

СОРБЦІЯ МЕТОТРЕКСАТА ТЕНЯМИ ЭРИТРОЦИТОВ

О. И. Доценко

Изучено взаимодействие метотрексата с нативными тенями эритроцитов и их белок-липидным матриксом (периферические белки экстрагированы). Рассчитаны параметры связывания. Установлено, что связывание метотрексата с мембраной эритроцитов определяется взаимодействием с тремя структурными участками. Показано влияние электрохимических и поверхностных свойств теней эритроцитов на параметры связывания метотрексата.

Ключевые слова: тени эритроцитов, метотрексат, константы связывания.

Введение. Метотрексат – цитостатический препарат из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты. Оказывает выраженное иммуносупрессивное действие даже в относительно низких дозах, не обладающих заметной гематологической токсичностью. Благодаря этому метотрексат применяется шире, чем другие цитостатики с иммуносупрессивной активностью [1-3]. Наряду с этим, назначение метотрексата часто сопровождается возникновением серьезных побочных эффектов, что обуславливает отказ от использования этого препарата [1, 3, 4].

Почти все лекарственные препараты, распределяющиеся между тканями и органами организма через систему кровообращения, вступают в контакт с форменными элементами крови. Известно, что метотрексат (МТХ) накапливается в эритроцитах в виде полиглутамата МТХ и его концентрация достигает устойчивого стационарного состояния после нескольких недель введения препарата [1]. Известно также, что существуют большие индивидуальные различия в ответ на терапию МТХ [5]. Как только МТХ транспортируется в клетку, он прогрессивно добавляется к полиглутаматам МТХ (МТХ-РG₂₋₇) фолиполиглутамил синтазой (FPGS) и сохраняется в клетке в течение долгого времени. С другой стороны, МТХ-РG₂₋₇ преобразуется назад в МТХ γ -глутамил гидролазой (GGH), после чего он транспортируется во внеклеточную среду. Поэтому, внутриклеточный МТХ-РG₂₋₇ может быть основным веществом, посредством которого МТХ проявляет терапевтический эффект [1, 5]. Таким образом, контроль содержания МТХ в эритроцитах, отражающего концентрации МТХ-РG в целевых клетках, таких как мононуклеарные клетки, лимфоциты, или синовиальные клетки, мог бы быть полезным в подборе оптимальной дозы МТХ для больных с различными патологиями. В этом случае несомненную ценность может представлять информация о характере связывания МТХ с компонентами мембраны эритроцитов и влиянии на параметры связывания электрохимических свойств белок-липидного матрикса. Изучению этих вопросов и посвящена данная статья.

Материалы и методы исследований. В экспериментах использовали кровь белых беспородных мышей. Эритроциты отделяли от других форменных элементов крови по общепринятым методикам и тщательно отмывали в большом объеме изотонического буфера (ИБ) (15 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,4; 150 мМ NaCl) путем центрифугирования.

Для анализа процесса сорбции МТХ на мембранах эритроцитов в работе использовали нативные замкнутые тени эритроцитов и тени эритроцитов, с которых были предварительно экстрагированы периферические белки.

Замкнутые тени эритроцитов получали путём быстрого введения 10 мМ Na-K-фосфатного буфера, рН 7,4 в суспензию эритроцитов. Тени эритроцитов отмывали 3-4 раза изотоническим буфером с последующим центрифугированием. Осадок теней ресуспендировали в ИБ.

Для экстракции периферических белков [6] к осадку теней добавляли 1М раствор KCl, рН 9,0 и при непрерывном встряхивании инкубировали 1 час при 37°C. Затем суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отделяли надосадочную жидкость, а оставшийся осадок теней промывали ИБ, с последующим центрифугированием. Суспензию теней доводили до нужного объема ИБ и использовали в эксперименте.

Общее содержание белка определяли содержанием белка по методу Лоури [7]. Содержание белка рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по растворам альбумина известной концентрации. Концентрация альбумина в стандартных растворах альбумина варьировала от $5,9 \cdot 10^{-5}$ – $8,85 \cdot 10^{-4}$ г/дл.

Для изучения взаимодействия метотрексата с мембраной эритроцитов использовали суспензию теней эритроцитов с содержанием белка 0,25 г/л. Аликвотную часть суспензии (0,2 мл) инкубировали в растворах, с различными концентрациями МТХ в течение 10 минут. Концентрацию метотрексата варьировали от $1,84 \cdot 10^{-5}$ до $1,84 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Объём всех точек серии поддерживался постоянным и равным 5,2 мл. До общего объёма растворы доводились добавлением ИБ. Время инкубирования в экспериментах составило 10 мин. Мембраны осаждали центрифугированием и в супернатанте определяли концентрацию МТХ, соответствующую равновесной концентрации несвязанного мембранами лиганда. Несвязанную концентрацию МТХ определяли на спектрофотометрически ($\lambda = 400$ нм). Эксперименты были вы-

полнены при двух температурах – 25 и 37°C.

Изотермы связывания строили в координатах: связанная концентрация– исходная концентрация метотрексата (моль/г-белка).

Для определения количества центров связывания различных типов и расчета констант связывания для молекул МТХ мембраной эритроцитов и белок–липидным матриксом использовали математическое моделирование. Параметры связывания молекул метотрексата с мембраной эритроцитов определяли исходя из предположения возможного кооперативного связывания, используя подход Хилла.

Уравнение материального баланса для МТХ представляли в виде

$$L_{общ.L} = L + \sum_{j=1}^m (v_{j1} + v_{j2}) \cdot N_j, \quad (1)$$

где N_j – общая концентрация центров связывания типа j эритроцитарной мембраны, отнесенная к количеству белка в г (моль/г белка), $L_{общ.L}$ концентрация лиганда, отнесенная к количеству белка в г (моль/г белка), L – свободная (несвязанная) концентрация лиганда, отнесенная к количеству белка в г (моль/г белка), v_{j1} – число молей лиганда, связанных с 1 молекул центров связывания j -го типа при отсутствии кооперативного связывания, v_{j2} – число молей лиганда, связывающегося кооперативно с 1 молекул центров связывания j -го типа.

Константа некооперативного связывания лиганда с центрами j -го типа определялась по уравнению (2), а для случая кооперативного связывания – по уравнению (3)

$$K_j = \frac{v_{j1} N_j}{L \cdot N_j (1 - v_{j1})}, \quad (2)$$

$$K_j^{n_j} = \frac{v_{j2} N_j}{L^{n_j} \cdot N_j (1 - v_{j2})}, \quad (3)$$

где $K_j^{n_j}$ – константа кооперативного связывания для лиганда в центрах типа j ; n_j – количество центров связывания типа j , на которых лиганд связывается кооперативно.

Подставляя уравнения 2 и 3 в уравнение 1 получаем общую концентрацию лиганда для i точек серии

$$L_{общ.L_i} = L_i + \sum_{j=1}^m N_j \left(\frac{L_i \cdot K_j}{1 + K_j L_i} + \frac{L_i^{n_j} \cdot K_j^{n_j}}{1 + L_i^{n_j} \cdot K_j^{n_j}} \right), \quad (4)$$

где i – номер экспериментальной точки, отличающиеся концентрацией вводимого лиганда, m – число типов центров связывания.

Наличие математической модели позволяет построить процедуру сопоставления экспериментальных данных, которыми являются свободные концентрации глюкозы в каждой экспериментальной точке и априорных представлений о схеме протекания процесса связывания с мембраной.

На начальном этапе моделирования константы образования K_j , N_j , n_j задают в виде ориентировочных величин (“нулевая гипотеза”). Для каждой точки рассчитывали величину теоретического значения свободной концентрации глюкозы ($L_i^{теор}$), после чего находят в каждой точке разность ($L_i^{теор} - L_i^{эксн}$) и минимизировали функционал $F = \sum_j (L_i^{теор} - L_i^{эксн})^2$ по всем экспериментальным

точкам i . В ходе поисковой оптимизации определяли такой набор K_j , N_j , n_j , при котором F достигает своего минимума.

Задача решалась с применением методов поисковой оптимизации. Для отыскания минимума функции применен метод «деформируемого многогранника». Основное требование к модели: оптимальные значения параметров должны обеспечивать наименьшие отклонения рассчитанных свойств системы от соответствующих экспериментальных значений этих свойств.

Вычисление параметров связывания проводили с использованием специально созданных компьютерных программ.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Изотерма связывания МТХ с мембраной нативных тений эритроцитов показана на рис. 1 (зависимость 1, (25°C) и зависимость 2 (37°C)).

Для математического анализа связывания метотрексата с мембраной эритроцитов использована модель, включающая три центра связывания и обеспечивающая наименьшее расхождение между экспериментальными и расчетными значениями связанной концентрации МТХ.

Рассчитанные параметры связывания метотрексата с нативной мембраной эритроцитов при двух температурах приведены в табл. 1.

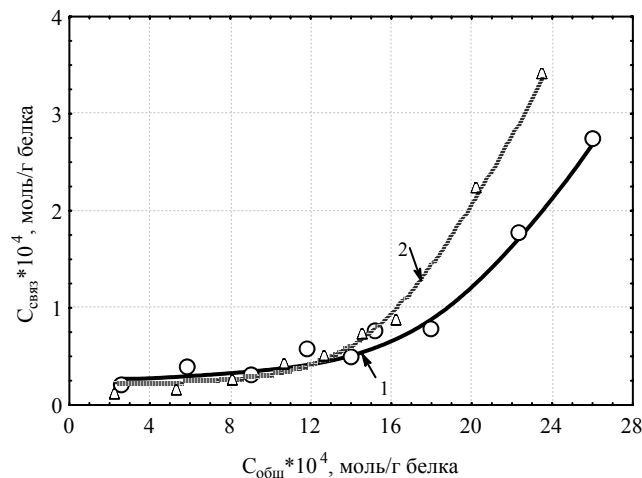


Рис. 1. Изотермы связывания метотрексата с нативной мембраной тени эритроцитов при 25°C (1) и при 37 (2). Точками нанесены экспериментальные данные. Сплошная линия – расчетная кривая связывания.

Результаты расчета показали, что центры связывания для метотрексата различаются как по сродству, так и емкостью. Первый тип характеризуется чрезвычайно высоким сродством ($K_1=9,89 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (25°C) и $9,11 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (37°C)) и низкой емкостью, второй тип центров характеризуется низким сродством ($K_2=456,2 \text{ M}^{-1}$ (25°C) и $532,4 \text{ M}^{-1}$ (37°C)) и средней емкостью, третий тип характеризуется низким сродством ($K_3=22,1 \text{ M}^{-1}$ (25°C) и $21,7 \text{ M}^{-1}$ (37°C)), и чрезвычайно высокой емкостью (не насыщается при концентрации МТХ $2,60 \cdot 10^{-3}$ моль/л (последняя точка серии).

Таблица 1

Параметры связывания метотрексата с нативной мембраной эритроцитов

T, °C	Центр связывания, j	Константа связывания, K_j	Концентрация центров связывания, моль/г белка, N_j	Степень кооперативности n_j
25°C	1	$9,89 \cdot 10^6$	$2,13 \cdot 10^{-5}$	2
	2	456,2	$3,18 \cdot 10^{-4}$	10
	3	22,1	$4,08 \cdot 10^{-3}$	2
37°C	1	$9,11 \cdot 10^6$	$1,82 \cdot 10^{-5}$	2
	2	532,4	$4,38 \cdot 10^{-4}$	10
	3	21,7	$2,28 \cdot 10^{-3}$	2

Из рис. 1 видно, что повышение температуры до 37°C увеличивает сорбцию метотрексата, причем увеличение сорбции наблюдается в области высоких концентраций МТХ. Это может быть связано как с увеличением центров связывания второго типа, так и константы связывания с этими центрами. Как показали расчеты, количество центров связывания других типов и констант связывания с ними достоверно не изменяются (табл. 1).

Изотермы связывания метотрексата с белок-липидным матриксом мембраны, полученным после экстрагирования периферических белков показаны на рис. 2. Параметры связывания, полученные расчетным путем, приведены в табл. 2. Видно, что экстракция периферических белков привела к снижению сорбции метотрексата. Однако, если при 25°C связывание МТХ снизилось в интервале низких концентраций ($C_{\text{общ}} = (2 \div 18) \cdot 10^{-4}$ моль/г-белка), то при 37°C связывание МТХ снижается при $C_{\text{общ}} > 18 \cdot 10^{-4}$ моль/г-белка, а в интервале низких концентраций достоверно не изменяется.

Удаление периферических белков привело к снижению концентрации центров связывания первого типа, при этом возросла константа связывания с центрами этого типа. Константы связывания с центрами второго типа достоверно не изменилась, в то время как количество центров связывания незначительно уменьшилось. Константы связывания с центрами третьего типа снизились, в то время как их концентрация возросла.

Известно [8, 9], что экстракция периферических белков приводит к изменению структуры интегральных белков и электрохимических свойств белок-липидного матрикса мембран. Вместе с тем, данные литературы указывают на наличие взаимодействий между периферическими белками и липидным бислоем [9].

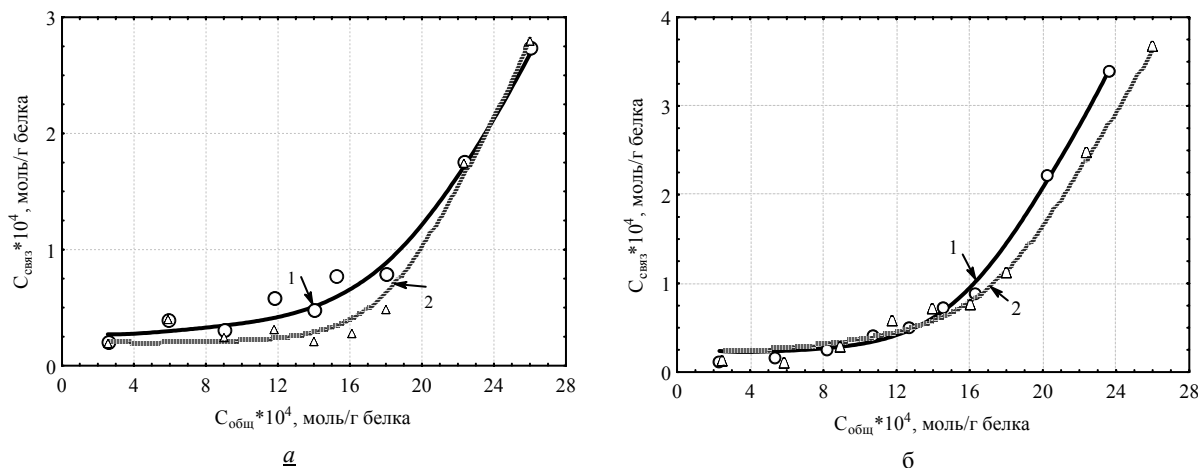


Рис. 2. Изотермы связывания метотрексата с нативной мембраной теней эритроцитов (1) и ее белок – липидным матриксом (2). А– Т 25°С, Б– Т 37°С. Точками нанесены экспериментальные данные. Сплошная линия – расчетная кривая связывания.

Таблица 2

Параметры связывания метотрексата с белок-липидным матриксом эритроцитов

T, °C	Центр связывания, j	Константа связывания, K _j	Концентрация центров связывания, моль/г белка, N _j	Степень кооперативности n _j
25°С	1	16,13·10 ⁶	1,67·10 ⁻⁵	2
	2	476,2	3,08·10 ⁻⁴	15
	3	15,7	4,49·10 ⁻³	2
37°С	1	14,62·10 ⁶	1,72·10 ⁻⁵	2
	2	501,4	3,57·10 ⁻⁴	12
	3	18,6	4,85·10 ⁻³	1,4

Изменение стандартной свободной энергии связывания МТХ с мембраной можно определить по формуле

$$\Delta G^0 = -RT \ln K ,$$

где R – газовая постоянная, T – абсолютная температура в К, K – константа связывания. Изменение стандартной свободной энергии при связывании метотрексата с центрами различных типов приведены в табл. 3.

Электростатическое взаимодействие характеризуется, как известно, небольшими величинами ΔG^0 : 12–16 кДж/моль. Таким образом, с центрами второго и третьего типа МТХ связывается только электростатически. Скорее всего, с этими центрами МТХ связывается неспецифически. Центры третьего типа вероятно представлены липидной компонентой мембраны эритроцита, т.к. их количество увеличивается при удалении периферических белков.

На центрах первого типа МТХ фиксируются помимо дальнедействующих электростатических сил также силами ближнего порядка: водородными связями, Ван-дер-ваальсовыми силами, гидрофобными взаимодействиями. На основании полученных экспериментальных данных и данных, имеющихся в литературе, можно предположить, что эти центры связывания локализованы на интегральных белках и, возможно, на периферических белках мембраны эритроцитов.

Установлено, что при связывании молекул, имеющих заряд с интегральными мембранными белками, их молекулы локализуются на границе между полярной и неполярной областями мембраны [9]. Связывание заряженных молекул лигандов, к которым относится и метотрексат с поверхностью мембраны, имеющей определенный зарядовый рельеф, определяется двумя факторами: сродством лиганда к центру связывания и поверхностным потенциалом ϕ , определяющим концентрацию лиганда в двойном электрическом слое. В этом случае удаление периферических белков приводит к изменению поверхностного потенциала и соответственно к изменению концентрации лиганда в примембранных слоях. Процесс связывания метотрексата с центрами первого типа наиболее чувствителен к изменению электроповерхностных свойств мембраны. Рассчитанная в соответствии с данной моделью величина константы связывания с центрами первого типа на нативной мембране теней эритроцитов составляет $9,89 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ и возрастает после удаления периферических белков до $16,13 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (при 25°С).

Таблиця 3

Изменение стандартной свободной энергии при связывании метотрексата с центрами различных типов

T, °C	Вид мембраны	ΔG^0 связывания метотрексата с центрами типа j , кДж/моль		
		$j=1$	$j=2$	$j=3$
25°C	Нативная мембрана (периферические белки не экстрагированы)	-39,9	-15,17	-7,6
	Белок-липидный матрикс	-41,1	-15,27	-6,8
37°C	Нативная мембрана (периферические белки не экстрагированы)	-41,3	-16,18	-7,9
	Белок-липидный матрикс	-42,5	-16,02	-7,5

Согласно известному закону распределения Больцмана, концентрация (C_i) в примембранном слое определяется величиной поверхностного потенциала на мембране:

$$C_i = C_0 \exp(zF\varphi/(RT)), \tag{5}$$

где z – заряд молекул МТХ (-2), C_0 – концентрация ионов в объеме раствора, F – число Фарадея.

Как следует из уравнения 5, соотношение величин констант связывания описывает изменение поверхностного потенциала мембраны:

$$\varphi_2 - \varphi_1 = RT/(zF) \ln K_1/K_2, \tag{6}$$

где K_1 и K_2 – константы связывания молекул с мембраной тень эритроцитов до и после экстракции периферических белков.

В случае изменения константы связывания от $9,89 \cdot 10^6$ до $16,13 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ при удалении периферических белков, поверхностный потенциал вблизи центров первого типа изменяется на величину $\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1 = 6,28$ мВ. Если учесть, что МТХ в растворе находится в анионной форме, то снижение поверхностного заряда вблизи центров первого типа и приводит к росту константы связывания. Согласно с установленным ранее фактом [8, 9], при экстракции периферических белков отрицательный потенциал мембраны становится более высоким. Более высокий отрицательный потенциал мембраны с экстрагированными периферическими белками легко объяснить, если учесть, что экстрагируемые периферические белки являются поликатионами. В нативной мембране периферические белки, связываясь за счет электростатических сил, частично компенсируют отрицательный заряд белок-липидного матрикса мембран. Снижение поверхностного заряда вблизи групп первого типа указывает на их модификацию в процессе удаления периферических белков, что и объясняет уменьшение концентрации центров связывания.

Константа связывания с центрами третьего типа снижается с 22,1 до $15,7 \text{ M}^{-1}$, что означает изменение поверхностного потенциала в области их локализации на -4,4 мВ. Наличие периферических белков, являющихся противоионами по отношению к белок-липидному матриксу, должно приводить к стабилизации структуры мембраны. Поэтому можно ожидать, что экстракция периферических белков сопровождается значительными структурными изменениями белок-липидного матрикса в сторону неупорядоченности и увеличения подвижности белкового и липидного компонентов мембраны. Этот факт может объяснить рост количества центров неспецифического связывания для МТХ.

Выводы. Установлено, что на мембране эритроцитов существует три типа центров связывания для метотрексата, различающихся как по сродству, так и емкостью. Показано, что первый тип центров связывания для метотрексата локализован на белках. Свободная энергия связывания с центрами первого типа находится в пределах от -39 до -41 кДж/моль. Величина свободной энергии связывания (-15,8 и -7,9 кДж/моль) указывает на электростатический характер взаимодействий метотрексата с центрами второго и третьего типов.

Показано, что удаление поверхностных белков с нативной мембраны эритроцитов приводит к снижению отрицательного заряда, локализованного вблизи центров первого типа и, возможно, к их модификации. Следствием этого является снижение количества центров связывания данного типа. Показано, что экстракция периферических белков сопровождается значительными структурными изменениями белок-липидного матрикса и росту поверхностного отрицательного заряда вблизи центров связывания третьего типа, что может усиливать процессы неспецифической сорбции МТХ эритроцитами.

РЕЗЮМЕ

Вивчена взаємодія метотрексату з нативними тіннями еритроцитів та їх білок-ліпідним матриксом (периферичні білки екстраговані). Розраховані параметри зв'язування. Установлено, що зв'язування метотрексату з мембраною еритроцитів визначається взаємодією із трьома структурними ділянками. Показаний вплив електрохімічних і поверхневих властивостей тіней еритроцитів на параметри зв'язування метотрексату.

Ключові слова: тіні еритроцитів, метотрексат, константи зв'язування.

SUMMARY

The interaction of methotrexate with native erythrocytes ghosts and their protein-lipid matrix (the peripheral proteins were extracted) was studied. The binding parameters were calculated. Demonstrated that the binding of methotrexate to erythrocytes' membrane is determined by its interaction with three structural sites. Influence of electrochemical and surface properties of erythrocytes ghosts on binding parameters methotrexate is shown.

Keywords: erythrocytes ghosts, methotrexate, the constants of binding.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hornung N. Patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate (MTX): concentrations of steady-state erythrocyte MTX correlate to plasma concentrations and clinical efficacy / N. Hornung, T. Ellingsen, J. Attermann, et al. // J. Rheumatol. – 2008. – Vol. 35, N 9. – P. 1709-1715.
2. Warren R.B. Outcomes of methotrexate therapy for psoriasis and relationship to genetic polymorphisms / R.B. Warren, R.L. Smith, E. Campalani, et al. // Br. J. Dermatol. – 2009. – Vol. 160, N 2. – P. 438-441.
3. French D. Acquired variation outweighs inherited variation in whole genome analysis of methotrexate polyglutamate accumulation in leukemia / D. French, W. Yang, C. Cheng, et al. // Blood. – 2009. – Vol. 113, N 19. – P. 4512 - 4520.
4. Dervieux T. Pharmacogenetic and metabolite measurements are associated with clinical status in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: results of a multicentred cross sectional observational study / T. Dervieux, D. Furst, D. O. Lein, et al. // Ann. Rheum. Dis. – 2005. – Vol. 64, N 8. – P. 1180-1185.
5. Inoue S. Erythrocyte methotrexate-polyglutamate assay using fluorescence polarization immunoassay technique: application to the monitoring of patients with rheumatoid arthritis / S. Inoue, M. Hashiguchi, S. Kawai, M. Mochizuki // J. Pharm. Soc. Japan. – 2009. – Vol. 129, N 8. – P. 1001-1005.
6. Макурина О. Н. Изменение периферических и интегральных белков микросом печени кур в онтогенезе / О. Н. Макурина, В. И. Древаль // Изв. АН СССР. – Сер. Биология. – 1986. – № 6. – С. 926-929.
7. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетов. – М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
8. Древаль В. И. Исследование связывания бромтимолового синего с плазматическими мембранами / В. И. Древаль, А. В. Финашин, Е. А. Баранник // Укр. биохим. журн. – 1989. – Т. 62, № 2. – С. 94-98.
9. Древаль В. И. Изменение структуры липидного компонента плазматических мембран при экстракции периферических белков / В. И. Древаль // Укр. биохим. журн. – 1989. – Т. 63, № 1. – С. 91-94.

Поступила в редакцию 07.05.2010 г.