

УДК 577.345;615.033;615.45

## ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ $\beta$ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА БИОДОСТУПНОСТЬ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

**И. В. ЯКОВЕЦ<sup>1),2),3)</sup>, И. В. ЯНКОВСКИЙ<sup>1)</sup>, К. Н. БОРИСОВ<sup>1)</sup>, К. А. ЖУКОВ<sup>1)</sup>,  
М. В. БЕЛЕВЦЕВ<sup>4)</sup>, Л. Н. БОЛОТИНА<sup>2),3)</sup>, В. П. ЗОРИН<sup>1),5)</sup>**

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет,  
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Центр Исследований и Автоматизации Нанси,  
CNRS UMR 7039 Национальный центр научных исследований, Университет Лотарингии, Кампус наук,  
54500, г. Вандовр-Нанси, Франция

<sup>3)</sup>Институт канцерологии Лотарингии,  
пр. Бургундии, 6, 54519, г. Вандовр-Нанси, Франция

<sup>4)</sup>Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,  
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны Минской области, Республика Беларусь

<sup>5)</sup>Белорусский государственный университет,  
Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,  
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Соответствуя своим уникальным свойствам системы доставки лекарств на основе циклодекстринов, они являются весьма востребованными и перспективными для создания новых лекарственных форм препаратов. Ранее было установлено, что циклодекстрины обладают высоким сродством к арилзамещенным тетрапиррольным соединениям, которые в свою очередь являются эффективными сенсбилизаторами для фотодинамической терапии. Особый интерес для этого исследования представляет исследование влияния  $\beta$ -циклодекстринов ( $\beta$ -ЦД) на

### Образец цитирования:

Яковец И. В., Янковский И. В., Борисов К. Н., Жуков К. А., Белевцев М. В., Болотина Л. Н., Зорин В. П. Влияние производных  $\beta$ -циклодекстрина на биодоступность и биораспределение тетрапиррольных соединений // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2017. № 1. С. 81–90.

### For citation:

Yakovets I. V., Yankovsky I. V., Barysau K. N., Jukov K. F., Belevtsev M. V., Bolotine L. N., Zorin V. P. Influence of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives on the bioavailability and biodistribution of tetrapyrrole compounds. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2017. No. 1. P. 82–90 (in Russ.).

### Авторы:

**Илья Владимирович Яковец** – младший научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии, аспирант кафедры биофизики. Научный руководитель – В. П. Зорин.

**Игорь Вячеславович Янковский** – доктор философии; ассистент кафедры общей физики.

**Кирилл Николаевич Борисов** – студент физического факультета. Научный руководитель – В. П. Зорин.

**Константин Андреевич Жуков** – студент физического факультета. Научный руководитель – В. П. Зорин.

**Михаил Владимирович Белевцев** – кандидат биологических наук, доцент; заместитель директора по научной работе.

**Лина Николаевна Болотина** – доктор философии, доктор медицины; руководитель исследовательского отдела.

**Владимир Петрович Зорин** – кандидат биологических наук, доцент; заведующий НИЛ биофизики и биотехнологии.

### Authors:

**Ilya V. Yakovets**, junior researcher at the laboratory of biophysics and biotechnology, post-graduate student at the department of biophysics.

*i.yakovets@gmail.com*

**Igor V. Yankovsky**, doctor of science (philosophy); assistant of the department of common physics.

*lubom@tut.by*

**Kirill N. Barysau**, student of the faculty of physics.

*kirill\_borisov98@mail.ru*

**Konstantin A. Jukov**, student of the faculty of physics.

*mr.kas1278@mail.ru*

**Mikhail Belevtsev**, PhD (biology), associate professor; deputy director for scientific work.

*belevtsev\_m@mail.ru*

**Lina N. Bolotine**, doctor of science (philosophy), doctor of science (medicine); head of research department.

*l.bolotine@nancy.unicancer.fr*

**Vladimir P. Zorin**, PhD (biology) associate professor; head of the laboratory of biophysics and biotechnology.

*vpzorin@mail.ru*

биодоступность и биораспределение тетрапиррольного фотосенсибилизатора темпорфина (mTHPC) в различных биологических системах. Было показано, что образование комплексов включения между mTHPC и  $\beta$ -ЦД полностью устраняет стадию агрегации сенсибилизатора после введения в сыворотку крови. Кинетические и равновесные параметры распределения mTHPC между  $\beta$ -ЦД и белками сыворотки крови изучались с использованием эксклюзионной гель-хроматографии и специальной разработанной в нашей лаборатории флуоресцентной методики. Установлено, что  $\beta$ -ЦД увеличивают диффузионную подвижность молекул mTHPC между такими биологическими структурами, как белки сыворотки. Было продемонстрировано, что процессы распределения mTHPC в сыворотке крови и накопление в клетках крови сильно зависят от концентрации  $\beta$ -ЦД. Полученные результаты позволяют предположить значительное влияние молекул  $\beta$ -ЦД на процессы проникновения и распределения mTHPC в опухолевой ткани, а также свидетельствуют о возможности применения  $\beta$ -ЦД для снижения риска развития фотоаллергических реакций при проведении фотодинамической терапии с mTHPC.

**Ключевые слова:** темпорфин; фотосенсибилизатор; комплексы включения; циклодекстрины; биораспределение.

**Благодарность.** Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) (проекты № M16M-049 и № M17MC-028), Института Канцерологии Лотарингии (Нанси, Франция) и Французской «Национальной лиги по борьбе с раком (CCIR-GE)». Авторы благодарят Biolitec Research GmbH (Йена, Германия) за предоставление mTHPC.

## INFLUENCE OF $\beta$ -CYCLODEXTRIN DERIVATIVES ON THE BIOAVAILABILITY AND BIODISTRIBUTION OF TETRAPYRROLE COMPOUNDS

I. V. YAKAVETS<sup>a, b, c</sup>, I. V. YANKOVSKY<sup>a</sup>, K. N. BARISAY<sup>a</sup>, K. A. JUKOV<sup>a</sup>,  
M. V. BELEVTSSEV<sup>d</sup>, L. N. BOLOTINE<sup>b, c</sup>, V. P. ZORIN<sup>a, e</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University,

Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus

<sup>b</sup>Research Centre for Automatic Control of Nancy,

University of Lotaringia, Science Campus, 54500, Vandoevr-Nancy, France

<sup>c</sup>Lorraine Institute of Oncology,

Burgundy avenue, 6, 54519, Vandoevr-Nancy, France

<sup>d</sup>Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,  
Frunzenskaya Street, 43, der. Borovlyany, 223053, Minsk Region, Republic of Belarus

<sup>e</sup>Belarusian State University, International Sakharov Environmental Institute

Dolgobrodskaya street, 23/1, 220070, Minsk, Belarus

Corresponding author: i.yakavets@gmail.com

Due to their unique properties, drug delivery systems based on cyclodextrins are very popular and promising for the development of new drug formulations. Previously, it has been found that cyclodextrins have a high affinity to the aryl substituted tetrapyrrolic compounds which in turn are effective sensitizers for photodynamic therapy. Of special interest for this study is the investigation of  $\beta$ -cyclodextrins ( $\beta$ -CDs) effect on bioavailability and biodistribution of tetrapyrrolic photosensitizer temoporfin (mTHPC) in various biological systems. It was showed that association of mTHPC with the  $\beta$ -CDs completely abolishes its aggregation after introduction into blood serum. Kinetic and equilibrium distribution of mTHPC between  $\beta$ -CDs and serum were studied by means of special fluorescent technique.  $\beta$ -CDs increase diffusion movement of mTHPC molecules between biological structures such as serum proteins. It was demonstrated that the  $\beta$ -CDs have a concentration-dependent effect on the process of mTHPC distribution in blood serum and accumulation in blood cells. The results obtained suggest a significant effect of  $\beta$ -CD molecules on the penetration and distribution of mTHPC in tumor tissue, as well as indicate the possibility of using  $\beta$ -CD to reduce the risk of photoallergic reactions during photodynamic therapy with mTHPC.

**Key words:** temoporfin; photosensitizer; inclusion complexes; cyclodextrins; biodistribution.

**Acknowledgements.** This work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (BRFFR) (projects number № M16M-049 and № M17MC-028), Institut de Cancérologie de Lorraine, French «Ligue Nationale contre le Cancer (CCIR-GE)». The authors thank biolitec research GmbH (Jena, Germany) for providing mTHPC.

## Введение

Недостаточная растворимость в воде, низкая стабильность при хранении, неселективное распределение в организме и др. препятствуют эффективному применению многих лекарственных средств в клинической практике. На сегодняшний день используются различные пути повышения эффективности лекарственной терапии, среди которых наиболее эффективным способом является применение специальных систем доставки препаратов. Использование наноразмерных систем доставки (НРСД) лекарственных средств обеспечивает значительные преимущества по сравнению с традиционными способами введения, в том числе повышение растворимости, возможность использования векторных систем доставки препаратов, а также увеличение общей терапевтической эффективности применения лекарственных средств [1; 2]. Кроме того, во многих случаях применение НРСД позволяет снизить побочные эффекты химиотерапии, в том числе за счет снижения дозы и частоты введения препарата [2].

Благодаря своим исключительным свойствам, а также относительно низкой стоимости НРСД на основе циклодекстринов являются весьма востребованными и перспективными для создания новых лекарственных форм препаратов. Циклодекстрины (ЦД) являются циклическими олигосахаридами, состоящими из D-глюкопиранозных остатков. Семейство натуральных ЦД включает в себя три основных продукта:  $\alpha$ -ЦД,  $\beta$ -ЦД и  $\gamma$ -ЦД, макрокольца которых состоят из шести, семи и восьми остатков глюкопиранозы соответственно. Уникальное строение – ЦД обладают формой усеченного конуса с относительно гидрофильной внешней поверхностью и гидрофобной внутренней полостью (рис. 1) – позволяет им образовывать нековалентные комплексы включения по типу «гость-хозяин» с множеством органических и неорганических соединений. Растет интерес к применению ЦД в качестве средства для улучшения физической и химической стабильности активных субстанций (защита от воздействия света, окисления и т. д.), для повышения местной переносимости лекарственных препаратов и в любых других случаях, когда образование комплекса включения помогает найти инновационное решение [3–5]. Кроме того, показано, что ЦД повышают растворимость лекарственных средств, увеличивают время циркуляции и повышают их биодоступность в организме [6]. Применение ЦД в фармацевтической промышленности постоянно расширяется. Медикаменты, содержащие ЦД, и их производные широко представлены на мировом фармацевтическом рынке в различных категориях (более 40 наименований), включая пероральные, парентеральные, местные и офтальмологические препараты [7].

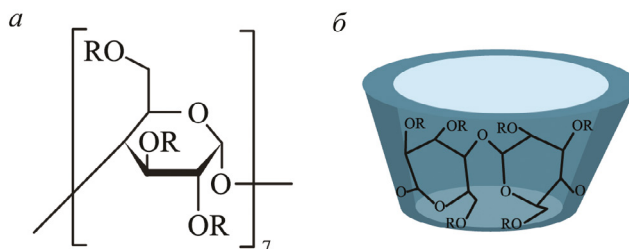


Рис. 1. Молекулярная (а) и стерическая (б) структура  $\beta$ -циклодекстрина

Fig. 1. Molecular (a) and steric (b) structures of  $\beta$ -cyclodextrin

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – одно из направлений медицины, где нанотехнологии находят широкое применение. ФДТ – малоинвазивный метод лечения ряда патологических заболеваний, в основе которого лежит комбинированное воздействие на патологические клетки и ткани света, молекулярного кислорода и особых веществ – фотосенсибилизаторов (ФС) [8]. Наиболее широко в клинической практике используются тетрапиррольные ФС. Показано, что наибольшим сродством к арилзамещенным тетрапиррольным ФС обладают производные  $\beta$ -ЦД [9]. Так, для темпорфина (mTHPS, коммерческая форма – Foscan®), одного из наиболее эффективных клинически одобренных ФС [10; 11], производные  $\beta$ -ЦД были предложены в качестве НРСД [12]. Было показано, что производные  $\beta$ -ЦД в значительной степени модифицируют процессы распределения mTHPS в организме животных опухоленосителей *in vivo* [12].

Цель данной работы – комплексное исследование механизмов влияния производных  $\beta$ -ЦД на процессы биораспределения mTHPS в крови. Рассмотрены процессы дезагрегации и перераспределения mTHPS в сыворотке крови в присутствии  $\beta$ -ЦД, а также влияние  $\beta$ -ЦД на процессы накопления mTHPS в лейкоцитах крови человека. Исследуемые в работе механизмы влияния ЦД на процессы распределения лекарственных соединений в крови представляют интерес с точки зрения возможности их

использования для снижения риска развития фотоаллергических реакций с участием экзогенных и эндогенных ФС.

### Материалы и методы исследования

**Реагенты.** mTHPC, предоставленный компанией biolitec research GmbH (Германия), растворяли в 99,6 %-ном этиловом спирте до получения концентрации 1 мМ. В работе использовали эмбриональную сыворотку телят производства «SigmaAldrich», а также М-β-ЦД производства AraChem (Нидерланды). Содержание основного вещества составляло не менее 99 %.

Водные растворы готовили на основе фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (8 г NaCl, 0,20 г KCl, 1,44 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 0,24 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> на 1 л раствора; pH = 7,4). Стоковый раствор буфера при работе был разбавлен дистиллированной водой в соотношении 1:1.

**Фотометрические и флуоресцентные измерения.** Характеристики флуоресценции измерялись с использованием спектрофлуориметра Solar CM-2203 (SOLAR, Беларусь), оборудованном термостатируемой ячейкой с магнитной мешалкой. Измерение концентрации mTHPC проводили фотометрически на длине волны  $\lambda = 650$  нм (коэффициент экстинкции  $\varepsilon = 30000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) [13]. Оптическая плотность всех образцов на длинах волн возбуждения и регистрации флуоресценции не превышала 0,15.

**Спектрально-флуоресцентный метод определения доли ФС, связанного с ЦД.** Для измерения количества ФС, связанного с молекулами М-β-ЦД в сыворотке крови, использовали спектральный метод, основанный на спектральных особенностях полосы Core mTHPC при связывании с биологическими структурами [14; 15]. В работе использовались следующие длины волн возбуждения флуоресценции:  $\lambda_1 = 407$  нм и  $\lambda_2 = 422$  нм. Регистрация флуоресценции проводилась на длине волны  $\lambda = 652$  нм. Для количественного описания спектрально-флуоресцентных изменений полосы Core mTHPC использовалось отношение интенсивностей флуоресценции при возбуждении на  $\lambda_1 = 407$  нм и  $\lambda_2 = 422$  нм ( $I_{\lambda_1}/I_{\lambda_2}$ ).

**Клетки.** В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови человека (доноров). Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли центрифугированием образцов цельной крови в градиенте плотности Histopaque-1077 «Sigma» на протяжении 25 мин со скоростью 1500 об/с. Клеточную суспензию, образующую белое кольцо, собирали и помещали в ФСБ. После этого клетки отмывали в буфере дважды, лизировали оставшиеся эритроциты и переводили в среду инкубирования.

**Исследование процессов накопления ФС в клетках.** К суспензии клеток (концентрация  $10^6$  кл/мл) добавляли ФС в концентрации 10 мкМ с различными концентрациями М-β-ЦД. ФС, находящийся в органическом растворителе, предварительно инкубировался с сывороткой крови в течение 3 и более часов для полной мономеризации пигмента. Накопление ФС в клетках анализировалось на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter, США), оснащенном аргоновым лазером с длиной волны излучения 488 нм (20 мВ). Регистрировали распределение клеток по интенсивности флуоресценции в полосе испускания mTHPC. Обработку полученных данных проводили с использованием статистического пакета цитометра CXR для FC 500. Регионы клеток определяли по параметрам бокового и прямого светорассеивания.

### Результаты исследования и их обсуждение

**Дезагрегация ФС.** Рассматривая общую схему проведения ФДТ при внутривенном введении ФС, в первую очередь мы сталкиваемся с процессами транспорта ФС в васкулярной системе. На стадии введения в организм гидрофобные молекулы mTHPC образуют крупные агрегаты, затрудняющие транспорт ФС в кровотоке [16]. Агрегаты mTHPC не флуоресцируют, что затрудняет детекцию ФС на всех стадиях его фармакокинетики в организме. Об образовании агрегатов говорят изменения в спектрах поглощения и данные резонансного светорассеяния, полученные в работах [17], а также в нашей лаборатории [18]. Полученные результаты указывают на то, что агрегация проходит по пути образования J-агрегатов. Процессы агрегации mTHPC проявляются *in vivo*, когда агрегаты застревают в мелких кровеносных сосудах, а затем разрушаются со временем, что сопровождается вторичными пиками флуоресценции человеческой и кроличьей плазмы примерно через 10 и 6 ч после введения ФС соответственно [19; 20]. Хорошо известно, что взаимодействие с сывороточными белками и форменными элементами крови приводит к медленной дезагрегации mTHPC. Показано, что полная дезагрегация mTHPC в присутствии сыворотки наблюдается спустя несколько часов [18].

В тоже время формирование комплексов включения предотвращает агрегацию ФС и приводит к быстрой мономеризации ФС в водных растворах, в том числе в крови. Об этом свидетельствуют данные, представленные на рис. 2. При комнатной температуре процесс полной дезагрегации пигмента в 2 % растворе сыворотки крови протекает в течение суток. Добавление М-β-ЦД существенно сказывается на скорости и характере процесса дезагрегации пигмента. Значительное ускорение мономеризации

молекул mTHPC в присутствии белков сыворотки регистрируется уже при концентрациях М-β-ЦД от 3 мкМ, в то время как добавление М-β-ЦД в концентрациях более 100 мкМ в раствор приводит к полной дезагрегации mTHPC всего за 20–30 мин. Введение mTHPC в составе комплексов с М-β-ЦД в свою очередь полностью устраняет стадию агрегацию ФС в сыворотке крови (данные не представлены).

*Влияние М-β-ЦД на процессы распределения mTHPC в сыворотке крови.* Взаимодействие mTHPC с белками плазмы и липопротеинами оказывает значительное влияние на фармакокинетику препарата [18; 21]. Предполагается, что природа белка-«переносчика» влияет на процессы локализации сенсibilизатора в опухоли. Так, перенос молекул ФС в комплексах с сывороточным альбумином приводит к повреждению при фотодинамическом воздействии васкулярной системы и стромы опухоли. А транспорт в составе липопротеинов способствует доставке сенсibilизатора в опухолевые клетки [22]. В работе [21] был установлен ряд особенностей в связывании mTHPC с белками сыворотки крови и показано, что основная часть mTHPC связывается с липопротеинами высокой плотности (60 %), 35 % – с липопротеинами низкой плотности и лишь 5 % с другими белками плазмы, включая сывороточный альбумин человека.

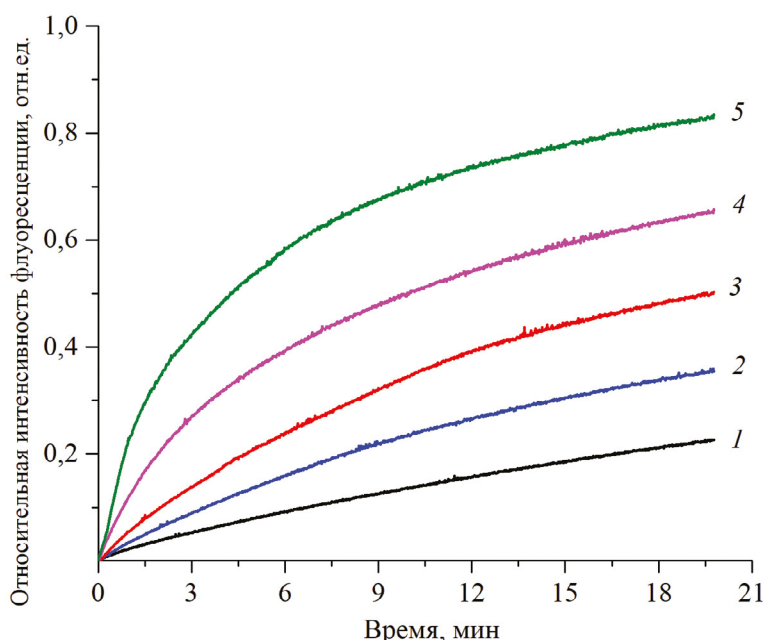


Рис. 2. Кинетики изменения интенсивности флуоресценции 0,5 мкМ mTHPC в водном растворе сыворотки (2 %) в зависимости от концентрации М-β-ЦД: 1 – 0; 2 – 3; 3 – 10; 4 – 30; 5 – 100 мкМ

Fig. 2. Kinetics of mTHPC (0.5  $\mu$ M) fluorescence intensity in aqueous solution of 2 % serum depending on M- $\beta$ -CD concentration: 1 – 0; 2 – 3; 3 – 10; 4 – 30; 5 – 100  $\mu$ M

Динамический характер образования комплекса включения между mTHPC и ЦД предполагает возможность диссоциации супрамолекулярного комплекса с последующим связыванием молекулы ФС с другими биоструктурами (например, белками сыворотки). К тому же, согласно литературным данным, комплексы mTHPC с производными β-ЦД в качестве наноносителей для mTHPC должно оказывать значительное влияние на процессы распределения ФС в крови, в том числе между транспортными белками плазмы [3].

Процессы распределения mTHPC в растворе сыворотки во многом определяются процессами его равновесного связывания с белками и β-ЦД. Было показано, что введение комплексов mTHPC/β-ЦД в сыворотку крови сопровождается процессами перераспределения ФС на белки плазмы крови [4; 15]. Процессы перераспределения mTHPC между комплексами включения и белками сыворотки были исследованы с использованием разработанных спектрально-флуоресцентных методов, основанных на изменении спектральных полос в спектрах возбуждения флуоресценции mTHPC. При связывании с белками сыворотки и при комплексообразовании с β-ЦД наблюдается обратный эффект. Для количественного описания данной спектральной особенности было предложено использовать отношения интенсивностей флуоресценции mTHPC при возбуждении в различных участках полосы Core  $I_{\lambda_1}/I_{\lambda_2}$ . В случае перераспределения mTHPC между М-β-ЦД и белками сыворотки крови использовался возбуждающий свет с длинами волн  $\lambda_1 = 407$  нм и  $\lambda_2 = 422$  нм.

На рис. 3 приведена кривая, описывающая равновесное распределение молекул mTHPC между белками сыворотки крови и М-β-ЦД. Изменение концентрации ЦД в сыворотке крови сопровождается смещением равновесия в процессах образования комплексов включения, что обуславливает перераспределение ФС между комплексами включения и белками сыворотки, о чем свидетельствует уменьшение параметра  $I_{407}/I_{422}$ . При этом полному связыванию mTHPC с белковыми структурами соответствует значение параметра  $I_{407}/I_{422} = 0,41$ . При добавлении малых концентраций М-β-ЦД (до 1 мкМ) изменений равновесного распределения mTHPC между белков сыворотки не наблюдаются. Дальнейшее увеличение концентрации М-β-ЦД приводит к увеличению величины  $I_{407}/I_{422}$ , что подтверждает перераспределение mTHPC с белков сыворотки и появлению фракции молекул ФС в комплексах включения с М-β-ЦД. Относительный вес фракции молекул mTHPC, связанных с М-β-ЦД, зависит от концентрации М-β-ЦД и концентрации белков сыворотки. Так, присутствие в растворе более 100 мкМ М-β-ЦД не приводит к увеличению отношения  $I_{407}/I_{422}$ , которое достигает максимального значения равного 0,62. Это свидетельствует о полном связывании mTHPC с М-β-ЦД. Следует отметить, что увеличение концентрации сыворотки в 5 раз (от 1 % до 5 %) приводит к ускорению процесса перераспределения и смещению равновесного распределения mTHPC в сторону белков сыворотки. Кроме того, согласно данным хроматографического анализа, присутствие М-β-ЦД не оказывает влияния на распределение mTHPC между основными транспортными сывороточными белками (данные не приведены).

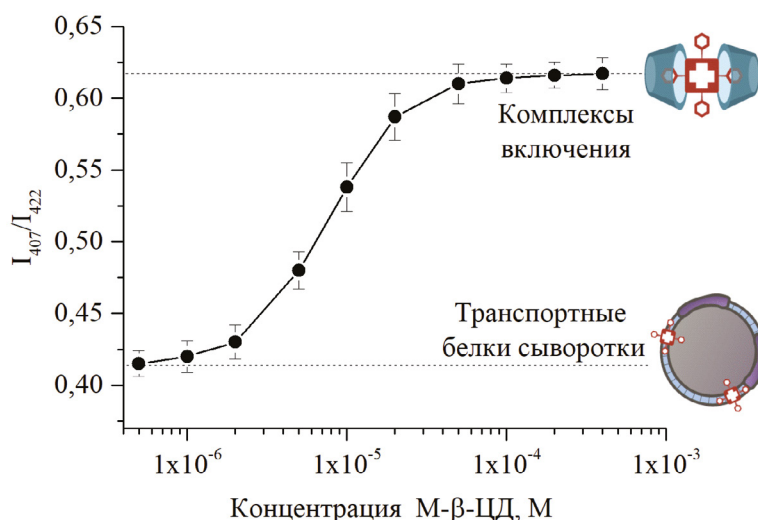


Рис. 3. Зависимость степени поляризации (P) 0,5 мкМ mTHPC в 2 % растворе сыворотки крови от концентрации М-β-ЦД

Fig. 3. Dependence of fluorescence polarization degree (P) of 0,5  $\mu$ M mTHPC in aqueous solution of blood serum (2 %) on M- $\beta$ -CD concentration

*Ускорение процессов перераспределения mTHPC между белками сыворотки.* Как известно, для mTHPC характерна крайне низкая диффузионная подвижность между биологическими структурами и, в частности, белками сыворотки [18]. Так, для перераспределения mTHPC между липопротеинами сыворотки крови требуется от 4 до 6 часов. Столь низкая скорость переноса молекул mTHPC в свою очередь может обуславливать длительность процесса распределения ФС в клеточных и тканевых структурах. В ходе исследования влияния малых концентраций М-β-ЦД на процессы распределения mTHPC в сыворотке крови было обнаружено, что добавление М-β-ЦД в концентрациях, не достаточных для изменения равновесного распределения в сыворотке (2 мкМ), значительно ускоряет процесс перераспределения [4]. Предполагается, что молекулы ЦД выступают в роли «наночелноков» для молекул ФС, облегчая тем самым их перераспределение между биологическими структурами, в том числе между транспортными белками и клеточными мембранами. Молекулы М-β-ЦД облегчают выход ФС из состава комплекса с сывороточными белками и при диссоциации комплекса включения mTHPC/М-β-ЦД молекула ФС последовательно связывается с ближайшей биологической структурой (транспортные белки сыворотки, клеточная мембрана). Таким образом, предполагается, что М-β-ЦД могут оказывать влияние не только на распределение mTHPC между транспортными белками сыворотки крови, но и на процессы его взаимодействия с клеточными и тканевыми структурами.

*Влияние М-β-ЦД на взаимодействие mTHPC с клетками крови.* Молекулы mTHPC обладают высоким сродством к клеткам и клеточным структурам, однако скорость его накопления невысока. Это обусловлено процессами агрегации пигмента в водных растворах, как уже было отмечено, невысокой скоростью

перераспределения mTHPC с сывороточных белков, с которыми связывается ФС, на клетки. Добавление М-β-ЦД при инкубировании ФС с клетками, как оказалось, может приводить как к ускорению, так и к снижению накопления mTHPC в клетках в зависимости от используемой концентрации М-β-ЦД. На рис. 4, приведены данные исследования накопления mTHPC в лейкоцитах крови человека в зависимости от концентрации М-β-ЦД. Присутствие концентраций М-β-ЦД до 10 мкМ приводит к ускорению процесса накопления mTHPC в лейкоцитах почти в 2 раза. Однако дальнейшее увеличение концентрации М-β-ЦД ведет к снижению накопления ФС в клетках по сравнению с максимальной, вплоть до 80 %. Отмеченные эффекты альтерации распределения mTHPC в присутствии М-β-ЦД воспроизводились как для клеток периферической крови человека (лимфоциты, моноциты и нейтрофилы), так и для культуральных опухолевых клеток [4]. Следовательно, в клетках крови имеют прямую корреляцию с процессами накопления ФС в клетках эндотелия сосудов и опухолевых клетках [23].

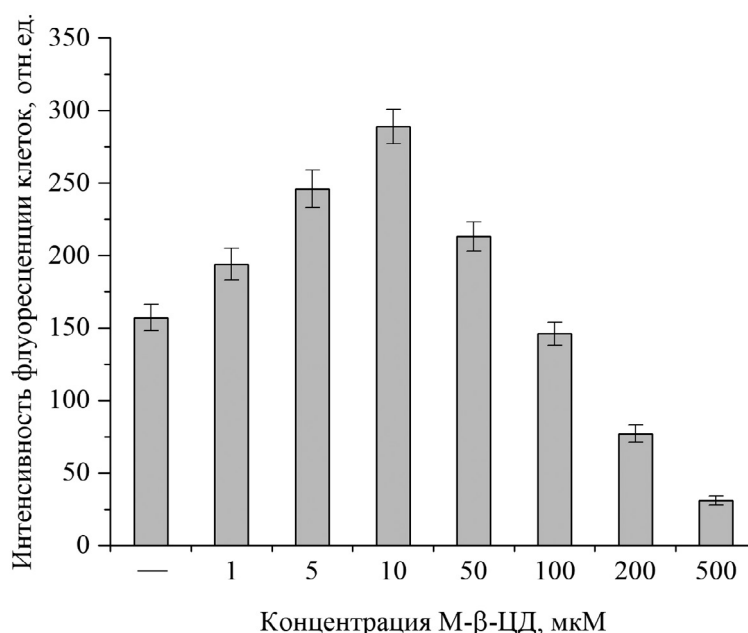


Рис. 4. Влияние М-β-ЦД на скорость накопления mTHPC (10 мкМ) в лимфоцитах крови человека

Fig. 4. Influence of M-β-CD on cellular uptake of 10 μM mTHPC in human blood lymphocytes

*Основные механизмы альтерации ЦД процессов распределения ФС.* Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что М-β-ЦД способен изменять процессы распределения фотосенсибилизатора mTHPC в растворе сыворотки крови. Можно выделить несколько основных механизмов влияния молекул ЦД на процессы распределения mTHPC в крови (рис. 5):

- полная дезагрегация молекул mTHPC в крови;
- ускорение процессов перераспределения ФС между транспортными белками при использовании низких концентраций ЦД;
- снижение «эффективной» концентрации ФС в крови за счет применения высоких концентраций ЦД, способствующих «изоляции» молекул ФС в комплексах включения.

В случае дезагрегации, молекулы ЦД, взаимодействуя с mTHPC, предотвращают агрегацию его молекул и способствуют связыванию ФС с транспортными белками сыворотки крови (рис. 5а). В свою очередь, полная мономеризация ФС способствует увеличению эффективности его транспортировки в клетки и общей фотодинамической активности. Высокие константы ассоциации β-ЦД с mTHPC также позволяют осуществлять ускорение процессов перераспределения между транспортными белками сыворотки крови и другими биологическими структурами (например, клеточными мембранами). В этом случае (рис. 5б), даже небольшие количества β-ЦД способствуют выходу ФС из состава липопротеинов и образованию комплексов включения, которые при диссоциации позволяют молекуле ФС перераспределиться на другие биологические структуры. Данный механизм является основным фактором наблюдаемого ускорения накопления ФС в форменных элементах крови и опухолевых клетках. Использование относительно высоких концентраций ЦД (более 100 мкМ) может привести к «изоляции» молекул ФС в комплексах включения (рис. 5в). В данном случае, после диссоциации комплекса, молекула ФС не успевает связаться с транспортными белками сыворотки или с клеточной мембраной клетки

и образует комплекс включения с  $\beta$ -ЦД. Это может приводить к значительному снижению накопления ФС в клетках, так как предполагается, что  $\beta$ -ЦД и комплексы включения не проникают в клетки [5].

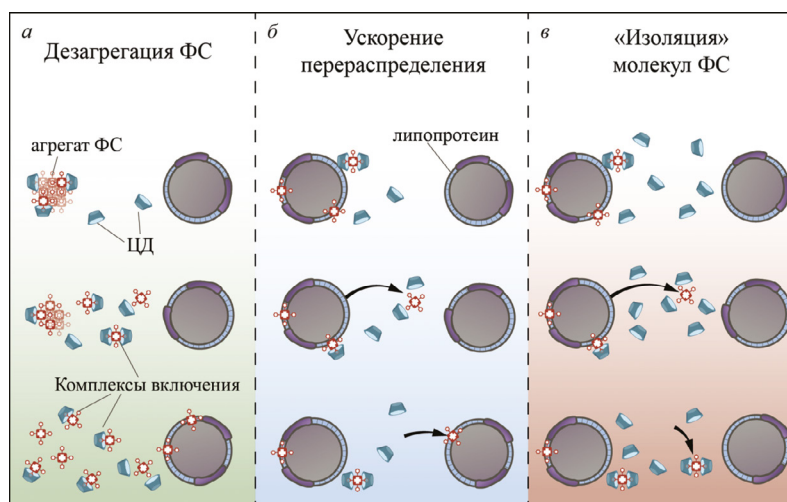


Рис. 5. Схема основных механизмов влияния М- $\beta$ -ЦД на процессы распределения молекул mTHPC в сыворотке крови: а – дезагрегация молекул ФС, б – ускорение перераспределения ФС между транспортными белками сыворотки крови, в – снижение «эффективной» концентрации ФС при образовании значительной фракции комплексов включения

Fig. 5. Scheme of main mechanisms of M- $\beta$ -CD influence on mTHPC distribution processes in blood serum: а – desagregation of photosensitizer molecules, б – acceleration of photosensitizer redistribution between blood serum transport proteins, в – reduction of «effective» photosensitizer concentration upon formation of significant fraction of inclusion complexes

Таким образом,  $\beta$ -ЦД могут быть использованы для альтерации агрегационного состояния и процессов биораспределения фотосенсибилизатора в крови. Основными детерминантами эффективности использования  $\beta$ -ЦД являются их концентрация, а также концентрация сыворотки. Кроме того, варьирование параметрами комплексообразования (константами связывания)  $\beta$ -ЦД с mTHPC возможна более тонкая альтерация процессов распределения mTHPC как в клеточных, так и в тканевых структурах. Предполагается, что использование  $\beta$ -ЦД может также способствовать увеличению проникающей способности mTHPC в опухолевую ткань, а также более эффективному внутритканевому распределению препарата в присутствии  $\beta$ -ЦД.

### Заключение

Были рассмотрены основные механизмы влияния М- $\beta$ -ЦД на процессы распределения mTHPC в крови. Показано, что использование М- $\beta$ -ЦД полностью предотвращает агрегацию mTHPC и увеличивает его биодоступность. Было изучено влияние М- $\beta$ -ЦД на кинетические и равновесные процессы распределения mTHPC в сыворотке крови. Процессы перераспределения mTHPC определяются механизмами конкурентного связывания и носят обратимый характер. Увеличение концентрации М- $\beta$ -ЦД ведет к смещению равновесия в сторону комплексов включения и появлению в сыворотке крови фракции молекул ФС, связанных с М- $\beta$ -ЦД. Показано, что применение М- $\beta$ -ЦД позволяет в 2 раза увеличить накопление в лимфоцитах крови человека за счет ускорения М- $\beta$ -ЦД процессов перераспределения ФС между транспортными белками сыворотки крови, а также благодаря полной мономеризации ФС. Однако было продемонстрировано, что присутствие относительно высоких концентраций М- $\beta$ -ЦД может приводить к значительному снижению накопления ФС в клетках из-за появления фракции ФС, связанного с М- $\beta$ -ЦД, и, соответственно, к снижению «эффективной» концентрации ФС в растворе. Полученные результаты позволяют предположить значительное влияние молекул  $\beta$ -ЦД на процессы проникновения и распределения mTHPC в опухолевой ткани. Рассмотренные механизмы влияния  $\beta$ -ЦД на процессы распределения ФС в крови свидетельствуют о возможности применения  $\beta$ -ЦД для снижения риска развития фотоаллергических реакций в случае применения природных и синтетических ФС при ФДТ.

## Библиографические ссылки

1. Marchal S., El Hor A., Millard M., et al. Anticancer Drug Delivery: An Update on Clinically Applied Nanotherapeutics // *Drugs*. 2015. Vol. 75, № 14. P. 1601–1611.
2. Lee J. H., Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers // *Chem. Eng. Sci.* 2015. Vol. 125. P. 75–84.
3. Stella V. J., He Q. Cyclodextrins // *Toxicol. Pathol.* 2008. Vol. 36, № 1. P. 30–42.
4. Yankovsky I., Bastien E., Yakavets I., et al. Inclusion complexation with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives alters photodynamic activity and biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin // *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 91. P. 172–182.
5. Loftsson T., Brewster M. E. Drug Solubilization and Stabilization by Cyclodextrin Drug Carriers // *Drug Deliv. Strat. for Poorly Water-Sol. Drugs* / ed. Douroumis D., Fahr A. John Wiley & Sons Ltd. 2013. P. 67–101.
6. Acartürk F., Çelebi N. Cyclodextrins as Bioavailability Enhancers // *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics and Biomedicine* / ed. Bilensoy E. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2011. P. 45–64.
7. Gidwani B., Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs // *BioMed Res. Int.* 2015. Vol. 2015. P. 198–268.
8. Allison R. R., Sibata C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2010. Vol. 7, № 2. P. 61–75.
9. Kryjewski M., Goslinski T., Mielcarek J. Functionality stored in the structures of cyclodextrin-porphyrinoid systems // *Coord. Chem. Rev.* 2015. Vol. 300. P. 101–120.
10. Demore D., Kasselouri A., Bourdon O., et al. Enhancement of 5,10,15,20-Tetra(m-Hydroxyphenyl)chlorin Fluorescence Emission by Inclusion in Natural and Modified Cyclodextrins // *Appl. Spectrosc.* 1999. Vol. 53, № 5. P. 523–527.
11. Bautista-Sanchez A., Kasselouri A., Descroches M. C., et al. Photophysical properties of glucosylated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2005. Vol. 81, № 3. P. 154–162.
12. Senge M. O. mTHPC – A drug on its way from second to third generation photosensitizer? // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2012. Vol. 9, № 2. P. 170–179.
13. Bonnett R., Charlesworth P., Djelai B. D. et al. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) porphyrin (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1999. № 2. P. 325–328.
14. Яковец И. В., Янковский И. В., Болотина Л. Н., и др. Особенности спектральных характеристик мета-тетра(гидроксифенил)хлорина в биологических системах // *Вестн. БГУ. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика.* 2015. № 2. С. 39–45.
15. Yakavets I., Yankovsky I., Bezdetnaya L., et al. Soret band shape indicates mTHPC distribution between  $\beta$ -cyclodextrins and serum proteins // *Dyes Pigments.* 2017. Vol. 137. P. 299–306.
16. Rezzoug H., Bezdetnaya L., A'amar O., et al. Parameters Affecting Photodynamic Activity of Foscan® or Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) In Vitro and In Vivo // *Lasers Med. Sci.* 1998. Vol. 13, № 2. P. 119–125.
17. Tikhomirov A. M., Shmigol' T. A., Kozhinova E. A., et al. Investigation of aggregates of dyes by the method of resonance light scattering: correction of spectra // *Biofizika.* 2009. Vol. 54, № 5. P. 824–830.
18. Sasnouski S., Kachatkou D., Zorin V., et al. Redistribution of Foscan from plasma proteins to model membranes // *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2006. Vol. 5, № 8. P. 770–777.
19. Jones H. J., Vernon D. I., Brown S. B. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan®) in vivo: correlation with pharmacokinetics // *Br. J. Cancer.* 2003. Vol. 89, № 2. P. 398–404.
20. Glanzmann T., Hadjur C., Zellweger M., et al. Pharmacokinetics of tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin in human plasma and individualized light dosimetry in photodynamic therapy // *Photochem. Photobiol.* 1998. Vol. 67, № 5. P. 596–602.
21. Sasnouski S., Zorin V., Khludeyev I. et al. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1725, № 3. P. 394–402.
22. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers // *Int. J. Biochem.* 1993. Vol. 25, № 10. P. 1369–1375.
23. Maugain E., Sasnouski S., Zorin V., et al. Foscan-based photodynamic treatment in vivo: correlation between efficacy and Foscan accumulation in tumor, plasma and leukocytes // *Oncol. Rep.* 2004. Vol. 12, № 3. P. 639–645.

## References

1. Marchal S., El Hor A., Millard M., et al. Anticancer Drug Delivery: An Update on Clinically Applied Nanotherapeutics. *Drugs*. 2015. Vol. 75, No. 14. P. 1601–1611.
2. Lee J. H., Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem. Eng. Sci.* 2015. Vol. 125. P. 75–84.
3. Stella V. J., He Q. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* 2008. Vol. 36, No. 1. P. 30–42.
4. Yankovsky I., Bastien E., Yakavets I., et al. Inclusion complexation with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives alters photodynamic activity and biodistribution of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 91. P. 172–182.
5. Loftsson T., Brewster M. E. Drug Solubilization and Stabilization by Cyclodextrin Drug Carriers. *Drug Deliv. Strat. for Poorly Water-Sol. Drugs* / ed. Douroumis D., Fahr A. John Wiley & Sons Ltd. 2013. P. 67–101.
6. Acartürk F., Çelebi N. Cyclodextrins as Bioavailability Enhancers. *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics and Biomedicine* / ed. Bilensoy E. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc. 2011. P. 45–64.
7. Gidwani B., Vyas A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. *BioMed Res. Int.* 2015. Vol. 2015. P. 198–268.
8. Allison R. R., Sibata C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2010. Vol. 7, No. 2. P. 61–75.
9. Kryjewski M., Goslinski T., Mielcarek J. Functionality stored in the structures of cyclodextrin-porphyrinoid systems. *Coord. Chem. Rev.* 2015. Vol. 300. P. 101–120.
10. Demore D., Kasselouri A., Bourdon O., et al. Enhancement of 5,10,15,20-Tetra(m-Hydroxyphenyl)chlorin Fluorescence Emission by Inclusion in Natural and Modified Cyclodextrins. *Appl. Spectrosc.* 1999. Vol. 53, No. 5. P. 523–527.

11. Bautista-Sanchez A., Kasselouri A., Descroches M.C., et al. Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2005. Vol. 81, № 3. P. 154–162.
12. Senge M.O. mTHPC – A drug on its way from second to third generation photosensitizer? *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2012. Vol. 9, No. 2. P. 170–179.
13. Bonnett R., Charlesworth P., Djelai B.D., et al. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*. 1999. № 2. P. 325–328.
14. Yakovec, I. V., Yankovsky I. V., Bolotine L. N., et al. Spectral characteristics of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in biological systems. *Vestn. BSU. Seriya 1, Physics. Mathematics. Information Sci.* 2015. No 2. P. 39–45 (in Russ.).
15. Yakavets I., Yankovsky I., Bezdetnaya L., et al. Soret band shape indicates mTHPC distribution between  $\beta$ -cyclodextrins and serum proteins. *Dyes Pigments*. 2017. Vol. 137. P. 299–306.
16. Rezzoug H., Bezdetnaya L., A'amar O., et al. Parameters Affecting Photodynamic Activity of Foscan® or Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) In Vitro and In Vivo. *Lasers Med. Sci.* 1998. Vol. 13, No. 2. P. 119–125.
17. Tikhomirov A. M., Shmigol' T. A., Kozhinova E. A., et al. Investigation of aggregates of dyes by the method of resonance light scattering: correction of spectra. *Biofizika*. 2009. Vol. 54, No. 5. P. 824–830.
18. Sasnouski S., Kachatkou D., Zorin V. et al. Redistribution of Foscan from plasma proteins to model membranes. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2006. Vol. 5, No. 8. P. 770–777.
19. Jones H. J., Vernon D. I., Brown S. B. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan®) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br. J. Cancer*. 2003. Vol. 89, No. 2. P. 398–404.
20. Glanzmann T., Hadjur C., Zellweger M., et al. Pharmacokinetics of tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin in human plasma and individualized light dosimetry in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1998. Vol. 67, No. 5. P. 596–602.
21. Sasnouski S., Zorin V., Khludkev I., et al. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. Vol. 1725, No. 3. P. 394–402.
22. Jori G., Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int. J. Biochem.* 1993. Vol. 25, No. 10. P. 1369–1375.
23. Maugain E., Sasnouski S., Zorin V., et al. Foscan-based photodynamic treatment in vivo: correlation between efficacy and Foscan accumulation in tumor, plasma and leukocytes. *Oncol. Rep.* 2004. Vol. 12, No. 3. P. 639–645.

Статья поступила в редколлегию 29.05.2017  
Received by editorial board 29.05.2017