

Г. Бабаева¹, Е.В. Лукашева¹, Ж.Р. Черкасова², Е.М. Трещалина³,
Н.В. Андропова³, Г.А. Федчиков², С.А. Цуркан², А.Ю. Аринбасарова⁴, А.Г. Меденцев⁴

Возможность интернализации пероральной L-лизин- α -оксидазы в модели изолированного отрезка тонкой кишки крысы

¹Российский Университет Дружбы народов (РУДН), г. Москва,

²ООО «Джейвис Диагностикс», г. Москва,

³Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва,

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Фермент L-лизин- α -оксидаза (ЛО) проявляет значимое противоопухолевое действие при парентеральном применении и перспективен для клинического изучения, в т.ч., при колоректальном раке. Источником ЛО является микроскопический гриб *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai ВКМ F-4268D. Поскольку в литературе имеются данные о пероральном применении белков в терапевтических целях, целью работы было исследовать возможность такого пути введения для ЛО. Для этого использовали модифицированную модель «вывернутых мешочков» из изолированных отрезков тонкой кишки крысы. Меченый препарат — конъюгат ЛО с Акридином (ЛО-Акридин) вводили в среду инкубации, куда опускали «вывернутые» отрезки кишки. Через 30 минут из инкубационной среды и из отрезков кишки отбирали пробы, в которых определяли относительный уровень люминесценции стандартным методом флэш-люминесценции. Расчетная всасываемость ЛО-Акридина составила 11% на всю длину тонкого кишечника крысы. Исходя из оптимальной для мышей суммарной дозы ЛО 400 Е/кг при парентеральном введении, суммарная доза при пероральном введении была оценена как 4000 Е/кг. Таким образом, в работе было количественно охарактеризовано всасывание ЛО через стенку тонкой кишки крысы, доказана возможность ее перорального применения и рассчитана величина терапевтической дозы у мышей при пероральном пути введения.

Ключевые слова: L-лизин- α -оксидаза, Акридин, конъюгат фермента, тонкий кишечник крысы, интернализация белка

Введение

Известно, что при пероральном применении водорастворимые белковые макромолекулы, различные панкреатические ферменты, витамины

и другие нековалентные соединения способны проходить через стенку тонкого кишечника и проникать в кровь, т.е. интернализироваться. Как правило, всасывание таких агентов происходит через слизистую оболочку верхнего отдела тонкой кишки посредством пиноцитоза. После прохождения через слизистую оболочку кишечника белковый препарат попадает в лимфоидный аппарат кишечника, затем в венозный кровоток и в последнюю очередь — в артериальную кровь [3, 11-13]. Наиболее важным этапом всасывания вещества является его абсорбция, т.е. поглощение энтероцитами, которая определяется двумя основными параметрами — растворимостью лекарства и его проницаемостью для областей желудочно-кишечного тракта, где происходит его абсорбция [9]. Таким образом, прохождение препарата через стенку кишки, которое можно определить при помощи люминесцентной метки в сигнальной части агента служит доказательством его успешной интернализации [2].

Антипролиферативные свойства L-лизин- α -оксидазы (ЛО) *in vivo* при парентеральном введении, позволяющие считать этот ферментный препарат перспективным для клинического применения, например, при колоректальном раке, известны давно [5, 7, 8, 10]. Производство стандартной субстанции белка из микроскопического гриба для внутривенного введения является сложной задачей. Поскольку в литературе содержатся данные о пероральном применении белков в терапевтических целях, представляется перспективным исследовать возможность такого пути введения для ЛО. В настоящей работе было решено использовать меченую акридином ЛО для оценки ее проникновения через стенку тонкой кишки крысы. Количественный контроль всасывания комплекса ЛО с люминесцентным Акридином в организм через стенку тонкой кишки позволит не только доказать возможность адсорбции ЛО, но и поможет рассчитать величину терапевтической дозы для перорального введения.

Цель исследования: определение способности L-лизин- α -оксидазы всасываться в тонкой кишке и интернализироваться в организм.

Задачи:

1. Получение конъюгата ЛО-Акридин и подготовка изолированных отрезков тонкой кишки крыс к исследованию.

2. Определение относительного уровня люминесценции (RLU) ЛО-Акридин в пробах жидкости из изолированных отрезков тонкой кишки методом импульсной флэш-хемилюминесценции.

3. Анализ полученных данных.

Материалы и методы

Животные. Исследование выполнено на здоровых половозрелых крысах-самках массой тела 150-200 г из питомника «Крюково», которых содержали в отделе лабораторных животных НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава РФ (НМИЦ) при конвенциональных условиях.

Подготовка изолированных отрезков тонкой кишки крысы. Четыре изолированных отрезка тонкой (тощей) кишки длиной 3-4 см приготовлены с помощью модифицированного нами метода [1]. Для взятия материала животных наркотизировали зоветилом, после чего их умерщвляли передозировкой эфирного наркоза. Трупы умерщвленных особей кремировали в специализированном подразделении НМИЦ [6].

Исследуемый препарат. Ферментный препарат L-лизин- α -оксидаза MM 115-120 кДа (ЛО) катализирует реакцию окислительного дезаминирования L-лизина с образованием пероксида водорода, аммиака и α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты. ЛО охарактеризована химически и биохимически и оценена как перспективный парентеральный противоопухолевый препарат. Гидролитические ферменты трипсин и химотрипсин не оказывают протеолитического действия на ЛО, это связано со специфичным строением молекулы и свидетельствует об устойчивости к ферментативному расщеплению пептидных связей, в частности, в желудочно-кишечном канале [4,14]. Для исследований готовили конъюгат ЛО с люминесцентным Акридином (ЛО-Акридин), который добавляли в инкубационную среду в концентрации 23 мкг/мл.

Получение конъюгата ЛО-Акридин. К 1 мл раствора ЛО в 10 мМ фосфатно-солевом буфере (4,6 мг/мл — концентрация белка определена по стандартной методике Брэдфорда) добавляли 100 мкл ДМСО (10% ДМСО необходим для поддержания Акридина в растворе) и 21 мкл раствора (5 мг/мл) Акридин NHS-эфир в ДМСО («Toronto Research Chemicals Inc.», Canada) — итоговая концентрация $2,2 \times 10^{-4}$ М [1]. Смесь выдерживали в темной пробирке в течение ночи. Полученный конъюгат ЛО-Акридин при постоянном перемешивании подвергали диализу против двух смен по 5,0 л 10 мМ фосфатно-солевого буфера с использованием *CelluSep*[®] пористых мембранных диализных мешков из регенерированной целлюлозы с MWCO 12,000-14,000 d=25 мм («Membrane Filtration Products, Inc.», Canada).

Определение способности к всасыванию агента в тонкой кишке. В инкубационную среду добавляли ЛО-Акридин до итоговой концентрации 23 мкг/мл. Через 30 мин из инкубационной среды отбирали пробу 0,2 мл для определения значения оставшегося люминесцентного сигнала растворенного конъюгата. Затем «вывернутые» отрезки извлекали из инкубационной среды, трехкрат-

но отмывали в 0,5 л теплого раствора Рингера-Локка от остаточных количеств метки на поверхности кишки под контролем люминесценции. На дистальном конце каждого отмытого отрезка кишки атравматичным металлическим зондом через короткий полунадрез выбирали пробу жидкости в объеме до 0,2 мл, которую подвергали люминесцентному контролю. В качестве контролей использованы уровни неспецифической люминесценции образцов инкубационной среды без тестового соединения, пробы жидкости, взятой из внутренней части вывернутой тонкой кишки и образцы смывов со стенки отрезка кишки, которые переносили в лунки 96-луночного черного планшета для исследования люминесценции. Для оценки трансэпителиального переноса люминесцентных конъюгатов через тонкую кишку крысы использовали хемилюминесцентный анализ образцов жидкости на флэш-хемилюминометре Glomax96 («Promega», США). Образцы помещали в дубликатах в лунки черного 96-луночного микропланшета для люминесценции, добавляли 50 мкл раствора преактиватора. Затем планшет с образцами помещали в прибор, который считывал производимый образцами люминесцентный сигнал. Уровень люминесценции конъюгата ЛО-Акридин в полученных пробах определяли в относительных световых единицах (*relative light units*, RLU), одна единица RLU равна одному фентомолю (10–15 М) АТФ.

Результаты

Показано (табл. 1), что неспецифическая люминесценция инкубационной среды без метки предельно мала: уровень люминесценции 6 RLU не может существенно влиять на результаты тестирования. Уровень люминесцентного сигнала в инкубационной среде через 30 минут после внесения конъюгата ЛО-Акридин при итоговой концентрации раствора 23 мкг/мл составил 814590 RLU. Трехкратная отмывка отрезка кишки от метки дает фоновый уровень люминесценции 39 RLU, это позволило пренебречь ею. В просвете «вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции составлял от 2500 до 3500 RLU. Рассчитанная удельная всасываемость конъюгата ЛО-Акридин (23 мкг/мл) на 1 см каждого отрезка тонкой кишки составила 0,1%, а для всей тонкой кишки крысы длиной 110 см — 11%.

Полученные данные дают возможность считать, что меченный акридином фермент ЛО, добавленный в инкубационную среду, способен всасываться в тонкой кишке крысы *in vivo* в течение физиологически адекватного времени в достаточно высокой концентрации, достигающей 11% при пересчете на весь отрезок кишки с учетом используемой концентрации белка. Расчетные величины являются ориентировочными, т.к. получены без учета кровоснабжения и моторики органа. Тем не менее, они дают возможность оценить величину терапевтической дозировки фермента для перорального введения. Исходя из оптимальной для мышей суммарной дозы ЛО 400 Е/кг при парентеральном введении, суммарная доза при перораль-

Таблица 1. Результаты тестирования люминесцентного сигнала через 30 минут после добавления 23 мкг/мл конъюгата ЛО-Акридин в инкубационную среду

№ пробы	Образец	Суммарное значение люминесценции, RLU*	
1.	Инкубационная среда**	814590	
2.	Смыв наружной поверхности отрезка кишки***	39	
3.	Фон неспецифического сигнала	6	
4.	Жидкость из отрезка тонкой кишки через 30 мин после добавления метки в инкубационную среду	№1	2530
5.		№2	3440
6.		№3	3020
7.		№4	3540

Примечания:

*RLU (relative light units) — относительные световые единицы, 1 ед. RLU =1 фемтомоль (10⁻¹⁵ М) АТФ;

**Раствор Рингера-Локка, содержащий конъюгат ЛО-Акридин

***После 3-кратной отмывки от метки

ном введении должна быть в 8,9 раз больше, т.е. достигать 4000 Е/кг. Учитывая кумулятивный механизм лимитирующей токсичность парентерального фермента, целесообразно использовать рекомендованный ранее для клинических испытаний дискретный режим введения с удвоенной первой дозой и интервалом между введениями 48 часов [14].

Заключение

Исследование посвящено изучению способности конъюгата — меченного акридином противопухолевого фермента ЛО всасываться в просвет изолированного «вывернутого» отрезка тонкой кишки крысы из инкубационной среды, т.е. интернализироваться в организм. Уровень люминесценции в инкубационной среде через 30 мин после добавления ЛО-Акридин достаточно высок и составляет 814590 RLU. В просвете «вывернутых» отрезков тонкой кишки уровень люминесценции составлял 2500-3500 RLU. Полученные данные позволяют считать, что в течение 30 минут в тонкую кишку крысы поступает около 11% от введенного количества меченного акридином конъюгата, что свидетельствует о его способности всасываться в кишечнике при пероральном введении, т.е. интернализироваться. Исходя из определенной ранее оптимальной для мышей суммарной терапевтической дозы ЛО 400 Е/кг при парентеральном введении, можно оценить, что при пероральном введении суммарная доза должна быть в 8,9 раз больше, т.е. достигать 4000 Е/кг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

ЛИТЕРАТУРА

1. Андропова Н.В., Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А. и др. Оценка интернализации АФП-содержащего некова-

лентного комплекса аимпила в модели изолированного отрезка тонкой кишки крыс // Российский онкологический журнал. — 2016. — Т. 21. — №. 6. — С. 308-311.

2. Бурмакин М.В., Селиверстова Е.В., Наточин Ю.В. Накопление желтого флуоресцентного белка в почке после его всасывания в кишечнике крыс // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. — 2005. — Т. 91. — №. 10. — С. 1195-1204.

3. Ершов К.И., Серяпина А.А. Исследование особенностей биодоступности ферментного препарата тромбовазим из тощей кишки крыс // Медицина и образование в Сибири. — 2013. — №. 4. ISSN 1818-7943. — http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1060.

4. Лукашева Е.В, Ефремова А.А., Трещалина Е.М. и др. Оксидазы L-аминокислот: свойства и молекулярные механизмы биологического действия // Биомедицинская химия. — 2012. — Т. 58. — №. 4. — С. 372-384.

5. Лукашева Е.В., Покровский В.С., Трещалина Е.М. Биологические эффекты и молекулярные механизмы действия оксидаз L-аминокислот. — Москва: Российский университет дружбы народов, 2016. — С. 199.

6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / под ред. А.Н.Миронова. — М.: Гриф иК, 2012. — 966 с.

7. Способ получения субстанции L-лизин-альфа-оксидазы // Патент №2471866. 2013. Бюл. № 1. / Березов Т.Т., Лукашева Е.В., Трещалина Е.М. и др. <http://www.freepatent.ru/patents/2471866>.

8. Способ лечения рака толстой кишки // Патент №2529831. 2014. Бюл. № 27. / Березов Т.Т., Лукашева Е.В., Трещалина Е.М. и др. <http://www.freepatent.ru/patents/2529831>.

9. Artursson P., Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells // Biochemical and biophysical research communications. — 1991. — Vol. 175. — №. 3. — P. 880-885.

10. Arinbasarova A.Y, Ashin, V.V., Makrushin, K.V. et al. Isolation and properties of L-lysine- α -oxidase from the fungus *Trichoderma cf. aureoviride* RIFAI VKM F-4268D // Microbiology. — 2012. — Vol. 81. — №. 5. — P. 549-554.

11. Cloutier M., Gingras D., Bendayan M. Internalization and transcytosis of pancreatic enzymes by the intestinal mucosa // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. — 2006. — Vol. 54. — №. 7. — P. 781-794. .

12. Christie D.A., Tansey T., Tansey E.M. Intestinal absorption // London: The Wellcome Trust. — 2000. — Vol. 8. — P. 81.
13. Legen I., Kristl A. d-Glucose Triggers Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP)-Mediated Secretion of Fluorescein Across Rat Jejunum in Vitro // Pharmaceutical research. — 2004. — Vol. 21. — №. 4. — P. 635-640.
14. Pokrovsky V.S, Treshalina, H.M., Lukasheva E.V. et al. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine α -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D // Anti-cancer drugs. — 2013. — Vol. 24. — №. 8. — P. 846-851.

Поступила в редакцию 20.11.2018 г.

*G. Babayeva¹, E.V. Lukasheva¹, J.R. Tcherkassova²,
H.M. Treshalina³, N.V. Andronova³,
G.A. Fedchikov², S.A. Tsurkan², A.Yu. Arinbasarova⁴,
A.G. Medentzev⁴*

Possibility of orally administered l-lysine- α -oxidase internalization in the model of isolated cut of rat small intestine

¹Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6 Miklukho-Maklaya Street, Moscow,

²«JVS Diagnostics LLC». Skolkovo Innovation Center, Moscow,

³FSBI «National Medical Research Center of Oncology of N.N. Blokhin» Ministry of Health of Russia, Moscow,

⁴G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino

Enzyme L-lysine α -oxidase (LO) exhibits significant antitumor effects by parenteral administration and is promising for clinical trials, particularly in the case of colorectal cancer. The fungi *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKM F-4268D is a source of LO. Since there is evidence in the literature of oral use of proteins for therapeutic purposes, it seemed promising to investigate the possibility of such administration route for LO. The goal of the work was to determine the ability of LO to be internalized by the rat small intestine. LO was labeled by Acridinium (LO-Acridinium). Experiments were performed on the rat model using isolated inverted segments of small intestine. The inverted segments were immersed into incubation medium, containing LO-Acridinium. After 30 minutes the samples were taken from the incubation medium and from the intestine segments and relative luminescence was determined by standard flash luminescence method. The amount of absorbed LO-Acridinium was estimated to be 11% for the entire length of the small rat intestine. Based on the optimal total parenteral dose of 400 U/kg for mice the total dose when administered orally was estimated as 4000 U/kg. The absorption of LO through the wall of the rat small intestine was quantitatively characterized, the possibility of its oral administration was proved, and the oral therapeutic dose for mice was estimated.

Key words: L-lysine α -oxidase, Acridinium, enzyme conjugate, rat small intestine, protein internalization