

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА e_6 С КЛЕТКАМИ

И. В. Янковский

Ранее было показано, что неполярные производные хлорина e_6 диметилловый эфир хлорина e_6 (ДМЭ) и триметилловый эфир хлорина e_6 (ТМЭ) являются хорошими фотосенсибилизаторами (ФС) для целей фотодинамической терапии [1, 2]. Вместе с тем препараты практически не растворимы в водных растворах, что затрудняет их введение. Агрегация этерифицированных производных хлорина e_6 (Хл e_6) в водной среде значительно снижает их фотосенсибилизирующую активность, а также существенно изменяет фармакокинетическое поведение. Решение данных проблем возможно с помощью различных наноразмерных систем доставки неполярных лекарственных препаратов [3]. С клинической точки зрения наиболее подходящей системой являются наноразмерные униламеллярные липидные везикулы (УЛВ) [4]. Применяемые для этих целей УЛВ представляют собой замкнутые сферические структуры с диаметром 50–200 нм, которые образованы униламеллярным бислоем природных или синтетических липидов.

Использование липосомальных систем доставки позволяет не только предотвратить процессы агрегации ФС, но и улучшить их фотосенсибилизирующие свойства и фармакокинетику. Они нетоксичны, биоразлагаемы и их мембрана может сливаться с мембранами клетки, приводя к более эффективной внутриклеточной локализации ФС. В то же время корреляция между размером УЛВ и диаметром пор в капиллярах опухоли позволяет выполнить пассивную доставку препарата [5]. В этой связи представляет интерес изучение механизмов взаимодействия липосомальных форм (ЛФ) введения ФС с клетками и клеточными структурами.

В данной работе представлены результаты исследования процессов взаимодействия с клетками ДМЭ и ТМЭ в органических растворителях и при введении в составе УЛВ. Использовали обычные и стерически стабилизированные УЛВ, приготовленные из димиристоил-фосфатидилхолина (ДМФХ) методом экструзии через мембрану с порами 100 нм. Накопление пигментов в клетках исследовали с использованием проточного цитофлуориметра FC 500 (Beckman Coulter, США), согласно стандартной методике. Характеристики процессов накопления ФС клетками определяли на основании измерений интенсивности флуоресценции в полосе испускания хлоринов. Число поврежденных клеток в образцах устанавливали по данным теста с пропидиум иодидом. Локализацию и накопление ФС в клетках изучали методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии на флуоресцентном микроскопе Leica TCS SPE

(Германия). Работа проведена на лейкоцитах крови доноров, клетках костного мозга больных острым миелобластным лейкозом, культуральных клетках K562 и Raji.

ДМЭ и ТМЭ имеют характерные для соединений хлоринового ряда спектры поглощения с интенсивной полосой Core при 404 нм и длинноволновой полосой поглощения в области 665 нм. Спектры поглощения Хл e_6 и его эфиров в органических растворителях практически совпадают. Для данных ФС характерна интенсивная флуоресценция в области 665–670 нм. Значение квантового выхода (φ) в ацетоне для Хл e_6 и его производных одинаково (18–19%). При переводе в водную среду ДМЭ и ТМЭ происходит значительное падение φ (0,5–1,0%), что, очевидно, связано с агрегацией молекул данных пигментов. Включение данных пигментов в состав УЛВ приводит к полному восстановлению φ до 16–17% [6].

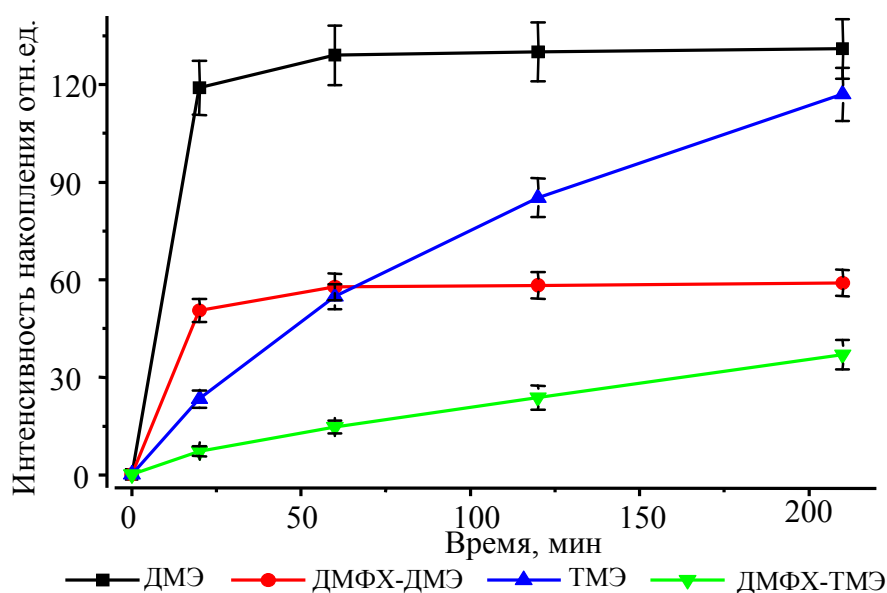


Рис. 1. Кинетика накопления производных Хл e_6 в культуральных клетках Raji: концентрация ФС $5 \cdot 10^{-6}$ М; концентрация ЭСТ 5%

Производные хлорина e_6 характеризуются значительно более высоким сродством к клеткам в сравнении с базовым сенсibilизатором Хл e_6 [1]. Согласно данным цитометрического анализа кинетики накопления ДМЭ и ТМЭ в клетках существенно отличаются: для ДМЭ характерно быстрое увеличение в течение 15–20 минут концентрации в клетках с последующим выходом на плато, в случае ТМЭ наблюдается медленное возрастание концентрации ФС в клетках на протяжении нескольких часов (рис. 1). Использование ЛФ хлоринов существенно не изменяет характер кинетики накопления ДМЭ и ТМЭ, однако наблюдается снижение равновесного уровня окраски клеток в сравнении с ФС, введенным в

составе органического растворителя (рис. 1). Данный эффект особенно заметен при использовании липидных везикул с низкой степенью нагрузки хлоринами и, очевидно, является следствием конкуренции УЛВ и клеточных структур за связывание молекул фотосенсибилизаторов.

Известно, что белки плазмы крови оказывают значительное влияние на процессы распределения порфириновых ФС в клеточных и тканевых системах. В данной работе мы исследовали влияние эмбриональной сыворотки телят (ЭСТ) на кинетику окрашивания клеток ЛФ хлоринов. Согласно полученным результатам добавление сыворотки оказывает разнонаправленное влияние на процессы окрашивания клеток ЛФ ДМЭ и ТМЭ (рис. 2).

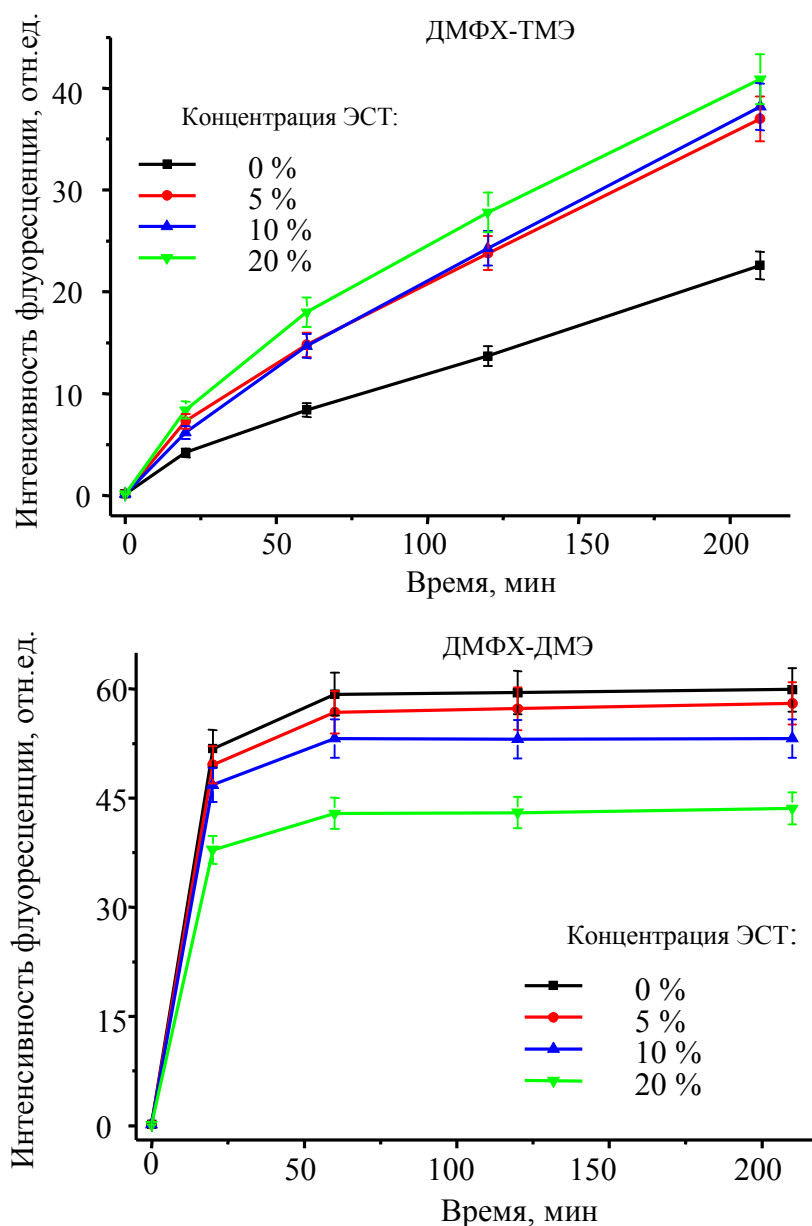


Рис.2. Влияние концентрации ЭСТ на кинетику накопления ЛФ ДМЭ и ТМЭ в культуральных клетках Raji

В случае ЛФ ДМЭ добавление сыворотки сопровождается снижением скорости накопления и равновесного уровня окрашивания хлорином клеток, причем амплитуда изменений пропорциональна концентрации сыворотки в среде инкубирования. Для ЛФ ТМЭ добавление сыворотки в суспензию клеток приводит к значительному ускорению процесса накопления фотосенсибилизатора клетками. В присутствии 5 % сыворотки скорость накопления ТМЭ увеличивается на 60–70 %. Дальнейшее увеличение концентрации сыворотки ведет дополнительно уже к меньшему росту скорости изменения окраски клеток. Следствием различий во влиянии белков сыворотки крови при продолжительном инкубировании клеток в присутствии ЛФ хлоринов является то, что уровень накопления ими ТМЭ значительно превышает накопление ДМЭ. Анализ результатов конфокальной сканирующей флуоресцентной микроскопии показал отсутствие значительных различий в характере внутриклеточной локализации ЛФ ДМЭ и ТМЭ и их органических растворов. В случае ТМЭ в цитоплазме клеток выделяются отдельные области, имеющие интенсивность флуоресценции в десятки раз выше, чем в среднем по цитоплазме. Для ДМЭ наблюдается относительно равномерное распределение ФС в цитоплазме клетки [4].

Включение неполярных производных Хл e_6 в УЛВ оказывает значительное влияние на темновую цитотоксичность данных ФС. Действительно, при инкубировании клеток K562 и Raji в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М сенсibilизатора в течение 5 часов достоверных изменений числа жизнеспособных клеток, оцениваемого по включению витального флуоресцентного индикатора пропидиум йодида, не наблюдалось. Аналогичные исследования с использованием органических растворов хлоринов показали, что более 70% клеток могут быть повреждены в течение 30 минут. Фотохимическая активность ЛФ исследованных хлоринов довольно высока. При малых дозах облучения ($1,1 \text{ Дж/см}^2$) при концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М число погибших клеток Raji составило для ЛФ ДМЭ и ТМЭ 80 ± 8 % и 25 ± 5 %, соответственно.

Таким образом, из полученных результатов следует, что использование липосомальных форм сенсibilизаторов значительно модифицирует процессы их взаимодействия с клеточными культурами, а также фотосенсибилизирующую активность пигментов, что может быть использовано для повышения эффективности фототерапии рака.

Литература

1. Савицкий В. П. Сенсibilизированное тетрапиррольными пигментами фотоповреждение клеток крови в норме и при онкогематологических заболеваниях. Роль структурных характеристик фотосенсибилизатора: Автореф. дис. к-та биол. наук. Мн., 2008.

2. Зорина Т. Е., Янковский И. В., Зорин В. П. Внутриклеточная локализация и накопление этерифицированных производных хлорина e_6 // X Межд. конф. «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» Мн. Апрель 6-7, 2012. С.153–155.
3. Соснов А. В., Иванов Р. В., Балакин К. В., Шоболов Д. Л., Федотов Ю. А., Калмыков Ю. М. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц // Качеств. клинич. практ. 2008. № 2. С. 4–12.
4. Malam Y., Loizidou M., Seifalian A. M. Liposomes and nanoparticles:nanosized vehicles for drug delivery in cancer // Trends in Pharmacological Sciences. 2009. Vol. 30. P. 592–599.
5. Slingerland M., Guchelaar H., Gelderblom H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15years along the road // Drug Disc. Tod. 2012. Vol. 17. P. 160–166.
6. Михаловский И.С. Равновесные и кинетические характеристики распределения порфириновых сенсibilизаторов в биологических мембранах: Автореф. дис. к-та биол. наук. Мн., 2002.