

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА «ВИНКРИСТИН» С СЫВОРОТКОЙ КРОВИ

© 2016 г. В.С. Маряхина, О.А. Строкова*

Оренбургский государственный университет, 460018, Оренбург, пр. Победы, 13;

**Оренбургская государственная медицинская академия, 460005, Оренбург, ул. Советская, 6*

E-mail: v.s.maryakhina@gmail.com

Поступила в редакцию 31.03.15 г.

После доработки 18.09.15 г.

Представлены результаты по исследованию взаимодействия фармацевтического противоопухолевого препарата «Винкристин» с сывороткой крови. Показано, что с ростом концентрации препарата происходит уменьшение коэффициента экстинкции раствора сыворотки крови. Изменение концентрации препарата приводит также к трансформации и спектров его флуоресценции: увеличение свечения винкристина в сыворотке крови на 314 нм и на 334 нм, что может быть результатом конформационных изменений в молекуле винкристина после его взаимодействия с белками крови. В то же время флуоресценция на 360 нм, которая может быть объяснена свечением ароматического кольца винкристина, не претерпевает изменений с увеличением дозы препарата. Полученные результаты могут быть полезны в медицине для дальнейшего изучения антимиотической активности «Винкристина» и подбора дозы других фармакологических препаратов во время лечения.

Ключевые слова: винкристин, сыворотка крови, флуоресценция.

Онкологические заболевания являются одними из наиболее распространенных во всем мире. Большое многообразие форм раковых опухолей и их локализаций стимулирует создание новых фармакологических препаратов и разработку их легкоусвояемых форм. При этом даже после начала использования препарата некоторые вопросы по его влиянию на другие органы и кровеносную систему остаются не изученными. Одним из таких фармакологических препаратов является «Винкристин». Несмотря на его активное использование во время лечения злокачественных образований, остаются неясными некоторые процессы, происходящие в крови сразу после его внутривенного введения. Для изучения этих процессов могут быть использованы спектральные методы, благодаря их высокой чувствительности. Многообразие возможных подходов в использовании методов молекулярной спектроскопии позволяет обнаружить возможные конформационные и концентрационные изменения веществ в исследуемых растворах, что может оказать влияние на подбор дозы препарата и его связывание с компонентами сыворотки.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение особенностей взаимодействия «Винкристина» с сывороткой крови спектраль-

ными методами при различных концентрациях препарата.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования нами был использован фармацевтический препарат «Винкристин» («Vegopharm», Россия), представляющий собой прозрачный бесцветный водный раствор сульфата винкристина с исходной концентрацией 1 мг/мл и вспомогательное вещество маннитол. В процессе исследования использовались различные концентрации водного раствора препарата, приготовленные путем последовательного разбавления исходного раствора дистиллированной водой.

Помимо водных растворов, в отдельных сериях экспериментов в качестве растворителя использовали сыворотку крови добровольцев, полученную путем центрифугирования крови при 2000 об/мин в течение 10 мин. Сыворотку подвергали быстрой заморозке и хранили при минус 20°C не более двух месяцев. Для каждого эксперимента использовали только свежерозмороженную сыворотку. Поскольку сыворотка представляет собой смесь белков, углеводов и других биологических веществ, она является оптически плотной и проведение экспериментов не представляется возможным. Поэтому для

спектральных измерений свежеразмороженную сыворотку крови предварительно разбавляли фосфатным буферным раствором (рН 7,4) до тех пор, пока она не начинала пропускать свет с длиной волны менее 240 нм.

Спектрофотометрия. Спектральные свойства препарата «Винкристин» изучали на спектрофлуориметре SOLAR CM-2203, работающем в фотометрическом режиме. Измерения спектров поглощения растворов препарата проводили относительно растворителя, в качестве которого брали дистиллированную воду или предварительно разбавленную сыворотку крови. Измерения проводили при комнатной температуре и при 37°C.

Спектрофлуориметрия. Для измерения спектров флуоресценции препарата «Винкристин» использовали те же растворы, что и для спектрофотометрии. Во время измерений флуоресценции длина волны возбуждения составляла 270 нм. Регистрацию свечения проводили в области от 300 до 500 нм. Растворы были приготовлены так же, как и для фотометрии. Все измерения флуоресценции проводили при температуре 37°C на спектрофлуориметре SOLAR CM-2203, работающем во флуориметрическом режиме. Для получения воспроизводимости результатов была использована сыворотка крови не менее чем 20 добровольцев для каждой серии измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

«Винкристин» (Vincristine) – это фармацевтический противоопухолевый препарат, относящийся к группе алкалоидов и обладающий выраженной цитостатической активностью [1]. Наличие большого количества двойных связей, азота и ароматического кольца в структуре молекулы дает возможность образованию межмолекулярных химических связей по донорно-акцепторному механизму.

На рис. 1а представлены спектры поглощения водных растворов препарата «Винкристин» при комнатной температуре. Спектры поглощения имеют два максимума: на 260 и 298 нм. При этом две составляющие спектра не полностью разрешены и имеют частичное перекрытие между собой. Можно заметить, что при разбавлении происходит уменьшение оптической плотности растворов. Однако уменьшение происходит не пропорционально концентрации. Это хорошо заметно на спектрах, нормированных на второй максимум 298 нм (рис. 1б). Приведенная на рис. 1 закономерность демонстрирует отклонение от закона Бугера–Ламберта–Бера. Она подтверждается и расче-

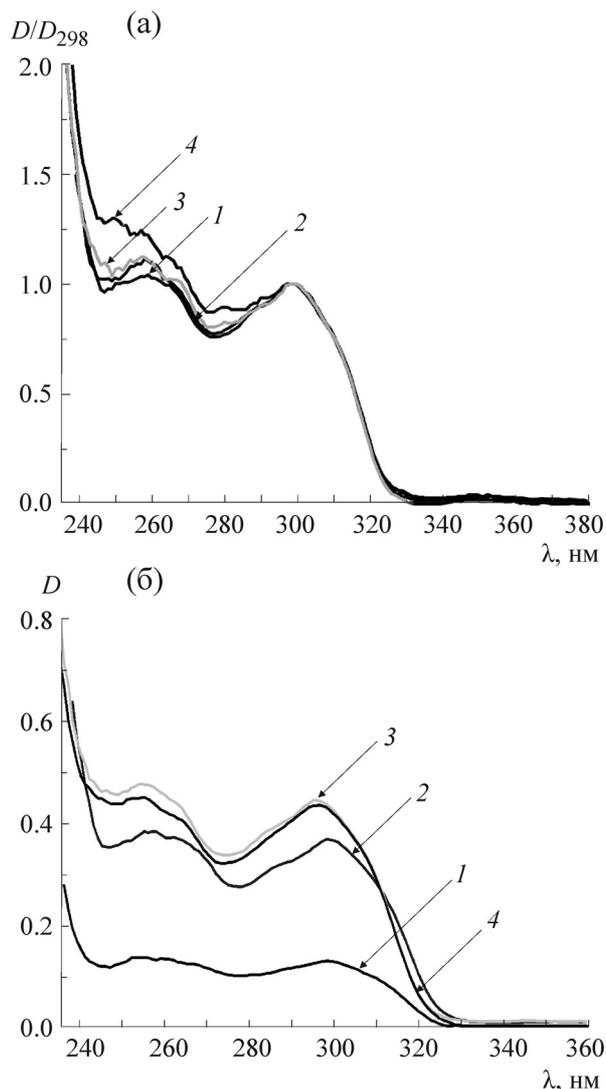


Рис. 1. Нормированные (а) и экспериментально полученные (б) спектры поглощения препарата «Винкристин» в водном растворе при комнатной температуре. Концентрация раствора сульфата винкристина: 1 – 0,025 мг/мл, 2 – 0,0125 мг/мл, 3 – 0,00625 мг/мл, 4 – 0,003125 мг/мл.

том коэффициента экстинкции. В табл. 1 представлены результаты расчетов. Можно заметить, что с изменением концентрации раствора

Таблица 1. Коэффициент экстинкции водных растворов препарата «Винкристин» при комнатной температуре

C , мг/мл	ϵ_{260} , $M^{-1}cm^{-1}$	ϵ_{298} , $M^{-1}cm^{-1}$
0,025	27176	24307
0,0125	23939	22059
0,00625	21807	20759
0,003125	20574	19676

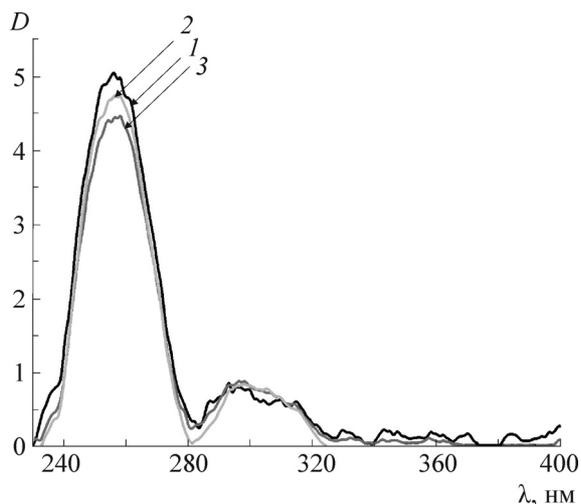


Рис. 2. Нормированные спектры поглощения препарата «Винкрестин» в сыворотке крови при температуре 37°C. Концентрация препарата в растворе: 1 – 0,00244 мг/мл, 2 – 0,00476 мг/мл, 3 – 0,00698 мг/мл.

происходит изменение его коэффициента экстинкции на 32% при длине волны 260 нм и на 23,5% при длине волны 298 нм. Однако при повышении температуры до 37°C отклонение от закона Бугера–Ламберта–Бера нами не наблюдалось. Нормированные спектры поглощения имели такую же форму, что и при комнатной температуре, и были полностью идентичны при всех выбранных концентрациях. Коэффициент экстинкции растворов составил $21944 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. При этом интенсивность максимумов на двух выбранных длинах волн приблизительно одинаковая при двух выбранных температурах. Полученные результаты согласуются с полученными ранее в подобных экспериментах [2]. Погрешность измерений во всех экспериментах не превышала 20%, что свидетельствует о достоверности полученных данных.

Известно [3], что при длине волны 300 нм поглощение обусловлено преимущественно наличием нескольких ароматических колец, а при 260 нм – карбоксильной группой. Разбавление растворов приводит к увеличению количества

Таблица 2. Коэффициент экстинкции растворов препарата «Винкрестин» при температуре 37°C в сыворотке крови

C , мг/мл	ϵ_{260} , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	ϵ_{298} , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
0,00698	56535	12771
0,00476	64150	14267
0,00244	70834	15307

молекул воды в растворе и более вероятному образованию водородных связей между молекулами винкрестина и воды. Этим может быть обусловлен нелинейный рост максимума на 260 нм в спектрах поглощения. При температуре 37°C количество водородных связей невелико в виду малой энергии их связи, поэтому отклонение от закона Бугера–Ламберта–Бера не наблюдается при повышении температуры. Отметим, что полученные закономерности относятся только к действующему веществу препарата «Винкрестин». Вспомогательное вещество маннитол относится к классу алифатических спиртов и поглощает в области 220 нм [4], что находится за пределами указанного диапазона длин волн. Формы спектров поглощения препарата согласуются с результатами других научных групп [5,6].

Разведение раствора препарата в сыворотке крови приводит к сильному изменению спектров поглощения и увеличению коэффициента экстинкции (см. рис. 2). Во-первых, первый и второй максимумы спектров поглощения хорошо разрешены между собой. При этом заметен сдвиг максимумов в коротковолновую область (на 255 и 295 нм) по сравнению со спектрами поглощения водных растворов винкрестина.

Другое значительное отличие в спектрах поглощения – это интенсивность максимумов. Поглощение первого максимума превышает таковое второго максимума приблизительно в пять раз. Коэффициенты экстинкции также различаются с ростом концентрации препарата в растворе сыворотки. Отличия менее значительны и составляют приблизительно 20% для двух максимумов поглощения. Однако с ростом концентрации коэффициент экстинкции уменьшается в отличие от водных растворов. Результаты расчетов коэффициентов экстинкции исследуемого препарата в сыворотке крови представлены в табл. 2.

Высокий коэффициент экстинкции и длины волн максимумов спектров поглощения позволяют сделать вывод о том, что поглощение винкрестина в сыворотке крови обусловлено преимущественно карбоксильными группами, входящими в состав его структуры [3].

В отличие от водных сред винкрестин флуоресцирует в биологических растворах, в том числе и в сыворотке крови. В водном растворе флуоресценция винкрестина не была обнаружена нами и другими научными группами [7].

Спектры флуоресценции винкрестина в сыворотке крови при различных его концентрациях представлены на рис. 3.

Как видно из рисунка, спектр имеет несколько максимумов. В качестве контроля измеряли

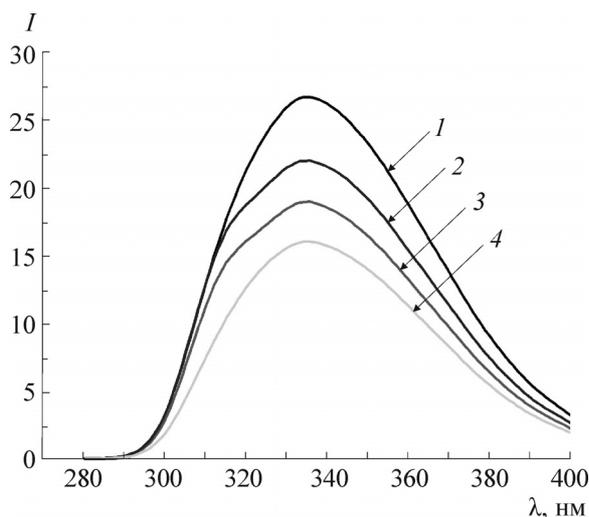


Рис. 3. Спектры флуоресценции препарата «Винкристин» в сыворотке крови при температуре 37°C. Концентрация препарата в сыворотке: 1 – 0,0122 мг/мл, 2 – 0,0244 мг/мл, 3 – 0,0366 мг/мл, 4 – сыворотка без винкристина. Представлены среднестатистические данные по 20 экспериментам.

спектр флуоресценции сыворотки крови без винкристина, поскольку вещества, содержащиеся в сыворотке, тоже могут флуоресцировать [8]. В результате разложения на составляющие спектра флуоресценции винкристина в сыворотке методом гауссово-лоренцевых кривых было получено, что спектр флуоресценции сыворотки крови имеет две составляющих, максимумы которых расположены на 327 и 352 нм. Тушение флуоресценции винкристина в сывороточном альбумине человека было отмечено также в работе [9].

В сыворотке крови существует ограниченное количество флуоресцирующих веществ. Учитывая большое количество белков в сыворотке крови и связывание с ними препарата, можно предположить, что спектр свечения сыворотки является суммой свечения входящих в состав белков аминокислот триптофана при длине волны 350 нм и тирозина при 320 нм [8]. Логично предположить, что истинный спектр флуоресценции винкристина может быть получен путем вычисления разности двух спектров согласно выражению

$$I^B(\lambda) = I^{\text{sum}}(\lambda) - I^{\text{сыв}}(\lambda),$$

где $I^B(\lambda)$ – итоговый спектр флуоресценции винкристина, $I^{\text{sum}}(\lambda)$ – экспериментально полученный спектр флуоресценции винкристина в сыворотке крови, $I^{\text{сыв}}(\lambda)$ – спектр флуоресценции чистой сыворотки крови.

На рис. 4 показан результат применения такого подхода. Отчетливо заметно, что ре-

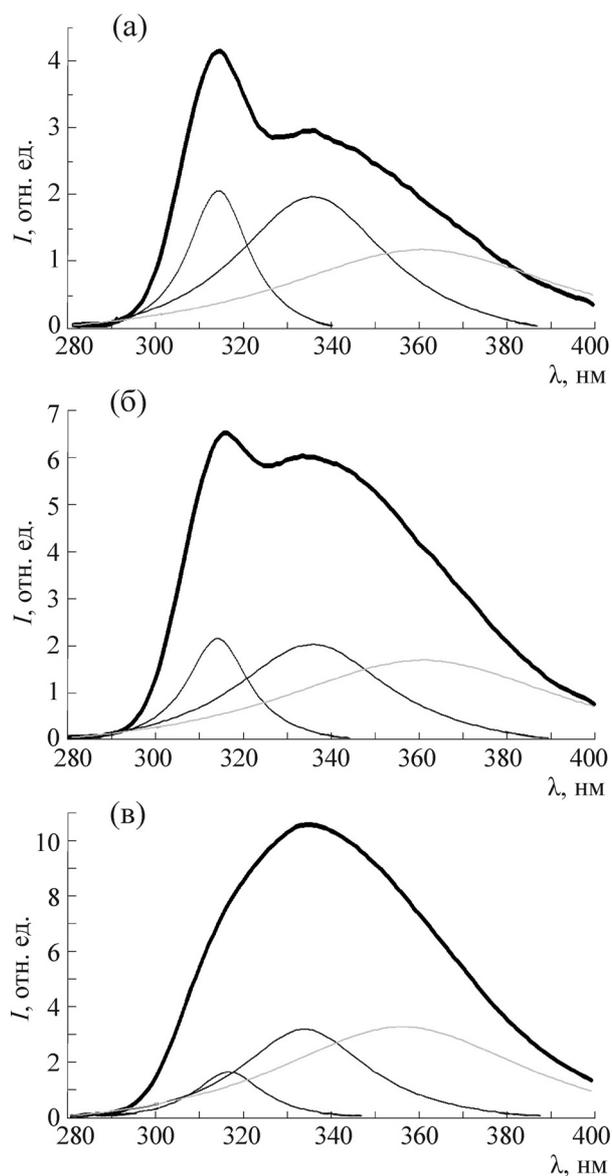


Рис. 4. Результат разложения на составляющие разности спектров флуоресценции сыворотки крови и винкристина, растворенного в ней, при температуре 37°C. Концентрация препарата в сыворотке: 1 – 0,0366 мг/мл, 2 – 0,0244 мг/мл, 3 – 0,0122 мг/мл.

зультирующие спектры также имеют сложную форму. На первый взгляд может показаться, что спектры имеют два максимума. Однако разложение спектра на две составляющие не приводит к удовлетворительному результату. Результат разложения на три составляющие приведен на рис. 4. Максимумы составляющих спектров находятся на 314, 334 и 360 нм. С увеличением дозы препарата происходит увеличение свечения при длинах волн 314 и 334 нм. В то же время свечение при длине волн 360 нм не претерпевает значительных изменений.

Мы полагаем, что полученные закономерности могут быть связаны с взаимодействием винкристина с белками крови [2]. В результате мы наблюдаем рост свечения при длинах волн 314 и 334 нм, что можно отнести к карбоксильным группам винкристина в растворе. При связывании препарата с белками крови происходит смещение электронной плотности, приводящее к усилению флуоресценции карбоксильных групп, входящих в состав препарата. Максимум составляющей спектра флуоресценции на 360 нм можно отнести к свечению ароматических групп молекулы винкристина [10]. Ввиду наличия прочной структуры из шести π -электронов ароматического кольца, взаимодействие их с веществами сыворотки крови затруднено, поэтому не происходит значительного изменения свечения на 360 нм при увеличении дозы препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование фармакологического препарата обычно основано на его взаимодействии с биологическими объектами, которое может сильно отличаться при различной дозировке. Увеличение начальной концентрации раствора препарата может способствовать образованию в его составе ассоциатов молекул или различным конформационным внутримолекулярным изменениям. В данной работе показаны происходящие внутримолекулярные конформации в препарате «Винкрестин» при изменении его начальной концентрации. Нелинейные зависимости интенсивности поглощения и флуоресценции на одной длине волны от концентрации препарата свидетельствуют о наличии дозозависимых процессов взаимодействия препарата с белками крови.

Полученные результаты могут быть полезны в медицине для дальнейшего изучения антимитотической активности «Винкристина» и подбора дозы других фармакологических препаратов во время лечения.

Авторы выражают благодарность профессору В.А. Намиоту за обсуждение результатов и А.С. Тихоновой за помощь в выполнении работы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 14-01-31081 мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. H. Gieringer, A. F. Wenz, H. M. Just, and F. D. Daschner, *Chemotherapy* **32**, 418 (1986).
2. S. V. Prakash and S. N. Timasheff, *J. Biol. Chem.* **258**, 1689 (1983).
3. *Органические фотохромы*, под ред. А. В. Ельцова (Химия, Л., 1982).
4. H. W. Dibbern, R. M. Muller, and E. Wirbitzki, *UV and IR Spectra: pharmaceutical substances* (Aulendorf: Editio Canto Verlag, 2002).
5. Bh. P. Kamat and J. Seetharamappa, *J. Chem. Sci.* **117**, 649 (2005).
6. Ch. Granzow, M. Kopun, and T. Kroner, *Cancer Res.* **55**, 4837 (1995).
7. A. S. Rodrigues, A. R. Lopes, A. Lero, et al., *J. Chromatographic Sci.* **47**, 387 (2009).
8. *Оптическая биомедицинская диагностика*, под ред. В. В. Тучина (Физматлит, М., 2007), т. 1.
9. K. H. Chen, X. F. Zheng, and M. Guo, *Acta Chim. Sinica* **65**, 1887 (2007).
10. J. Lakovich, *Basics of fluorescence spectroscopy* (Acad. Press, New York, 1986).

Peculiarities of Interaction between Vincristine and Blood Serum

V.S. Maryakhina* and O.A. Strokova**

*Orenburg State University, prosp. Pobedy 13, Orenburg, 460018 Russia

**Orenburg State Medical Academy, ul. Sovetskaya 6, Orenburg, 460005 Russia

The results of the study of interaction between vincristine, a pharmaceutical anti-cancer drug, and blood serum are represented. It is shown that an elevation in drug concentration is associated with a concomitant decrease in the extinction coefficient of the solute from blood serum. As the drug concentration changes, its fluorescence spectra transform; the fluorescence peak with vincristine in blood serum is shifted to 314 and 334 nm. It can be the result of conformational changes in vincristine molecule after vincristine-blood protein interaction. At the same time, fluorescence peak at 360 nm, which can be explained by the fluorescence emission of the aromatic ring of vincristine, remains at the same level after an increase in a drug dose. The obtained results can be useful in medicine for further investigation of antimitotic activity of vincristine and test dosing of other pharmacological preparations at therapy.

Key words: vincristine, blood serum, fluorescence