

О.В. ШЕВЧЕНКО, Н.Р. ПАНКРАТОВ, А.П. ФИЛЬШТЕЙН,
М.А. МЕДКОВ, В.И. АПАНАСЕВИЧ, И.Г. ТАНАНАЕВ,
П.А. ЛУКЪЯНОВ

Молекулярные комплексы хлорина Е6 и европия для радиофотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – инновационный метод лечения, применяется, в связи с малой проницаемостью тканей организма для световых квантов лазера, при заболеваниях внешних покровов тела человека (например, меланом и кожных инфекций). Чтобы провести ФДТ опухолей глубинной локализации, нами получены разносоставные многофункциональные комплексы отечественного препарата «Фотодитазин» (хлорин Е6) с европием: бинарный низкоаффинный комплекс хлорина Е6 с Eu^{3+} и более стабильный конъюгат, синтезированный на основе полиэтиленimina с ковалентно связанными хлорином Е6 (хелатором Eu^{3+}) и фолиевой кислотой (для целевой доставки к раковым клеткам с высокой экспрессией рецепторов фолиевой кислоты). Полученные препараты не токсичны в концентрации до 200 мкг/мл. Реактивность хлорина Е6 доказана способностью его комплексов к генерации активных форм кислорода (ROS) при УФ-облучении. Передача энергии люминесценции от ионов Eu^{3+} к молекуле хлорина Е6 подтверждена при гамма-облучении полученных комплексов. Показано, что доза 2 Гр достаточна для эффективной генерации ROS данными конъюгатами при концентрации 25–200 мкг/мл. Это открывает перспективы использования таких препаратов для ФДТ глубоких опухолей при гамма-облучении и, в свою очередь, может повысить результативность стандартной радиотерапии.

Ключевые слова: радиофотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, хлорин Е6, европий, активные формы кислорода, люминесценция, гамма-облучение.

Molecular complexes of chlorin E6 and europium for radiophotodynamic therapy. O.V. SHEVCHENKO^{1,2,3}, N.R. PANKRATOV⁴, A.P. FILSTEIN¹, M.A. MEDKOV², V.I. APANASEVICH⁴, I.G. TANANAEV³, P.A. LUKYANOV¹ (¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, ²Institute of Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, ³Far Eastern Federal University, Vladivostok, ⁴Pacific State Medical University, Vladivostok).

Photodynamic therapy (PDT) is an innovative method of therapy which is applied due to the low permeability of laser light quanta in the tissues of the body in cases of the outer skin diseases (e.g. melanomas and skin infections). Complexes of the domestic drug “Photoditazine” (chlorin E6) with europium were produced for PDT of deep-seated tumors. More specifically, a binary low-affinity chlorin E6 complex with Eu^{3+} and a more stable polyethyleneimine-based conjugate with covalently bound E6 chlorin (Eu^{3+} ion chelator) and folic acid as vector for cancer target cells with high expression of folic acid receptors were obtained. The compositions are non-toxic at a concentration up to 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

*ШЕВЧЕНКО Ольга Вячеславовна – аспирант (Дальневосточный федеральный университет, Владивосток), младший научный сотрудник (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток), ведущий инженер (Институт химии ДВО РАН, Владивосток), ПАНКРАТОВ Никита Романович – студент, АПАНАСЕВИЧ Владимир Иосифович – доктор медицинских наук, профессор (Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток), ФИЛЬШТЕЙН Алина Петровна – младший научный сотрудник, ЛУКЪЯНОВ Павел Александрович – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий отделом (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток), МЕДКОВ Михаил Азарьевич – доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией (Институт химии ДВО РАН, Владивосток), ТАНАНАЕВ Иван Гундарович – член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор (Дальневосточный федеральный университет, Владивосток).

*E-mail: tarakovaolga@gmail.com

Работа выполнена при поддержке Президиума ДВО РАН (грант 18-3-042).

The reactivity of chlorine E6 is proved by the ability of its complexes to generate reactive oxygen species (ROS) under UV irradiation. The transfer of luminescence energy from Eu³⁺ ions to the chlorin E6 molecule is confirmed by gamma-irradiation of the obtained complexes. It has been shown that dose 2 Gy is correct for effective generation of ROS by these conjugates at a concentration of 25–200 µg/ml, which are promising for PDT of deep-seated tumors under gamma irradiation, and, in turn, can increase the effectiveness of standard radiotherapy.

Key words: radiophotodynamic therapy, photosensitizer, chlorin E6, europium, reactive oxygen species, luminescence, gamma radiation.

Введение

Для борьбы со злокачественными новообразованиями разрабатывается огромное количество технологически совершенных и эффективных способов. На сегодняшний день в клинической онкологии широкое применение получили новые методы диагностики и лечения, основанные на достижениях фотохимии, например фотодинамическая терапия (ФДТ). Это стало возможным после изобретения лазерной техники, хотя лекарственные препараты, эффект которых основан на фотохимических свойствах, известны с давних времен: растительные средства, вызывающие фотореакцию в тканях, применяли еще в Древнем Египте 6000 л.н.; для лечения кожных заболеваний использовали природные фотосенсибилизаторы (ФС) из растений (пастернака, петрушки, зверобоя, борщевика и др.) [2]. Эффект фотодинамического воздействия на живые ткани случайно открыл студент-медик Оскар Рааб (Oscar Raab) более 100 лет назад. Изучая влияние флуоресцирующих веществ на инфузории, он обнаружил, что интенсивный свет, направленный на акридиновый краситель, приводит к быстрой гибели этих организмов. Более подробно описать это явление и дать объяснения происходящему удалось его учителю и наставнику профессору Герману фон Таппейнеру (Hermann von Tarpeiner), который ввел понятие «фотодинамический эффект» [4]. На сегодняшний день классическим принято считать определение ФДТ, данное д.м.н. Е.Ф. Странадко, который рассматривает ее как метод локальной активации накопившегося в опухоли фотосенсибилизатора видимым красным светом, что в присутствии кислорода приводит к развитию фотохимической реакции и разрушению опухолевых клеток [1].

На практике метод ФДТ основан на введении онкобольшим ФС, способных избирательно накапливаться преимущественно в опухолевых тканях. В результате при лазерном облучении они вступают в фотодинамические реакции, генерируя активные формы кислорода (ROS), которые вызывают окислительное повреждение клеток опухоли, приводящее к их гибели.

Основное ограничение метода ФДТ – глубина проникновения лазерного излучения в биологическую ткань. Используемые в клинике препараты возбуждают светом в области 620–690 нм. Проницаемость биологических тканей в этом диапазоне незначительна – несколько миллиметров. Известно, что максимальная проницаемость тканей находится в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра (750–1500 нм) [3]. Следовательно, перспективной задачей является создание фотосенсибилизаторов, способных достигать опухолей различной локализации и обеспечивающих эффективную генерацию ROS.

В этом плане возможным решением является использование европия, который может возбуждаться гамма-лучами при проведении радиотерапии и передавать свою энергию люминесценции на хлорин Е6. В свою очередь фотодитазин в комплексе с европием будет интенсивнее генерировать активные формы кислорода при проведении радиофотодинамической терапии глубоко расположенных опухолей. Применение европия, способного к люминесценции при гамма-облучении, в комплексе с фотодитазинном для радиофотодинамической терапии глубоких опухолей еще не исследовано.

Цель нашей работы состоит в том, чтобы получить комплексы фотодитазина с европием различного состава для усовершенствования метода фотодинамической терапии и, в перспективе, развития метода радиофотодинамической терапии.

Методы исследования

Все использованные реактивы были фармакопейной чистоты, химически чистые и чистые для анализа.

Для образования бинарного комплекса Е6 с Eu смешивали растворы фотодитазина (5 мг/мл, коммерческий препарат ООО «ВЕТА-ГРАНД», Россия) и EuCl_3 (100 мг/мл, ИХ ДВО РАН), pH 6,5. Была получена серия растворов с мольным соотношением Е6 : Eu от 10 : 1 до 1 : 10. Для дальнейшей работы взяли раствор с соотношением 4 : 1, его диализировали против дистиллированной воды, после лиофильной сушки выход препарата составлял 92–94 %.

Мультимодалный комплекс на основе полиэтиленimina (PEI) с молекулярной массой 25 тыс. Да синтезировали поэтапным связыванием компонентов с аминогруппами. Для активации карбоксильных групп Е6, диэтилентриаминпентауксусной (ДТРА, Acros, США) и фолиевой (FA, BioChemica, Испания) кислот использовали 1,2 М водорастворимого карбодиимида (Sigma-Aldrich, США), 1,2 моль N-оксисукцинимида (Sigma-Aldrich, США) и 0,12 М 4-диметиламинопиридина (DMAP, Sigma-Aldrich, США) в каждом случае. Фолиевую кислоту присоединяли для целевой доставки комплекса к раковым клеткам (у них высокая экспрессия ее рецепторов). В растворе полученное вещество состава PEI/Е6/ДТРА/FA (мольное соотношение 1 : 1 : 1 : 1) насыщали EuCl_3 при pH 6,5, далее диализировали и лиофильно высушивали, выход конечного продукта составлял 65–75 %.

Оптическую плотность растворов и спектры снимали на планшетном спектрофотометре μ -Quant (BioTec, США), растворы облучали ультрафиолетом при 254 нм с помощью лампы (Kondrad Benda, Германия) на расстоянии 2 см в микропланшете, гамма-облучение проводили с помощью линейного ускорителя TrueBeam STX (Varian, США). Генерацию ROS определяли с помощью флуоресцентного зонда дигидрофлуоресцеина (DHF) в ТИБОХ ДВО РАН на планшетном флуориметре FL-600 (BioTec, США): возбуждение 485 нм, эмиссия 530 нм.

Токсичность препаратов изучали, инкубируя их в различных концентрациях с клетками карциномы молочной железы линии T-47D (ТИБОХ ДВО РАН) в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью тест-системы AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США).

Результаты и обсуждение

При взаимодействии с европием оптическая плотность раствора фотодитазина при характеристической длине волны поглощения 655 нм возрастает. График насыщения образования бинарного комплекса приведен на рис. 1, из которого видно, что стехиометрия комплекса составляет 4 молекулы хлорина Е6 на 1 ион европия. Используя метод Д.М. Чипмана (D.M. Chipman) [5], рассчитали константу связывания – $4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Это низкоаффинное взаимодействие, такие комплексы могут достаточно легко диссоциировать. Полученный конъюгат не способен при диализе проникать через мембрану с эксклюзией 5–6 тыс. Да.

Оба препарата – бинарный и мультимодалный – в видимых спектрах имеют характеристические пики поглощения хлорина Е6 при 400, 500 и 655 нм, что подтверждает его присутствие в комплексах. При УФ-возбуждении была показана генерация ROS в зависимости от концентрации комплексов, результаты для препарата PEI/Е6 см. на рис. 2.

Передача энергии люминесценции в бинарном комплексе от Eu^{3+} к хлорину Е6 доказана при гамма-облучении в дозах 2, 4 и 6 Гр. Генерация ROS при дозе 2 Гр была максимальной (рис. 3), при более высоких дозах, вероятно, происходят разрушение молекул хлорина Е6 и выгорание DHF.

Полученные препараты не токсичны для клеток карциномы молочной железы в концентрациях до 200 мкг/мл.

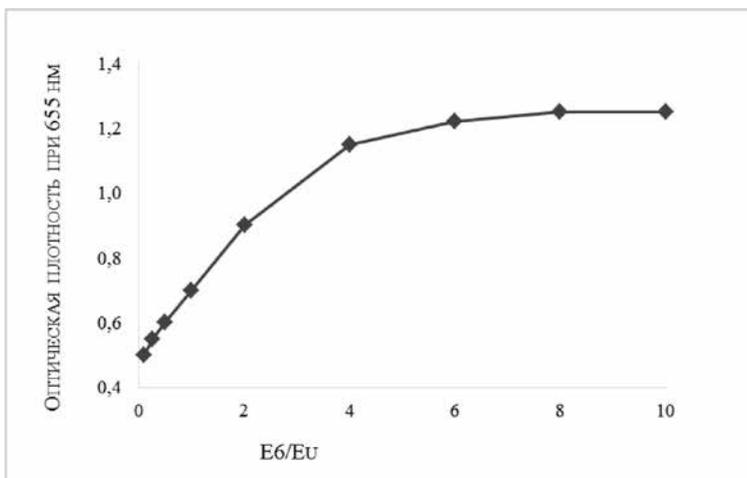


Рис. 1. Оптическая плотность при 655 нм растворов с различным мольным соотношением хлорина Е6 и EuCl_3

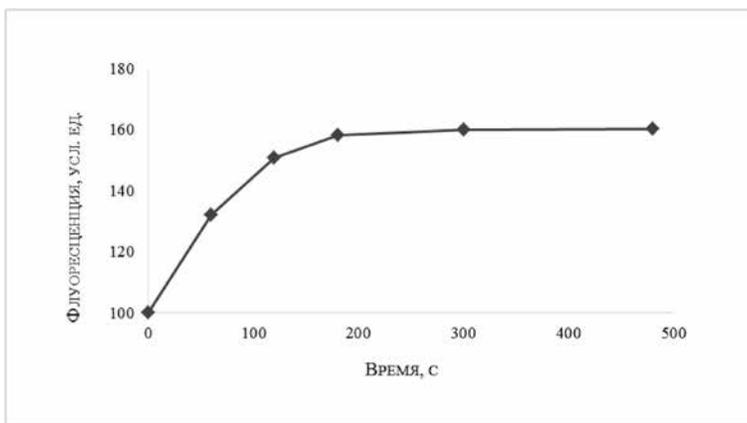


Рис. 2. Зависимость флуоресценции при окислении ДНФ под действием УФ для PEI/E6 (25 мкг/мл) от времени

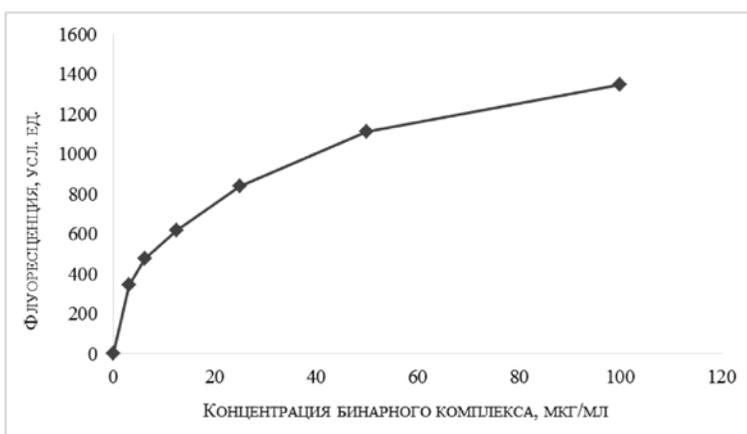


Рис. 3. Зависимость флуоресценции раствора бинарного комплекса Е6 с Eu^{3+} при гамма-облучении от концентрации

Заключение

Таким образом, разработаны методы получения комплексов хлорина Е6 с ионами европия – бинарного и более стабильного на основе полиэтиленimina. Доказана их способность генерировать активные формы кислорода под действием гамма-облучения. Вероятно, препараты могут быть использованы в исследованных концентрациях для радиофотодинамической терапии глубоких опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Странадко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // Лазерная медицина. 2002. № 1. С. 4–8.
2. Хачатурян А.Р., Ярмолинская М.И. Опыт применения флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии наружного генитального эндометриоза // Журн. акушерства и женских болезней. 2016. Т. 65, № 3. С. 64–74.
3. Чунихин А.А. и др. Перспективы совершенствования малоинвазивных лазерных технологий в фотодинамической терапии стоматологических патологий // Рос. стоматология. 2015. Т. 8, № 2. С. 71–74.
4. Шило Р.С., Батвинков Н.И. Фотодинамическая терапия заболеваний гепатобилиарной зоны // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. 2016. № 3. С. 52–57.
5. Shoshan V., Shavit N., Chipman D.M. Kinetics of nucleotide binding to chloroplast coupling factor (CF₁) // Biochim. Biophys. (BBA) – Bioenergetics. 1978. Vol. 504, iss. 1. P. 108–122.