

ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Зорина Т.Е.¹, Кравченко И.Е.¹, Яковец И.В.¹, Белевцев М.В.³,
Балахар Гош², Свати Бисвоз², Зорин В.П.¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт технологий и научных исследований Бирла, Пилани, Индия

³РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минск, Беларусь

Известно, что амфифильные полимеры способны формировать самоорганизующиеся наноструктуры за счет наличия в их цепи гидрофобных и гидрофильных фрагментов. Варьируя химическое строение синтезируемых макромолекул, природу и распределение функциональных групп, удается эффективно управлять процессом молекулярной сборки, добиваясь получения сложных регулярных наноструктур различного строения, обладающих уникальными свойствами. В настоящее время наносистемы, созданные на основе амфифильных полимеров, вызывают все возрастающий интерес в фармакологии, так как они представляют один из видов терапевтических систем и способны транспортировать лекарственные вещества внутрь клеток. При циркуляции таких носителей содержащееся в них биологически активное вещество защищено от инактивации, а действие лекарственного препарата пролонгируется. Кроме того, наносистемы доставки на основе амфифильных полимеров имеют следующие преимущества: 1) быстрое и воспроизводимое получение в больших количествах; 2) возможность включения плохорастворимых в воде веществ; 3) регулирование накопления препарата в различных органах и тканях организма в зависимости от размера частиц.

Сополимеры метокси-поли(этилен гликоль)-поли(D,L-лактид) (mPEG-PLA) и метокси-поли(этилен гликоль)-*b*-поли(ε-капролактон) (mPEG-PCL) являются типичными амфифильными блочными сополимерами, которые способны к самоорганизации в водной среде в мицеллы, при этом гидролитически стабильные гидрофильные сегменты полиэтиленгликоля образуют внешнюю оболочку-корону, а ядро содержит гидрофобные биологически деградируемые блоки PLA и PCL. Мицеллы, получаемые из данных типов блочных сополимеров, наиболее перспективны при использовании в качестве переносчиков лекарственных препаратов при химиотерапии онкологических и других заболеваний.

В данной работе исследованы методы получения полимерных наночастиц на основе сополимеров mPEG-PLA и mPEG-PCL, нагруженных фотосенсибилизатором хлорином e_6 (Хл e_6). Исследованы структурные и фотофизические характеристики полученных наноразмерных комплексов. Проведено сравнение кинетических характеристик Хл e_6 в сыворотке и клеточных культурах при введении фотосенсибилизатора (ФС) в растворе или в составе наноразмерных полимерных везикул.

Препараты сополимеров mPEG-PLA и mPEG-PCL синтезированы в Институте технологий и научных исследований Бирла (Индия). Полимерные мицеллы получали методом регидротации пленок, полученных при вакуумировании на роторном испарителе растворов полимера и Хл e_6 либо в процессе диализа растворов полимера в смеси диметилсульфоксида и воды. В качестве растворителя использовались деионизированная вода или разбавленный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в разведении 1:10 (pH 7,4).

Оценку размеров полимерных частиц проводили методами динамического светорассеяния на анализаторе Nanoparticle Size Analyzer «Brookhaven 90Plus» (Австрия) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) на приборе Solver P47PRO (НТ-МДТ, Россия).

На основании анализа АСМ-изображений были построены трехмерные модели полимерных частиц, а также определены их средние размеры (рисунок 1).

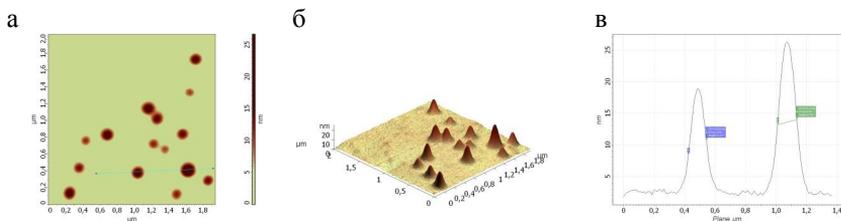


Рисунок 1– АСМ-изображение мицелл из кополимера mPEG-PLA с Хл e_6 и оценка их размера: а – изображение при окне сканирования $2 \times 2 \mu\text{m}$; б – трехмерная модель липосомы, построенная по АСМ-изображению при окне сканирования $2 \times 2 \mu\text{m}$; в – оценка размера указанных на рисунке 1 а частиц, сечение рельефа поверхности

Размеры полимерных мицелл были определены в контроле и при нагрузке Хл e_6 в соотношении от 1:3 до 1:9. Было показано, что средний

диаметр ненагруженных мицелл mPEG-PLA составляет 120 нм. Нагрузка хлорином сопровождается увеличением размеров мицелл, при максимальной степени нагрузки 36-40 % средний диаметр полимерных везикул составляет 145-150 нм. Средний диаметр мицелл, приготовленных из mPEG-PCL – 100-110 нм и практически не зависит от нагрузки ФС. Согласно данным динамического светорассеяния и АСМ, полученные препараты мицелл характеризуются высоким уровнем полидисперсности, что, по-видимому, обусловлено агрегацией мицелл в водных растворах. Степень агрегированности мицелл сильно зависит от условий подготовки (температура, продолжительность и интенсивность встряхивания суспензии) на стадии самоорганизации полимеров в мицеллы.

Исследования спектрально-флуоресцентных характеристик Хл е₆, включенного в мицеллярные комплексы, позволило оценить характеристики связывания его с mPEG-PLA и mPEG-PCL. Небольшое длинноволновое смещение максимума спектра флуоресценции Хл е₆ (3 нм) свидетельствует об умеренно полярном микроокружении молекул данного ФС в составе полимерных мицелл (рисунок 2).

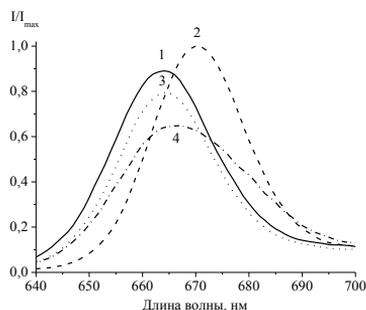


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции* Хл е₆ в растворах и в составе полимерных мицелл: 1 – Хл е₆ в ФСБ; 2 – Хл е₆ в этаноле; 3 – Хл е₆ в mPEG-PLA; 4 – Хл е₆ в mPEG-PCL; соотношение полимеры:Хл е₆ – (5:1).
*Значения флуоресценции нормированы на уровень I_{max} флуоресценции Хл е₆ в растворе этанола

Относительный квантовый выход флуоресценции Хл е₆ в полимерных наноструктурах снижен в сравнении с его растворами, что, вероятно, происходит вследствие процессов экранировки и концентрационного тушения флуоресценции. Данный эффект в мицеллах mPEG-PLA слабо зависит от степени их нагрузки фотосенсибилизатором. В случае мицелл

mPEG-PCL увеличение количества связанного хлорина в 2-3 раза сопровождается снижением интенсивности флуоресценции на 50-60 %. Исследованные полимерные наноструктуры значительно различаются по скорости выхода связанного ФС. Анализ спектральных и поляризационных характеристик флуоресценции при введении нагруженных мицелл в раствор сыворотки показал, что практически все молекулы Хл e_6 выходят из мицелл mPEG-PLA в течение 10-15 мин и связываются с белками. В случае mPEG-PCL мицелл, скорость выхода молекул ФС крайне низка, даже после 24 ч инкубирования большая часть молекул ФС остается в составе полимерных везикул.

Согласно результатам, полученным с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (микроскоп Leica TCS SPE, Германия), Хл e_6 , введенный в составе mPEG-PCL мицелл, накапливается в клетках Raji в значительно больших количествах в сравнении со свободным Хл e_6 . При этом присутствие белков сыворотки крови практически не влияет на скорость накопления мицеллярной формы ФС.

Проведенные исследования показывают, что применение сополимеров mPEG-PCL и mPEG-PLA позволяет получать высокостабильные мицеллярные структуры, пригодные для создания новых фармакологических форм ФС. Изменение структурных характеристик подобных форм может позволить направленно контролировать фармакокинетику фотосенсибилизаторов при проведении фотодинамической терапии.

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ ФОТОПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ВВЕДЕНИЯ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

**Зорина Т.Е.¹, Яковец И.В.¹, Янковский И.В.¹, Кравченко И.Е.¹,
Шман Т.В.², Белевцев М.В.²**

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

²*РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минск, Беларусь*

Эффективность и механизмы фотосенсибилизированного порфиринами повреждения клеток в значительной степени зависят от процессов связывания и внутриклеточной локализации фотосенсибилизаторов (ФС). Ранее было показано, что использование липосомальных форм для введения производных хлорина e_6 (ПХл e_6) существенно влияет на уро-