

САМООРГАНИЗУЮЩИЕСЯ СТРУКТУРЫ И НАНОСБОРКИ

УДК 54.056

ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ТРОЙНЫЕ АГРЕГАТЫ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ В СЕБЯ КАРБОЦИАНИНОВЫЙ КРАСИТЕЛЬ И ЛАУРАТ-ИОН, ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДОСТАВКИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ В ТКАНИ

© 2024 г. А. А. Луенкова¹, И. А. Дорошенко¹, Т. А. Подругина¹, М. К. Беклемишев^{1,*}

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: beklem@inbox.ru

Поступила в редакцию 24.09.2023 г.

После доработки 24.09.2023 г.

Принята к публикации 25.10.2023 г.

В целях визуализации гидрофильных лекарственных веществ гентамицина и винорелбина получены флуоресцирующие в ближней ИК-области спектра агрегаты этих соединений с карбоцианиновыми красителями и лаурат-ионом в качестве противоиона. Для выделения агрегатов использовался метод осаждения из водного раствора компонентов. Размер агрегатов с гентамицином составляет от 200 до 600 нм, с винорелбином – от 400 до 1000 нм, тогда как ζ -потенциал поверхности варьирует в диапазоне $-15 \dots -5$ мВ. Агрегаты сорбируются подкожной жировой клетчаткой, мышечной, костной и эндотелиальной тканями кур. В перспективе полученные агрегаты могут быть использованы для визуализации доставки лекарственных веществ в ткани живых организмов.

DOI: 10.56304/S199272232460137X

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность действия лекарственных препаратов отчасти определяется успешностью их доставки в целевые органы и ткани. Используя методы визуализации, возможно получить изображение распределения лекарственного вещества (ЛВ) в организме. Простой и распространенный метод визуализации – введение флуоресцентной метки, например органического красителя.

Визуализация доставки хорошо разработана для гидрофобных соединений и состоит в помещении ЛВ с гидрофобным или амфифильным красителем в амфифильный контейнер. Этот контейнер позволяет доставить лекарство до фармакологической мишени и отразить его местоположение. В качестве полимерной основы применяют алифатические полиэфиры молочной и гликолевой кислот (PLGA) [1, 2], полисахариды [3, 4], поликапролактоны [5]. Например, получали контейнеры для доставки противоракового препарата хлорамбуцила на основе кукурбит [7]урилы, имеющего гидрофобную полость [6]. В ходе высвобождения ЛВ связь с красителем разрушалась, и по интенсивности флуоресценции красителя отслеживали высвобождение лекарства.

Один из распространенных методов получения контейнеров для доставки ЛВ – метод эмуль-

гирования и испарения растворителя. Таким путем получали частицы с полимерной матрицей и гидрофобным ЛВ симвастатином (SIM) с использованием дихлорметана и поливинилового спирта [7]. Размер частиц достигал 230–550 нм, а их ζ -потенциал составил от -29 до -33 мВ.

Кроме того, введение флуоресцентной метки осуществляли простым добавлением флуоресцирующего гидрофобного красителя к наноразмерным самоэмульгирующимся формам ЛВ. Подобным образом получены частицы, включающие в себя липофильный цианиновый краситель и олмесартана медоксомил [8]. Эффективность визуализации оценивали, вводя частицы и свободный краситель в организм мышей. В результате измерений интенсивности флуоресценции метки обнаружили, что лекарство концентрируется в желудке и кишечнике, тогда как свободный краситель быстро выводится из организма.

Гидрофильные ЛВ не удерживаются в амфифильных контейнерах, поэтому для введения флуоресцентной метки используют образование ковалентной связи красителя с ЛВ. Однако свойства молекулы при этом могут значительно изменяться.

В [9] была обнаружена возможность образования тройных агрегатов положительно заряженных ЛВ с карбоцианиновыми красителями и про-

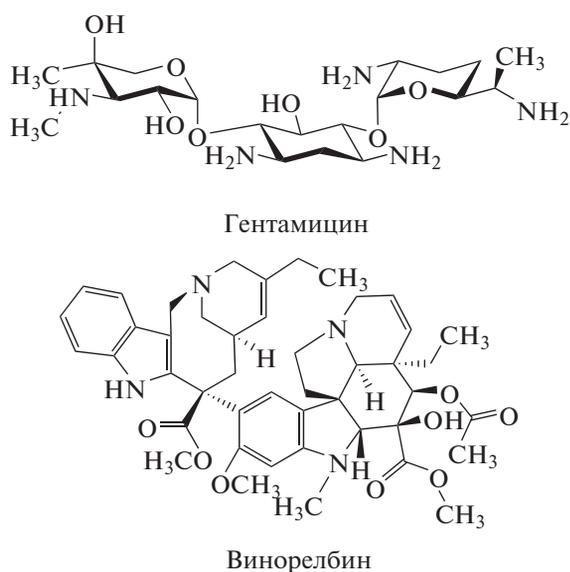


Рис. 1. Структура гентамицина и винорелбина.

тивоионом. Это позволяет ввести флуоресцентную метку в агрегат без формирования ковалентной связи. Интенсивная флуоресценция красителя наблюдается только при его нахождении в составе гидрофобного домена таких агрегатов и отсутствует в случае водной суспензии свободного красителя. В качестве противоиона использовали поверхностно-активные вещества, например цетилтриметиламмония бромид. Исследовалась возможность применения подобных агрегатов в визуализации доставки гидрофильных ЛВ в клетки [10]. Целью настоящего исследования стала визуализация доставки других лекарственных веществ в ткани организма.

В настоящей работе использовали гидрофильные ЛВ: гентамицин, аминогликозидный антибиотик широкого спектра, быстро выводящийся из организма, и винорелбин, применяемый как противоопухолевый препарат, для которого характерны умеренная гемотоксичность и нейротоксичность [11]. Получали тройные агрегаты гентамицина и винорелбина с анионом лауриновой кислоты и карбоцианиновыми красителями, флуоресцирующими в ближней ИК-области спектра, и изучали поглощение этих агрегатов тканями разных типов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и аппаратура

В работе использовали раствор гентамицина (рис. 1; Sigma-Aldrich), водный раствор винорелбина (рис. 1; Синдан-фарм СРЛ, Румыния), раствор лауриновой кислоты “Merck” в этиловом спирте (Брынцалов-А, Москва, Россия). Фосфат-

ный буфер готовили смешиванием 80 мл раствора Na_2HPO_4 и 20 мл раствора KH_2PO_4 , оба раствора имели концентрацию 0.067 М. Использовали деионизированную воду, очищенную на установке Millipore (18 МОм см).

Карбоцианиновый краситель I синтезировали по методике [9] (рис. 2, 3), краситель II (рис. 2) – по схеме, описанной ниже. Красители растворяли в 95%-ном этиловом спирте для получения растворов с концентрацией 1 г/л, которые хранили при 4°C. Разбавляя этанольные растворы водой в 10 раз, получали рабочие растворы, которые использовали в день приготовления. При проведении исследования использовали также гидрофобные красители, структуры которых изображены на рис. 2. Красители IV и X получали в соответствии с [12], красители VII, VIII – в соответствии с [9]. Также использовали коммерческий краситель III (“Люмипроб”, Россия).

Распределение частиц по размеру и их ζ -потенциалы измеряли методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZS (“Malvern Panalytical”, Великобритания). Суспензии гомогенизировали на ультразвуковом гомогенизаторе Sonopuls (Bandelin, ФРГ). Для перемешивания суспензий применяли орбитальный шейкер со скоростью вращения 100–140 об./мин. Для осаждения суспензии центрифугировали в пробирках типа “Эппендорф” объемом 2 мл на центрифуге Elmi (Латвия) при скоростях от 10 до 13 тыс. об./мин.

Флуоресценцию в ближней ИК-области спектра регистрировали, используя самодельный визуализатор, включающий в себя светодиодный источник излучения (одиннадцать красных светодиодов мощностью 3 Вт и с максимумом излучения 660 нм; Минифермер, Россия), цифровую фотокамеру Canon 350D со светофильтром, пропускающим излучение с длиной волны выше 700 нм (photodrom.com), и светонепроницаемый кожух.

Методика эксперимента

Для получения красителя II синтезировали 3-децил-1,1,2-триметил-1Н-бензо[Е]индол-3-ия иодид (рис. 3), для чего смешивали 0.5 г (2.4 ммоль) 1,1,2-триметил-1Н-бензо[е]индола, 1.2 г (7.2 ммоль) иодида калия и 2.9 мл (14.4 ммоль) 1-хлордекана в 3 мл ацетонитрила. Смесь нагревали 18 ч при 72°C, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 150 мл диэтилового эфира и перемешивали 4 ч. Выпавший осадок соли отфильтровывали и высушивали. Выход: 0.8 г (69%), темно-зеленый порошок.

Полученную соль массой 0.1 г (0.2 ммоль) поместили в виалу, содержащую 0.08 г (0.3 ммоль) N-((1E)-3-(фенилимино)проп-1-ен-1-ил)ани-

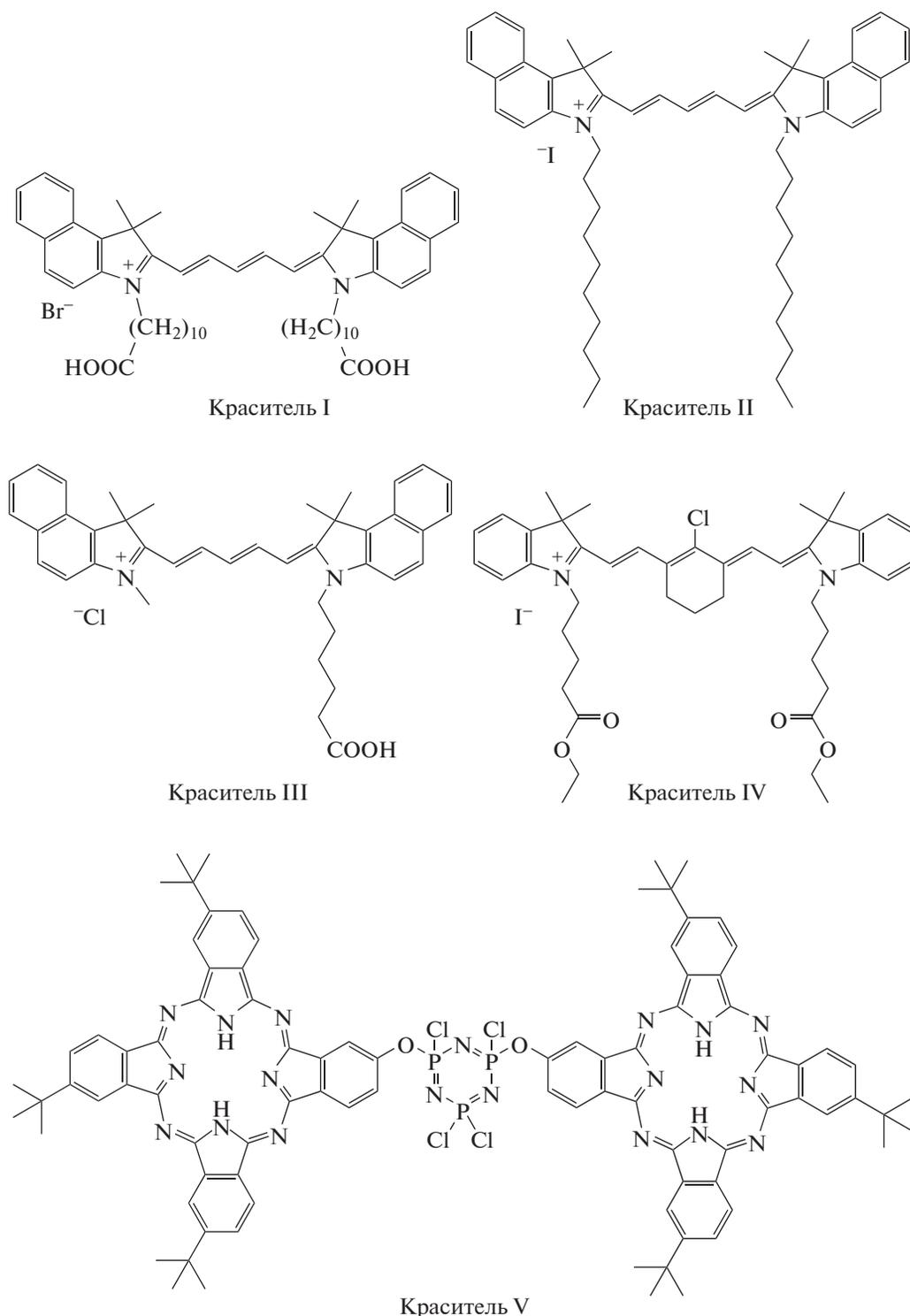


Рис. 2. Структуры красителей I–X.

лина гидрохлорида (Сигма-Алдрич). Полученную смесь растворили в 1 мл уксусного ангидрида и нагревали при 120°C 30 мин. Затем к раствору добавили еще 0.14 г (0.3 ммоль) 3-децил-1,1,2-триметил-1H-бензо[e]индол-3-ия иодида в 1 мл

пиридина и нагревали 30 мин при 120°C. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры и осаждали продукт диэтиловым эфиром. Краситель очищали с помощью флеш-хроматографии на силикагеле в системе

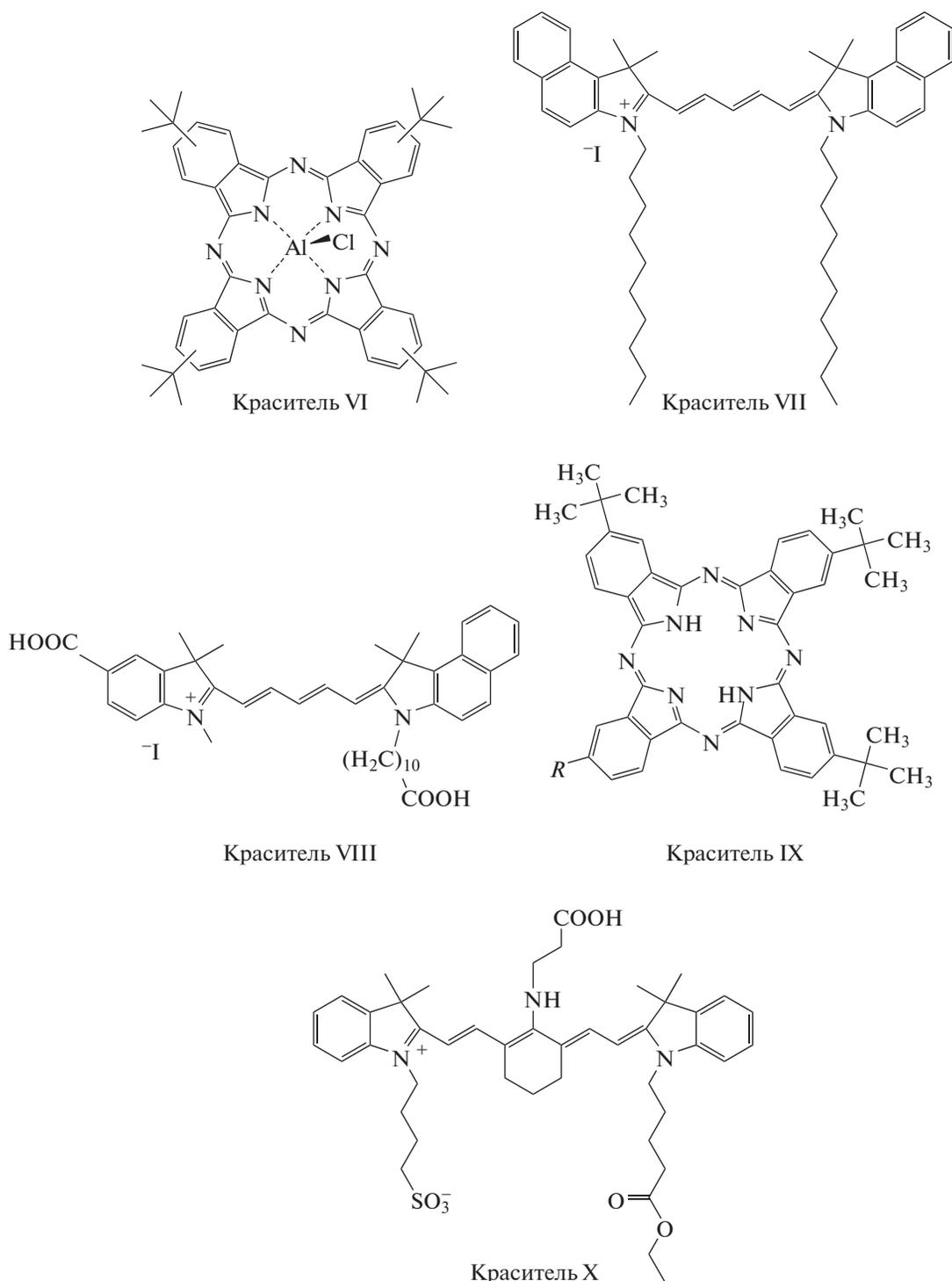


Рис. 2. Окончание.

CH_2Cl_2 : *MeOH* (50 : 1 об.). Выход: 0.064 г (15%), темно-синий порошок. $\lambda_{\text{abs}} = 680$ нм (в метаноле), $\lambda_{\text{fl}} = 714$ нм (в этаноле), $\varepsilon = 1.8 \times 10^5$ л моль см^{-1} .

Тройные агрегаты гентамицина (**Gen**) и винокорбина (**Vb**) с карбоцианиновыми красителями I и II (**Кр-I** и **Кр-II**) и анионом лауриновой кислоты

получали смешиванием растворов компонентов с последующим выдерживанием смеси при 5°C в течение суток. При этом концентрацию гентамицина варьировали от 0.001 до 0.002 М, лауриновой кислоты – от 0.001 до 0.003 М, красителей – от 0.02 до 0.036 г/л, концентрация раствора винокорбина составляла 0.00094 М.

Образовавшийся осадок промывали дистиллированной водой и центрифугировали в течение 5–10 мин при 10–13 тыс. об./мин. Осадок диспергировали посредством ультразвука, полученную суспензию добавляли к образцам тканей кур. Все эксперименты проводили в фосфатном буферном растворе с рН 7.3–7.4 и исходной концентрацией 1/15 М.

Получение изображений

Пробирки с контейнерами и образцами тканей помещали на орбитальный шейкер и через определенные промежутки времени фотографировали их вместе с содержимым с помощью ИК-визуализатора, установив выдержку 1/6 или 1/20 с. Сразу после получения изображений образцы тканей извлекали из растворов, располагали на белой поверхности и вновь фотографировали, после чего возвращали образцы в растворы и продолжали перемешивание на шейкере. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программ GIMP-2.8, Paint 3D и ImageJ.JS. Для количественного определения интенсивности флуоресценции использовали гистограмму канала яркости в программе GIMP-2.8, где каждому пикселю в выбранной области изображения соответствует значение от 0 до 255.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор красителя и противоиона

Для проведения эксперимента необходимо было получить агрегаты *краситель–противоион–лекарственное вещество*, которые флуоресцировали бы только в присутствии ЛВ. Для выбора удовлетворяющих этому требованию сочетаний компонентов провели скрининговое исследование. В ячейках планшета готовили растворы с концентрациями компонентов, указанными выше, и регистрировали интенсивность их флуоресценции. Результаты скрининга для выбора красителя и противоиона с целью получения сигнала Gen приведены на рис. 4.

Как видно из рис. 4, красители VIII и X флуоресцируют вне зависимости от аниона и присутствия Gen. Интенсивность эмиссии красителей VII и IX во всех системах очень низкая, флуоресценция красителя IV зависит от природы аниона (максимальна в случае холата), но не зависит от присутствия Gen. Различие в интенсивностях флуоресценции в отсутствие или в присутствии антибиотика наиболее значительно для красителей I и II с додецилсульфатом или лауриновой кислотой. Для дальнейших экспериментов выбрали красители I и II и лауриновую кислоту (LA) ввиду ее потенциально лучшей биосовместимости, чем у додецилсульфата.

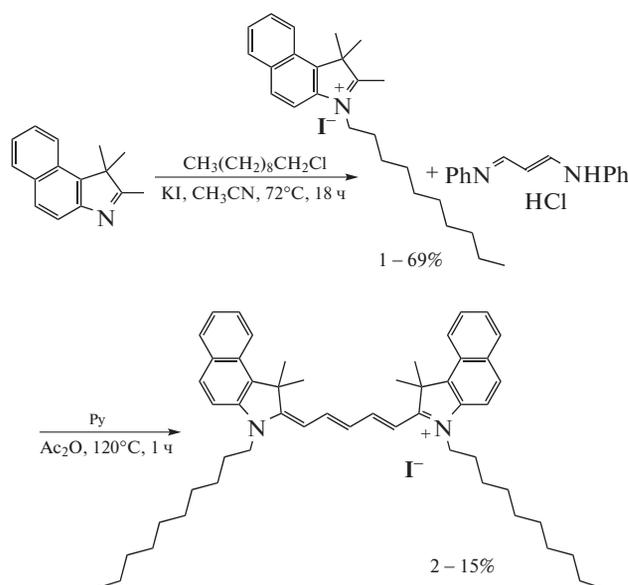


Рис. 3. Схема синтеза красителя II.

Аналогичное исследование провели для виорелбина (рис. 5), исключив красители, эмиссия которых не зависела от состава раствора в опытах с гентамицином (VIII, IX и X). Кроме того, дополнительно провели эксперимент с полигексаметиленгуанидином (ПГМГ), так как предыдущие опыты свидетельствовали о необходимости ввода дополнительного катиона для получения яркой флуоресценции.

ПГМГ нивелировал влияние виорелбина на флуоресценцию красителей; в отсутствие ПГМГ наблюдали эмиссию только красителей I, II и III. Более высокое отношение интенсивности флуоресценции в присутствии Vb к интенсивности флуоресценции в контрольном опыте характерно для красителя II в системе без ПГМГ, поэтому в последующих опытах ПГМГ не применяли.

Таким образом, установили, что наилучшее сочетание компонентов для получения флуоресцирующих тройных агрегатов как с гентамицином, так и с виорелбином – анион лауриновой кислоты и красители I или II.

Получение тройных агрегатов

Тройные агрегаты гидрофильных ЛВ (Gen и Vb), в состав которых также входят гидрофобный краситель и амфифильный лаурат-ион, необходимы для контроля местоположения лекарства по флуоресценции красителя, входящего в агрегат. Флуоресцирующие тройные агрегаты *гентамицин (виорелбин)–краситель II–лаурат* получают при смешении растворов всех трех компонентов, причем сначала образуются растворы наночастиц, которые со временем коагулируют, формируя осадок. При этом использование красителя I в

	VII	I	III	IV	II	VIII	X	IX	VI	V	
Глицирризинат											Контроль
Додецилсульфат	48	118	56		64					33	
Декановая кислота											
Холевая кислота											
Лауриновая к-та	92	122			64						
Глицирризинат											С гентамицином
Додецилсульфат	227	227	152		187					111	
Декановая кислота											
Холевая кислота											
Лауриновая к-та	176	207			118						

Рис. 4. Влияние пяти анионов на флуоресценцию II красителей в присутствии гентамицина (нижние пять рядов) и без него (верхние пять рядов). Указаны средние значения канала яркости (отн. ед.).

	I	III	IV	II	VI	V	I	III	IV	II	VI	V	
Глицирризинат													Контроль
Додецилсульфат	46	28		51			242			254			
Холат													
Лауриновая к-та	53	223		56			240			253			
Глицирризинат													С винорелбином
Додецилсульфат	89	160		86			251			253			
Холат													
Лауриновая к-та	247	166		249		66	240			250			
	Контроль						С ПГМГ						

Рис. 5. Влияние анионов, винорелбина и полигексаметиленгуанидина на флуоресценцию красителей. Указаны средние значения канала яркости (отн. ед.).

случае агрегатов с Gen не позволяет получить осадок, что делает невозможным выделение контейнеров и их отмывку от не агрегировавших компонентов раствора. В остальных системах осадки были выделены, промыты и ресуспендированы в фосфатном буферном растворе (рН 7.4)

Характеристики тройных агрегатов

Полученные агрегаты (табл. 1) имеют отрицательный заряд: ζ -потенциал поверхности состав-

ляет от -5 до -15 мВ. Размер агрегатов Gen с LA и красителем II составляет от 200 до 600 нм, с винорелбином – от 400 до 1000 нм (рис. 6), что не пре-

Таблица 1. ζ -потенциал поверхности частиц гентамицин (винорелбин)–краситель II (I)–лаурат

Тройной агрегат	Образец 1, мВ	Образец 2, мВ
Gen/Кр-II/LA	-9 ± 2	-10 ± 4
Vb/Кр-I/LA	-10 ± 2	-7 ± 2

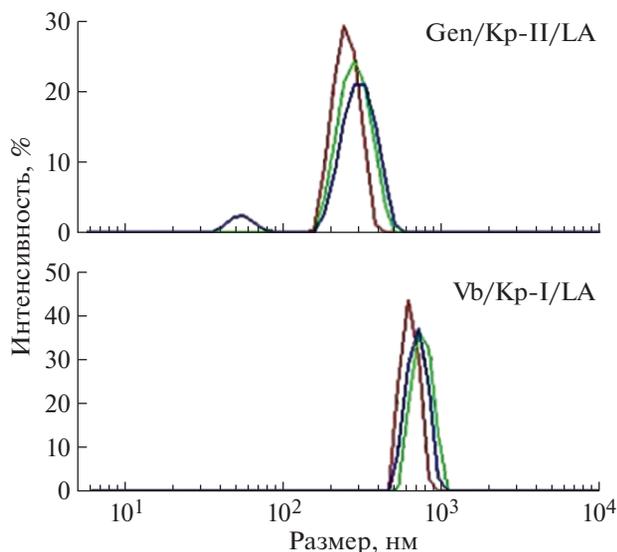


Рис. 6. Распределение по размеру агрегатов краситель II–гентамицин–лаурат (верхний ряд) и краситель I–винорелбин–лаурат (нижний ряд).

вышает диаметр капилляра. Воспроизводимость и ζ-потенциала поверхности, и размера частиц выше в случае контейнеров с винорелбином, что установлено при изучении идентичных образцов (табл. 1). В целом результаты исследования физических характеристик тройных агрегатов (рис. 6, табл. 1) не опровергают их возможную биосовместимость.

Сорбция тройных агрегатов тканями кур

Изучили влияние компонентов раствора на эмиссию красителя в зависимости от времени (рис. 7). Для этого приготовили все возможные

комбинации красителя, ЛВ и аниона лауриновой кислоты для систем Gen/Kp-II/LA и Vb/Kp-I/LA.

Выявили, что интенсивность флуоресценции тройных агрегатов возрастает со временем во всех системах. Так, за 1 ч сигнал возрастает более чем в 2 раза. Таким образом, на изменение интенсивности эмиссии вследствие сорбции контейнеров тканями кур накладывается разгорание их флуоресценции со временем. В результате при погружении образцов тканей в суспензии агрегатов изменение сигнала было разнонаправленным (рис. 8). По-видимому, падение интенсивности флуоресценции содержимого пробирок с агрегатами с Vb обусловлено высокой скоростью сорбции этих агрегатов, а в случае агрегатов с Gen определяющим фактором оказалось разгорание флуоресценции красителя.

В ходе изучения сорбции контейнеров тканями кур получили также карты распределения яркости флуоресценции (рис. 9). Агрегаты с Vb сорбировались в большей степени, чем с Gen, что может быть обусловлено меньшей концентрацией агрегатов с Gen в суспензии из-за их высокой адгезии к поверхности пластиковых пробирок. Сравнив интенсивность флуоресценции тканей после сорбции агрегатов, обнаружили, что агрегаты с Vb полнее сорбируются мышечной тканью, а с Gen – кожей, содержащей преимущественно жировую ткань.

Полученные изображения дают повод полагать, что сорбции контейнеров тканью способствуют жиры и белки, которые в костной ткани представлены в меньшем количестве, чем в других тканях. Тем не менее тройные агрегаты сорбируются всеми исследованными тканями, что позволит следить за распространением ЛВ в организме.

t, мин	0	1	3	5	10	15	20	30	40	50	60
Gen/Kp-II/LA	102	122	143	162	191	209	226	237	240	247	249
Gen/Kp-II	42	47	60	73	69	74	80	85	83	92	88
Kp-II/LA	42	47	49	52	54	56	60	66	67	74	75
Vb/Kp-I/LA	204	235	250	253	255	255	254	254	255	255	255
Kp-I/LA	35	39	45	51	53	56	63	72	70	82	80
Vb/Kp-I	65	71	67	66	65	64	69	76	76	87	86

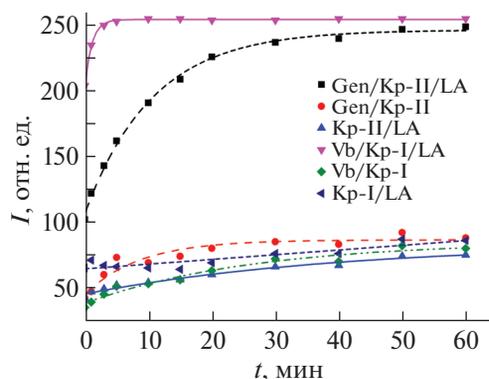


Рис. 7. Изменение интенсивности флуоресценции красителей I и II с течением времени в присутствии лауриновой кислоты, гентамицина и винорелбина: фото лунок планшета при различном времени после смешения растворов (слева) и график зависимости интенсивности ближней ИК-флуоресценции от времени (справа). Указаны средние значения канала яркости (отн. ед.).

	Без тканей	0 мин	5 мин	45 мин
Gen/Kp-II/LA	86	101	121	124
Vb/Kp-I/LA	231	223	214	193

Рис. 8. Изменение интенсивности флуоресценции содержимого пробирок (приведено в виде цифр) с течением времени. Верхний ряд – контейнеры с Gen, флуоресценция усиливается. Нижний ряд – интенсивность флуоресценции падает из-за концентрирования контейнеров в помещенных в раствор тканях. Указаны средние значения канала яркости (отн. ед.).

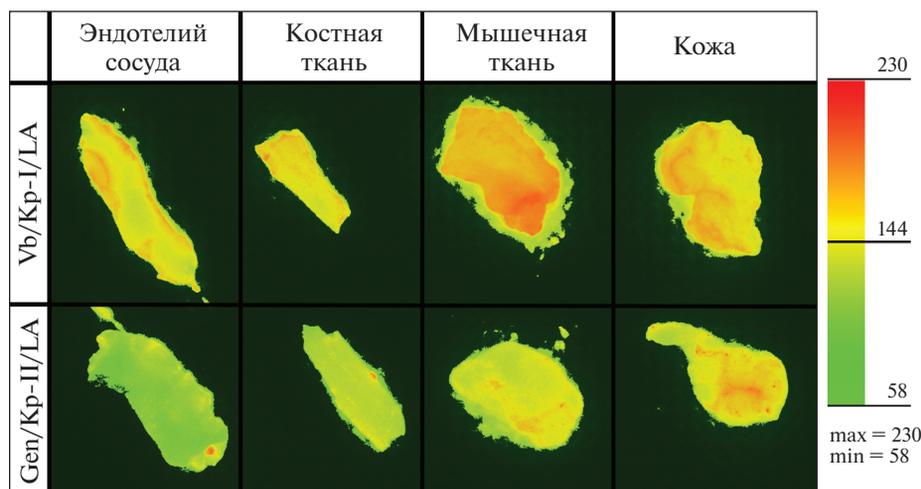


Рис. 9. Визуализация сорбции контейнеров, содержащих винорелбин (верхний ряд) и гентамицин (нижний ряд), тканями кур. Сорбцию проводили в течение часа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Агрегаты катионных лекарственных веществ гентамицина и винорелбина с анионом лауриновой кислоты и карбоцианиновыми красителями, получаемые осаждением из водного раствора, сорбируются тканями, что в дальнейшем позволит визуализировать доставку этих ЛВ в ткани организмов. Результаты исследования физических характеристик частиц (размера и ζ -потенциала поверхности) не опровергают предположения о биосовместимости изученных агрегатов, что делает возможным переход от экспериментов *in vitro* к *in vivo*.

Авторы выражают благодарность проф. А.Ю. Толбину за предоставление фталоцианинов (красители V, VI и IX).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Panyam J., Labhasetwar V. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2003. V. 55. P. 329. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4)
2. Wu J., Williams G.R., Branford-White C. et al. // Eur. J. Pharm. Sci. 2016. V. 92. P. 28. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.018>
3. Liang F., Sun C., Li S. et al. // Carbohydr. Polym. 2021. V. 269. 118334. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118334>
4. Khalaf Delan W., Zakaria M., Elsaadany B. et al. // Intern. J. Pharm. 2020. V. 577. 119038. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119038>
5. Liparoti S., Franco P., Pantani R., De Marco I. // Mater. Sci. Eng. C. 2021. V. 123. 112036. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112036>

6. Sun Y., Chen Y., Dai X., Liu Y. // Asian J. Org. Chem. 2021. V. 10. P. 3245.
7. Samstein R.M., Perica K., Balderrama F. et al. // Biomater. 2008. V. 29. P. 703.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.026>
8. Komesli Y., Yildirim Y., Karasulu E. // Drug Metab. Pharmacokinet. 2021. V. 36. 100365.
<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.10.004>
9. Zakharenkova S.A., Katkova E.A., Doroshenko I.A. et al. // Spectr. Acta A. 2021. V. 247. 119109.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119109>
10. Zakharenkova S.A., Lebedeva M.I., Lebedeva A.N. et al. // Molecules. 2021. V. 26. № 24. P. 7426.
<https://doi.org/10.3390/molecules26247426>
11. Steger G.G., Dominguez A., Dobrovolskaya N. et al. // Clin. Breast Cancer. 2017. V. 18. № 1. P. 41.
<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.05.012>
12. Doroshenko I.A., Aminulla K.G., Azev V.N. et al. // Mendeleev Commun. 2021. V. 31. № 5. P. 615.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2021.09.008>