

ПРОТЕОМИКА

УДК 577.2; 577.1

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА, ВКЛЮЧЕННОГО В ФОСФОЛИПИДНУЮ ТРАНСПОРТНУЮ НАНОСИСТЕМУ, НА ПРОТЕОМ КЛЕТОК HEPG2

К.Г. Кузнецова, Е.В. Казлас, Т.И. Торховская, П.А. Каралкин, И.В. Вахрушев,
Т.С. Захарова, М.А. Санжаков, С.А. Мошковский, О.М. Ипатов*

Научно-исследовательский институт имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: (499) 248-40-08, (499) 246-43-56;
эл. почта: torti@mail.ru

В ИБМХ РАМН разработана фосфолипидная транспортная наносистема с размером частиц до 30 нм с включением ряда лекарств, в том числе с доксорубицином (доксолип). Ранее было показано *in vivo* повышение её действия по сравнению со свободным лекарством. В данной работе проведено исследование влияния наносистемы с включённым доксорубицином на протеом клеток HEPG2. Клетки инкубировали в среде, содержащей фосфолипидные наночастицы при концентрации 0,5 мкг/мл по доксорубину и 10 мкг/мл по фосфатидилхолину; выживание через 48 ч составляло в среднем 10% по сравнению с необработанными клетками. После инкубации клеточные белки анализировали методом количественного двумерного электрофореза с последующей идентификацией отличающихся белковых пятен масс-спектрометрией MALDI-TOF. Показано, что сама фосфолипидная транспортная наносистема (ФТН) не вызывает достоверных изменений клеточных белков, что подтверждает полученные ранее данные о её безопасности. Доксорубин, как свободный, так и включённый в фосфолипидные наночастицы (доксолип), индуцирует изменения экспрессии 28 клеточных белков. При этом для четырёх из них действие доксолипа отличалось от действия свободной лекарственной субстанции доксорубина. Для доксолипа наблюдалось более выраженное влияние на экспрессию ряда белков, что может косвенно указывать на повышение проникновения лекарства в опухолевую клетку при его включении в наночастицы. Повышение противоопухолевой активности доксорубина в составе ФТН может быть сопряжено с более активным увеличением экспрессии ряда специфических белков.

Ключевые слова: фосфолипидные наночастицы, протеом, доксорубин, клетки HEPG2, масс-спектрометрия MALDI-TOF.

DOI: 10.18097/PBMC20156103343

ВВЕДЕНИЕ

Развитие и совершенствование наукоёмких технологий привело в последнее десятилетие к появлению как новых продуктов, в том числе используемых в медицине, так и новых аналитических методов, расширяющих возможности получения информации о клеточных процессах. К инновационным продуктам относятся различные системы, получаемые на основе наночастиц, в частности – эффективные системы для диагностики или доставки лекарств, значительно повышающие их терапевтический потенциал [1, 2]. К новым же аналитическим методам следует отнести масс-спектрометрические методы анализа индивидуальных природных соединений, позволяющих с максимальной точностью провести

молекулярную инвентаризацию компонентов клеточных систем. Развитие таких методов дало начало новым научным областям – геномике, протеомике, и впоследствии и липидомике [3-5].

В настоящее время все чаще с помощью масс-спектрометрических методов исследуют различные аспекты биологического действия наноматериалов [6, 7]. Полагают, что именно протеомные подходы, позволят зафиксировать первые, ещё не улавливаемые другими методами, внутриклеточные изменения, индуцируемые наночастицами [6]. Это, в свою очередь, может дать новую информацию как о механизмах оптимизирующего действия наносистем на транспортируемые ими лекарства [1, 2], так и о возможных рисках токсикологических

* - адресат для переписки

эффектов наночастиц, проявляющихся в дальнейшем уже на макроуровне [1]. В наибольшей степени требуют углублённого изучения различные современные наноформы противоопухолевых препаратов, необходимость разработки которых обусловлена сильно выраженными побочными действиями этих лекарств [8].

В ИБМХ РАМН разработана фосфолипидная система транспорта лекарств с размером частиц до 30 нм [9], и показана возможность встраивания в неё ряда лекарственных субстанций, приводящего к повышению их эффективности [10]. В частности, разработана лекарственная композиция, содержащая известный противоопухолевый препарат доксорубин, включённый в фосфолипидные наночастицы (“доксолип”) [11, 12]. Результаты доклинических исследований полученной композиции на мышах с карциномой LLC показали почти в 4 раза большее торможение роста опухоли и на более ранних сроках по сравнению со свободным доксорубином [13]. В данной работе, с целью выяснения влияния включения доксорубина в фосфолипидные наночастицы на проявление его эффективности, было проведено сравнение изменений протеома клеток HEPG2 под действием свободного доксорубина и включённого в разработанную фосфолипидную транспортную наносистему (ФТН).

МЕТОДИКА

Фосфолипидную транспортную наносистему (ФТН) получали, как подробно описано ранее [9], с использованием соевого фосфатидилхолина Lipoid S100 (“Lipoid GmbH”, Германия) и моногидрата мальтозы (MERCK, Германия). Фосфатидилхолин диспергировали в 10% водном растворе мальтозы при концентрации 25 мг/мл, и полученную грубую эмульсию пропускали под давлением 1000 атм. через гомогенизатор Mini-Lab 7.3 VH (“Rannie”, Дания) с последующей фильтрацией. Полученную ультратонкую эмульсию разливали в стерильные флаконы по 10 мл и лиофилизировали с помощью лиофильной сушилки Liolab F (“LioLab Ltd.”, Таиланд). Размер получаемых наночастиц определяли с использованием лазерного корреляционного спектрометра N5 Submicron particle analyzer (“Beckman-Coulter Inc.”, США); он составлял 20-30 нм [9].

Систему с встроенным в наночастицы доксорубином (“доксолип”) получали путём аналогичной процедуры, с добавлением на начальном этапе гидрохлорида доксорубина (“Hallechem Pharma Co. Ltd.”, Китай) до концентрации 2 мг/мл [11]. Степень встраивания (включения) доксорубина в фосфолипидные наночастицы определяли с помощью ВЭЖХ на приборе Agilent-1100 (“Agilent Technologies”, США), после ультрафильтрации образца. Установлено, что 98% доксорубина было включено в фосфолипидные наночастицы; размер частиц составлял 26 ± 3 нм [11]. Подробное описание

получения доксолипа и его характеристики приведены в патенте [11].

Использовали клетки перевиваемой культуры гепатоцеллюлярной карциномы низкой степени злокачественности HEPG2, полученной из Российской коллекции клеточных культур института цитологии РАН (ИНЦ РАН, С.-Петербург) и поддерживаемой в коллекции клеточных культур ИБМХ РАМН. Клетки выращивали в культуральных флаконах в среде, содержащей 10% фетальной сыворотки телёнка (“Life Technologies, Inc.”, США) при 37°C в CO₂-инкубаторе с концентрацией CO₂ 5% в стандартных условиях [14].

Подбор концентрации препаратов доксорубина проводили на основании анализа его влияния на выживаемость клеток, для чего клетки инкубировали 48 ч в среде с концентрацией доксорубина от 0,1 до 10 мкг/мл. Выживаемость оценивали по МТТ-тесту, основанному на способности только живых клеток реагировать с красителем МТТ (диметил-тиазолил-дифенил тетразолием) [15]. Для проведения протеомного анализа образцы клеток инкубировали с препаратами при выбранной концентрации – 0,5 мкг/мл по доксорубину, что для доксолипа соответствует 10 мкг/мл фосфатидилхолина [11]. Проводили также инкубацию клеток с ненагруженной лекарством ФТН при той же концентрации. В качестве контроля клетки HEPG2 инкубировали 48 ч без добавления препаратов.

По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием при 400 g на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5810 R (“Eppendorf”, Германия) и извлекали белки обработкой буфером по описанным методикам [4, 14]. Образцы раствора (по 20 мкл) хранили при -80°C до непосредственного проведения протеомного анализа.

Первый этап анализа – двумерный электрофорез клеточных белков – проводили по усовершенствованному варианту [16] классической методики [17], с разделением в первом направлении на готовых стрипах с диапазоном pH 3-10 (“GE Healthcare”, США), а во втором – SDS электрофорезом в полиакриламидном геле. После окончания электрофореза гели фиксировали раствором 10% уксусной кислоты и 20% этанола. Для визуализации белков гели окрашивали раствором, содержащим 0,2% AgNO₃ и 0,076% формалина [18]. Сканирование проводили на сканере Calibrated densitometer 800 (“Bio Rad”, США), определяя среднюю интенсивность (AV) пятен белков при помощи программы Melanie 3.0 – по величине произведения площади пятна на интенсивность сигнала. Инкубацию образцов с последующим анализом гелей проводили для каждого случая в трёх повторах.

С помощью компьютерного дисперсионного анализа проводили сравнение интенсивности одних и тех же пятен в разных образцах и выбирали для следующего этапа работы (идентификации) только пятна, отличающиеся по средним значениям интенсивности от тех же пятен

на электрофореграммах контрольных образцов как минимум в два раза, как это делалось в других сравнительных протеомных исследованиях [14, 19]. Выбранные пятна на геле вырезали для идентификации находящихся в них белков, и материал (~3 мм³) обрабатывали по описанной методике [20]. Идентификацию проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-TOF с использованием масс-спектрометра Ultraflex MALDI-TOF-TOF ("Bruker Daltonics", Германия), оснащенного N₂-лазером 350 нм, в режиме положительных ионов. Получаемые масс-спектры калибровали по внутренним стандартам (пики автолиза трипсина, МН⁺ 1046,54, 2212,10 Да). Для идентификации использовали программное обеспечение FlexAnalysis 2.4 ("Bruker Daltonics") и программы Mascot 2.3 ("Matrix Science", США) с применением базы данных Swiss Prot для *Homo sapiens* [3-5, 19].

Сравнение результатов обработки клеток как по отношению к контролю, так и эффекта доксолипа по отношению к доксорубину – проводили, как описано в работах [14, 19], по величине "fold change", то есть кратности изменений, показывающей, во сколько раз и в какую сторону отличается средняя интенсивность (AV) данного пятна на электрофореграммах сравниваемых образцов. Этот показатель был использован при протеомных исследованиях действия лекарств на клетки HepG2 в работах Hammer с соавт. [14] и Van Summeren с соавт. [19].

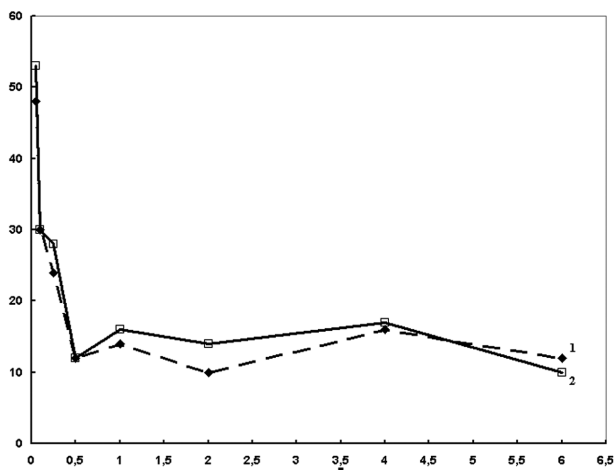


Рисунок 1. Влияние доксорубина и доксолипа на жизнеспособность клеток HepG2 при 48-часовой инкубации. По оси абсцисс – концентрация доксорубина в среде, мкг/мл, по оси ординат – выживаемость клеток, %. (1 – доксорубин, 2 – доксолип)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы был выбор рабочих концентраций доксорубина, оставляющих после 48 ч инкубации более 10% живых клеток. С помощью МТТ-теста была оценена выживаемость клеток в среде с доксорубином и доксолипом при концентрациях от 0,1 до 10 мкг/мл по доксорубину

(рис. 1). Наблюдалось снижение жизнеспособности клеток в присутствии доксорубина и доксолипа по мере возрастания концентраций лекарства в среде, причём характер зависимости был сходным. При концентрации 0,5 мкг/мл по доксорубину отмечена более чем 10%-ная выживаемость клеток для обоих препаратов, поэтому данная концентрация была выбрана как рабочая для дальнейших экспериментов. Для доксолипа, по соотношению лекарство/фосфолипид [11], это соответствовало 10 мкг/мл фосфатидилхолина. Эти концентрации были выбраны для дальнейших экспериментов по протеомному анализу.

На рисунке 2 представлена электрофореграмма исходных, необработанных препаратами, клеток HepG2. Общий вид электрофореграммы сходен с таковым в работе Hammer с соавторами, показавших в клетках HepG2 1835 пятен белков [14]. Аналогичным по расположению белковых пятен был также общий вид электрофореграмм клеток после проведенных обработок – доксолипом, доксорубином или ФТН. Для клеток, обработанных ФТН, не наблюдалось принципиальных различий и в интенсивности пятен. То есть, фосфолипидная транспортная наносистема как таковая практически не оказывала влияния на экспрессию белков клеток HepG2, что, наряду с ранее полученными токсикологическими данными [11], является дополнительным подтверждением её безопасности. Для клеток же, обработанных обеими формами доксорубина, компьютерный анализ показал изменения интенсивности 28 пятен белков по сравнению с нативными клетками. Для одних из них наблюдалось повышение, для других – снижение экспрессии. Положения этих пятен указаны на рисунке 2, с соответствующими номерами (для последующей их идентификации), а данные по их количеству, с указанием сходства или различия эффектов доксолипа и свободного доксорубина, приведены в таблице 1.

В таблице 1 указана также направленность этих изменений и даны номера соответствующих пятен на электрофореграммах (обозначенных на рис. 2). Как видно из таблицы, для большинства белков (24 из 28) характер действия доксолипа и доксорубина был одинаковым, то есть включение доксорубина в фосфолипидные наночастицы не изменяло ответа этих белков на действие лекарства. Из них для 13 белков белков после действия обоих препаратов повышалась по сравнению с нативными клетками, а для 11 снижалась. Идентифицированные белки участвуют в окислительно-восстановительных и белок-синтезирующих процессах, которые, как полагают, оказываются чувствительными к действию доксорубина [21].

Наряду с этим, было выявлено четыре белка с изменённой экспрессией после действия доксолипа по сравнению с доксорубином (табл. 1) – пятна №№ 3, 32, 49 и 51 на рисунке 2. В случае двух из них (№№ 49 и 51) доксолип был эффективнее доксорубина, для остальных (№3 и №32) – наоборот.



Рисунок 2. Двухмерный электрофорез белков в контрольном образце клеток НерG2 и расположение пятен, отличающихся в образцах клеток после инкубации с доксорубицином или доксолипом

Таблица 1. Количество белков в клетках НерG2 с изменениями экспрессии (в 2 и более раза) под действием доксорубицина и доксолипа.

Характер воздействия	Кол-во белков	№№ пятен на электрофореграммах*
<u>Одинаковое действие доксолипа и доксорубицина</u> в том числе:	24	1, 5-14, 16, 20, 23, 24, 30, 31, 33, 39, 41, 44, 45, 48, 50, 53
Повышение экспрессии по сравнению с контролем	13	
Снижение экспрессии по сравнению с контролем	11	
<u>Различное действие доксолипа и доксорубицина</u> в том числе:		
Усиление эффекта для доксолипа	2	49 и 51**
Снижение эффекта для доксолипа	2	3 и 32 **

Примечание: *- номера пятен обозначены на электрофореграмме, рис. 2; **- названия белков, соответствующих данным номерам пятен, и характер изменений их экспрессии даны в следующей таблице (табл. 2).

Подробно изменения экспрессии этих четырёх белков, отличающиеся для клеток, обработанных свободным доксорубицином и доксолипом, рассмотрены в таблице 2. Приведены данные по их идентификации, средней интенсивности пятен в контроле и после действия обеих форм доксорубицина, направленности и степени эффекта по сравнению с контролем ("fold change", то есть во сколько раз и в какую сторону изменилась экспрессия данного белка). В правом столбце таблицы 2 указана направленность действия доксолипа по сравнению с доксорубицином на экспрессию конкретного белка.

Как видно из таблицы 2, для двух белков клеток НерG2 доксолип усиливал действие доксолипа, а для двух – ослаблял. Усиление ингибирующего действие доксорубицина при включении в фосфолипидные наночастицы наблюдалось для двух белков – гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Homo sapiens GN=HNRPDL PE=1 SV=3*, пятно №49 на электрофореграмме, рис. 2) и карбоангидразы (*Carbonic anhydrase 2 OS=Homo sapiens GN=CA2 PE=1 SV=2*, пятно №51). Свободный доксорубицин вызывал лишь слабое снижение уровня этих белков, менее, чем в 2 раза, что для данного метода не считается достоверным изменением [14, 19]. В противоположность этому, инкубация с доксолипом

приводила к заметному и достоверному снижению экспрессии обоих белков по сравнению с контролем – в 3,3 и в 5,1 раз, соответственно. Первый из них (пятно №49) – мультифункциональный белок, участвующий в ядерном импорте, а также в процессировании РНК [22]. В связи с тем, что основным механизмом действия доксорубицина считается разобщение синтеза ДНК и РНК [21], можно полагать, что ингибирование экспрессии этого белка является одним из проявлений противоопухолевого действия лекарства. В отношении другого белка, карбоангидразы (пятно №51), имеются данные, что его повышенная экспрессия в ряде опухолей ассоциирована с плохим прогнозом и риском метастаза, и её торможение снижает инвазию [23], то есть оказывает терапевтическое действие. Поэтому наблюдаемое усиление в доксолипе ингибирования экспрессии этих двух белков может свидетельствовать о повышении эффективности лекарства, что, по всей вероятности, является результатом его большего проникновения в клетку. Это предположение подтверждается данными о повышении эндоцитоза доксорубицина в клетки НерG2 при его включении в липосомы [24]

С другой стороны, для белков двух других пятен действие доксолипа (активирующее или ингибирующее) оказалось в среднем в 2 раза менее выраженным, чем доксорубицина (табл. 2).

Таблица 2. Белки клеток НерG2 с различным влиянием доксорубицина или его нанофосфолипидной формы (доксолипа) на экспрессию

№ пятна ¹	Название белка	Молекулярный вес	Средняя интенсивность пятна (AV) ²			Изменение AV по сравнению с контролем ("fold change", во сколько раз)		Эффект доксолипа на экспрессию белка - по сравнению с доксорубицином
			Контроль (0)	DR	DL	DR	DL	
49	<u>Усиление доксолипом эффекта доксорубицина:</u> Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Homo sapiens GN=HNR-PDL PE=1 SV=3	46409	0,297±0,073	0,172±0,038	0,090±0,019	-1,73	-3,3	в 1,91раза
51	Carbonic anhydrase 2 OS=Homo sapiens GN=CA2 PE=1 SV=2	29228	0,461±0,045	0,234±0,133	0,091±0,070	-1,97	-5,06	в 2,57раза
32	<u>Ослабление доксолипом эффекта доксорубицина:</u> Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1 + SAP domain-containing ribonucleoprotein	29537+23656	0,032±0,005	0,178±0,020	0,090±0,006	5,56	2,81	в 1,98 раза
3	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens GN=NAP1L1 PE=1 SV=1	45346	0,454±0,058	0,154±0,124	0,319±0,033	-2,95	-1,42	в 2,08 раза

Примечание: 1 - в соответствии с номерами, указанными на рисунке 2; 2 - значения средней интенсивности (AV) пятен белков на электрофореграммах определяли при помощи программы Melanie 3.0. Сокращения: DR - доксорубицин, DL - доксолип.

Так, для белка протеасом (Proteasome subunit alpha type-1), дающего при двумерном электрофорезе одно пятно (№32) с рибонуклеопротеином (SAP domain-containing ribonucleoprotein), доксорубин вызывает повышение экспрессии в 5,6 раза, а доксолип снижает этот эффект почти вдвое (кратность изменений по сравнению с контролем равна лишь 2,8). Для другого белка – белка нуклеосом (Nucleosome assembly protein 1-like 1, пятно № 3), для которого свободный доксорубин подавляет экспрессию в 3 раза, доксолип вдвое снижал и этот его эффект, практически сводя его на нет. О функции этого белка известно, что он участвует в формировании нуклеосомы, то есть упаковке нити ДНК с гистоновыми белками [25], а для белков протеасом, включая, возможно, названный выше белок (Proteasome subunit alpha type-1), показано участие в апоптозе [26]. Значение ослабляющего влияния доксолипа на ингибирование этих белков пока не ясно, так как, несмотря на многолетнее использование доксорубина как ингибитора клеточного роста, за счёт разобщения синтеза ДНК, точный механизм этого ингибирования и участие в нём конкретных белков пока не известны [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на примере противоопухолевого препарата доксорубина, включённого в фосфолипидные наночастицы, на клетках НерG2 показана возможность оценки протеомными методами влияния фосфолипидной транспортной наносистемы на эффективность действия лекарства. Показано, что включение доксорубина в такую наносистему (препарат “доксолип”) приводит к усилению его влияния на экспрессию ряда белков, связанных с основным механизмом его действия – ингибированием процессов, связанных с синтезом ДНК. Это свидетельствует о большем проникновении доксорубина в опухолевую клетку, что может частично объяснять наблюдаемое нами ранее *in vivo* более активное противоопухолевое действие доксолипа по сравнению с доксорубином.

Показано отсутствие достоверного влияния на протеом самой транспортной наносистемы, без лекарства, что подтверждает её безопасность. Более детальное выяснение влияния фосфолипидной транспортной наносистемы, в том числе с включённым доксорубином, на протеом клеток НЕРG2 требует дальнейших исследований. В целом, результаты свидетельствуют об информативности использования протеомных подходов для оценки влияния на клетки лекарств, включённых в транспортные наносистемы.

Работа выполнена в рамках Госконтракта №16.740.11.0012 от 01 сентября 2010 г. “Молекулярные механизмы действия наносистемы транспорта лекарств, исследованные протеомными методами *in vitro* и *in vivo*” с Министерством образования и науки Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dusinska M. (2009) *Nanomedicine*, **4**, 605-607.
2. Арчаков А.Н. (2010) *Биомед. химия*, **56**, 7-25.
3. Говорун В.М., Арчаков А.И. (2002) *Биохимия*, **67**, 1341-1359.
4. Hong M.L., Jiang N., Gopinath S., Chew F.T. (2006) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 563-568.
5. Moshkovskii S.A., Sokolova E.E., Brattseva E.V., Karpova M.A., Pyatnitskiy M.A., Kubanova A.A., Archakov A.I. (2011) *Proteomics Clin. Appl.*, **5**(78), 432-439.
6. Agrawal G.K., Timperio A.M., Zolla L., Bansal V., Shukla R., Rakwal R. (2013) *J. Proteomics*, **93**, 74-92.
7. Johnson C.J., Zhukovsky N., Cass A.E., Nagy J.M. (2008) *Proteomics*, **8**(4), 715-730.
8. Rafati H., Mirzajani F. (2011) *Pharmazie*, **66**(1), 31-36.
9. 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. (2010) Патент № 2391966 РФ (Бюллетень Изобретений №17).
10. Ipatova O.M., Prozorovskiy V.N., Medvedeva N.V., Shironin A.V., Strekalova O.S., Ivanova N.D., Torkhovskaya T.I., Archakov A.I. (2010) *Europ. Congress for Drug Discovery (MipTec)*, Basel, Abstr. 80.
11. Арчаков А.И., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Торховская Т.И., Тихонова Е.Г., Зыкова М.Г., Воскресенская А.А. (2011) Патент №2411935 РФ (Бюллетень Изобретений №5).
12. Зыкова М.А., Ипатова О.М., Прозоровский В.Н., Медведева Н.В., Воскресенская А.А., Захарова Т.С., Торховская Т.И. (2011) *Биомед. химия*, **57**, 174-179.
13. Zyкова M.A., Medvedeva N.V., Torkhovskaya T.I., Tikhonova E.G., Prozorovskii V.N., Zakharova T.S., Ipatova O.M. (2012) *Exp. Oncol.*, **34**(4), 323-326.
14. Hammer E., Bien S., Salazar M.G., Steil L., Scharf C., Hildebrandt P., Schroeder H.W., Kroemer H.K., Völker U., Ritter C.A. (2010) *Proteomics*, **10**, 99-114.
15. http://universal_en_ru.academic.ru/202111/MTT_assay
16. Gorg A., Postel W., Gunther S. (1985) *Electrophoresis*, **6**, 599-604.
17. O'Farrell P. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021.
18. Moetz E., Krogh T., Vorum H., Gorg A. (2001) *Proteomics*, **1**, 1359-1363.
19. Van Summeren A., Renes J., Bouwman F.G., Noben J.P., van Delft J.H., Kleinjans J.C., Mariman E.C. (2011) *Toxicol. Sci.*, **129**(1), 109-122.
20. Havlis J., Thomas H., Sebel M., Shevchenko A. (2003) *Anal. Chem.*, **75**(6), 1300-1306.
21. Bien S., Ritter C.A., Kranz M., Scharf C., Steil L., Hummel M., Völker U., Cascorbi I., Kroemer H.K. (2004) *J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **42**(11), 640-641.
22. Wu Z., Jia X., de la Cruz L., Su X.C., Marzolf B., Troisch P., Zak D., Hamilton A., Whittle B., Yu D., Sheahan D., Bertram E., Aderem A., Otting G., Goodnow C.C., Hoyne G.F. (2008) *Immunity*, **29**, 863-875.
23. Robertson N., Potter C., Harris A.L. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 6160-6165.
24. Li X., Ding L., Xu Y., Wang Y., Ping Q. (2009) *Int. J. Pharm.*, **373**, 116-123.
25. Li L., Gong H., Yu H., Liu X., Liu Q., Yan G., Zhang Y., Lu H., Zou Y., Yang P. (2012) *J. Cell Biochem.*, **113**, 3788-3796.
26. Honoré B., Buus S., Claesson M.H. (2008) *Proteome Sci.*, **6**, 18.

Поступила: 19. 06. 2013.

**THE INFLUENCE OF DOXORUBICIN INCORPORATED IN PHOSPHOLIPID
DRUG DELIVERY NANOSYSTEM ON HEPG2 CELLS PROTEOME**

***K.G. Kuznetzova, E.V. Kazlas, T.I. Torkhovskaya, P.A. Karalkin, I.V. Vachrushev, T.S. Zakharova,
M.A. Sanzhakov, S.A. Moshkovskiy, O.M. Ipatova***

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: (499) 248-40-08, (499) 246-43-56; e-mail: torti@mail.ru

A phospholipid drug delivery nanosystem with particle size up to 30 nm elaborated at the Institute of Biomedical Chemistry has been used earlier for incorporation of doxorubicin (Doxolip). This system demonstrated higher antitumor effect in vivo as compared with free doxorubicin. In this study the effect of this nanosystem containing doxorubicin on HepG2 cell proteome has been investigated. Cells were incubated in a medium containing phospholipid nanoparticles (0.5 µg/ml doxorubicin, 10 µg/mL phosphatidylcholine). After incubation for 48 h their survival represented 10% as compared with untreated cells. Cell proteins were analyzed by quantitative two-dimensional gel electrophoresis followed by identification of differentially expressed proteins with MALDI-TOF mass spectrometry. The phospholipid transport nanosystem itself insignificantly influenced the cell proteome thus confirming previous data on its safety. Doxorubicin, as both free substance and Doxolip (i.e. included into phospholipid nanoparticles) induced changes in expression of 28 proteins. Among these proteins only four of them demonstrated different in response to the effect of the free drug substance and Doxolip. Doxolip exhibited a more pronounced effect on expression of certain proteins; the latter indirectly implies increased penetration of the drug substance (included into nanoparticles) into the tumor cells. Increased antitumor activity of doxorubicin included into phospholipid nanoparticles may be associated with more active increase of specific protein expression.

Key words: phospholipid nanoparticles, proteome, doxorubicin, HepG2 cells, MALDI-TOF mass spectrometry.