

№ п/п	Название белка	Идентификатор	Молекулярная масса, Да	pI	Score	
					Контроль (ФТН 0,32 мг/мл)	Опыт (доксолип)
45	Novel protein similar thymidylate kinase family LPS-inducible member (Tyki) (Fragment)	Q5RH94	45519	6,51	не обн.	60
46	Hypothetical protein zgc:63696 TEA domain family member 1	Q7SXX3	44441	8,97	не обн.	62
47	Pdha1 protein (Pyruvate dehydrogenase)	Q6P948	43713	8,19	56	не обн.
48	Retinoid X receptor	I50514	42529	8,31	58	не обн.
49	Novel actin protein	Q6IQL9	41978	5,22	не обн.	63
50	Actin, alpha 1, skeletal muscle	Q7ZU23	41956	5,23	не обн.	63
51	Actin	Q6XNL8	41948	5,22	не обн.	63
52	Actin, alpha 1a, skeletal muscle	Q567E8	41890	5,29	не обн.	63
53	Actin, alpha 1b, skeletal muscle	Q4KMI7	41860	5,29	не обн.	63
54	Solute carrier family 25, member 27	Q7T3F5	34956	10,2	56±1	55
55	Tropomyosin 4	Q5U3J6	32704	4,66	59±4	58±4
56	Solute carrier family 25 (Mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4	Q6NX10	32667	9,74	не обн.	55
57	Zgc:136286	Q1RM99	28810	9,33	83±20	58±2
58	Tropomyosin 4, isoform 2	Q7T3F0	28484	4,63	56±1	58±2
59	Novel protein (fragment)	Q1LX58	27553	8,11	59	не обн.
60	Proteasome subunit beta type	Q6DRF3	26084	6,32	57	не обн.
61	Novel protein similar to vertebrate tropomyosin 4 (TPM4) (Zgc:63909)	Q1LXM1	23518	4,6	не обн.	62±6
62	Novel protein similar to vertebrate tropomyosin 4 (TPM4)	Q1LXM2	23434	4,6	55	57±2
63	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9 B	Q568N4	21847	5,18	60	56
64	Wilms tumor 1 associated protein	Q5SPA6	17758	5,63	не обн.	60±2
	Всего белков				45	44

Примечание: не обн. - не обнаружен.

Несмотря на то, что количество белков в контрольном образце и в опытных эмбрионах практически не отличается, в том числе и продуктов расщепления вителлогенинов, при выращивании эмбрионов с доксолипом удалось идентифицировать тропомиозины, актин и его изоформы (таблица). Это согласуется с другими токсикопротеомными исследованиями, в которых показана связь цитоскелетных белков с токсичным ответом [16, 17]. Например, Shi и соавт. [18] показали, что в личинках *D. rerio* преимущественно пострадал цитоскелет после воздействия перфтороктановым сульфонатом, являющимся стойким токсином. Manduziot и соавт. [19] обнаружили, что изменение выработки актинов и миозинов в мидиях является показателем загрязнения воды. Таким образом, наши результаты согласуются с данными других авторов и подтверждают, что токсическое воздействие может привести к значительным изменениям экспрессии цитоскелетных белков.

В контрольных эмбрионах нами идентифицированы вителлогенины и их фрагменты типа 1, а также фрагмент вителлогенина типа 2 (Q3T7B3) с молекулярной массой 69 кДа, который не был выявлен в эмбрионах, выращенных в среде с доксолипом (таблица). Известно, что Vtg 2 исчезает

в ответ на эндокринные расстройства [20, 21]. Из таблицы видно, что воздействие доксолипа на эмбрионы привело к значительному снижению количества ядерных белков участвующих в синтезе РНК и ДНК и экспрессии цитоскелетных белков. Кроме того, неблагоприятные последствия, вызванные воздействием доксорубина, встроенного в ФТН, скорее всего, реализуются при участии белков иммунной системы и белков, участвующих в синтезе нуклеиновых кислот. Например, в контрольном образце нами были идентифицированы IFN-inducible antiviral protein MxA (ответ на вирус), Муховирус (Influenza) resistance A (устойчивость к вирусу гриппа), Pol-like protein (репликация ДНК), Reverse transcriptase (синтез РНК), тогда как в опытных эмбрионах после экспозиции с доксолипом эти белки не были достоверно определены.

Сравнивая полученные результаты с нашим предыдущим исследованием по изучению воздействия доксорубина на эмбрионы *D. rerio* [9], можно увидеть, что воздействие доксорубина на эмбрионы приводило к значительному снижению (в 2 раза) количества идентифицированных вителлогенинов и их фрагментов. Это говорит в пользу того, что доксорубин, встроенный в фосфолипидную транспортную наносистему,

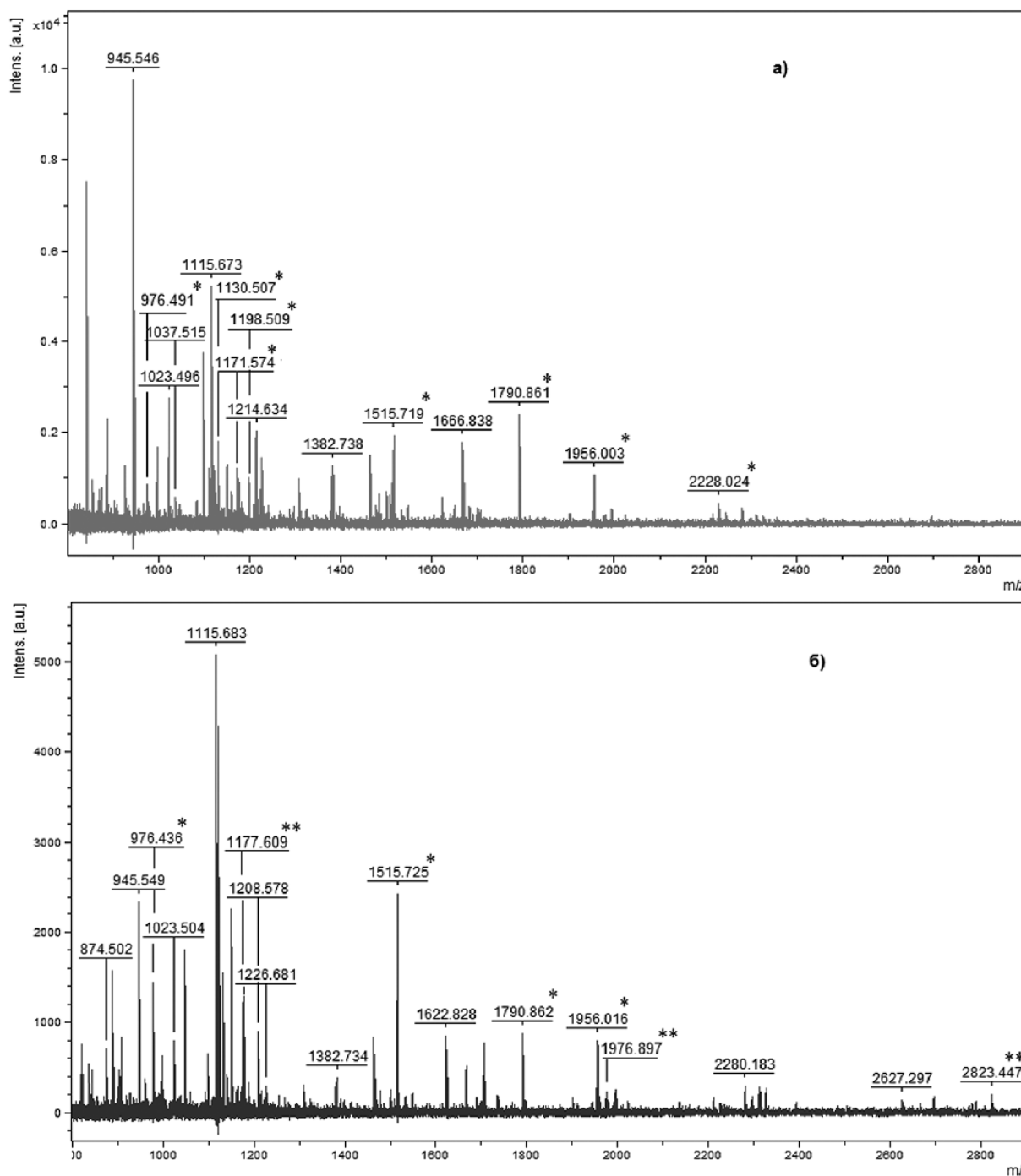


Рисунок 2. Масс-спектры (*а* и *б*) протеолитических пептидов эмбрионов *D. rerio* после воздействия доксолипом, экстрагированных из одного среза геля № 11. * - пики пептидов, относящиеся к актину (Q7ZU23, молекулярная масса 41956 Da); ** - пики пептидов актина, детектируемые в спектре *б*, но отсутствующие в спектре *а*.

оказывает значительно менее токсичное воздействие на эмбрионы. Ещё одним подтверждением уменьшения токсичности доксорубина при его включении в ФТН можно считать отсутствие каспазы среди идентифицированных белков при экспозиции эмбрионов доксолипом.

Известно, что клиническое применение доксорубина ограничивается его дозозависимой токсичностью [22]. И для уменьшения побочных

эффектов и повышения его эффективности в лаборатории фосфолипидных нанолечарств и транспортных систем ИБМХ был получен препарат доксолип, в котором доксорубин встроен в фосфолипидную наносистему. Сравнительный анализ протеомных профилей эмбрионов подвергнутых обработке доксолипом и доксорубином позволил сделать заключение о снижении эмбриотоксичности доксорубина при включении его в фосфолипидную наносистему.

Работа выполнена в рамках проекта “Разработка методологии и создание средств контроля для оценки безопасности действия наноматериалов на аппарат наследственности” №01.648.12.3004 от 25.09.2008 г. и в рамках Госконтракта №16.740.11.0012. от 01.09.2010 г. с Министерством образования и науки РФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Forné I., Abián J., Cerdà J. (2010) *Proteomics*, **10**, 858-872.
2. Postlethwait J.H., Woods I.G., Ngo-Hazelet, P., Yan Y.L., Kelly P.D., Chu F., Huang H., Hill-Force A., Talbot W.S. (2000) *Genome Res.* **10**, 1890–1902.
3. Kari G., Rodeck U., Dicker A.P. (2007) *Clin. Pharmacol. Ther.*, **82**, 70-80.
4. Ипатова О.М., Торховская Т.И., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Иванова Н.Д., Широнин А.В., Баранова В.С., Арчаков А.И. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 101-119.
5. Арчаков А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Лисица А.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широнин А.В. (2009) Наносистема на основе растительных фосфолипидов для включения биологически активных соединений и способ её получения (варианты), Патент №2391966.
6. Арчаков А.И., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Торховская Т.И., Тихонова Е.Г., Зыкова М.Г., Воскресенская А.А. (2009) Фармацевтическая композиция на основе доксорубина и фосфолипидных наночастиц для лечения онкологических заболеваний, Патент № 2411935.
7. Prados J., Melguizo C., Ortiz R., Vélez C., Alvarez P.J., Arias J.L., Ruiz M.A., Gallardo V., Aranea A. (2012) *Anticancer Agents Med. Chem.*, **12**, 1058-1070.
8. Лисица А.В., Петушкова Н.А., Никитин И.П., Згода В.Г., Карузина И.И., Мошковский С.А., Ларина О.В., Скупенко О.Г., Полищук Л.О., Thiele H., Арчаков А.И. (2009) *Биохимия*, **74**, 190-200.
9. Кисриева Ю.С., Петушкова Н.А., Чернобровкин А.С., Ларина О.В., Трифонова О.П., Саменкова Н.Ф., Кузнецова Г.П., Карузина И.И., Каширцева В.Н., Беляева Н.Ф., Лисица А.В. (2011) *Биомед. химия*, **57**, 593-603.
10. Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680–685.
11. Neuhauff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W. (1988) *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
12. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
13. Cottingham K. (2010) *J. Proteome Res.*, **9**, 1636.
14. Löfner C., Wee S., Ler S.G., Li R.H., Carney T., Blackstock W., Gunaratne J. (2012) *Proteomics*, **12**, 1879-1882.
15. Link V., Shevchenko A., Heisenberg C.-P. (2006) *BMC Developmental Biology*, **6**, 1.
16. Apraiz I., Mi J., Cristobal S. (2006) *Mol. Cell. Proteom.*, **5**, 1274–1285.
17. Monsinjon T., Knigge T. (2007) *Proteomics*, **7**, 2997–3009.
18. Shi X., Yeung L.W.Y., Lam P.K.S., Wu R.S.S., Zhou B. (2009) *Toxicological Sciences*, **110**, 334-340.
19. Manduzio H., Cosette P., Gricourt L. et al. (2005) *Proteomics*, **5**, 4958–4963.
20. Denslow N.D., Chow M.C., Kroll K.J., Green L. (1999) *Ecotoxicology*, **8**, 385-398.
21. De Souza A.G., MacCormack T.J., Wang N., Li L., Goss G.G. (2009) *Zebrafish*, **6**, 229-238.
22. Volkova M., Russell R. (2011) *Curr. Cardiol. Rev.*, **7**, 214-220.

Поступила: 21. 03. 2013.

ANALYSIS OF PROTEOMIC PROFILE CHANGES OF ZEBRAFISH EMBRYOS DURING EXPOSURE TO DOXORUBICIN, BUILT-IN THE PHOSPHOLIPID TRANSPORT NANOSYSTEM

N.F. Samenkova, Y.S. Kisrieva, N.A. Petushkova, G.P. Kuznetsova, O.B. Larina, O.P. Trifonova, I.I. Karuzina, O.M. Ipatova, A.V. Lisitsa

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7 (499) 246- 33-75; fax: +7 (499) 245-08-57;
e-mail: juliaks@bk.ru

The proteome profile of *Danio rerio* embryos grown in the medium containing doxorubicin, included in the phospholipid transport nanosystem (doxolip) has been investigated using combination of 1D-electrophoresis with subsequent MALDI-TOF-PMF mass spectrometry. Cultivation of growing of *D. rerio* embryos in the medium with doxolip caused a substantial increase in expression of the cytoskeletal proteins, a decrease in the number of nuclear proteins involved in DNA and RNA synthesis and disappearance of vitellogenin 2 in comparison with control (the cultivation medium containing the phospholipid transport nanosystem). Analysis of the proteomic profiles of doxolip-treated embryos suggests lower toxicity of doxorubicin incorporated in the phospholipid nanosystem.

Key words: doxorubicin, doxolip, *Danio rerio*, one-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, phospholipid nanoparticles.