

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА
НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 546.03+615.038

ЕВРОПИЙСОДЕРЖАЩИЙ КОНЬЮГАТ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ
ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

© 2022 г. О. В. Шевченко^{a, b, c, d, *}, Н. Г. Плехова^b, М. А. Медков^c, К. А. Паричук^b,
В. И. Апанасевич^b, И. Г. Тананаев^d, А. А. Юдаков^c, П. А. Лукьянов^a

^aТихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
пр-т 100 лет Владивостоку, 159, Владивосток, 690022 Россия

^bТихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России,
пр-т Острякова, 2, Владивосток, 690002 Россия

^cИнститут химии ДВО РАН, пр-т 100 лет Владивостоку, 159, Владивосток, 690022 Россия

^dДальневосточный федеральный университет, о. Русский, п. Аякс, 10, Владивосток, 690922 Россия

*e-mail: tarakovaolga@gmail.com

Поступила в редакцию 09.02.2022 г.

После доработки 22.03.2022 г.

Принята к публикации 30.03.2022 г.

Стремительный рост числа онкологических заболеваний обосновывает необходимость создания новых терапевтических средств и методов. Из-за невозможности проникновения лазерного света в ткани глубже 3 мм фотодинамическая терапия применяется для лечения поверхностных заболеваний. Цель исследования: охарактеризовать физико-химические свойства нового молекулярного конъюгата PEI/E6/DTPA/FA/Eu на основе фотосенсибилизатора Хлорина Е6, модифицированного европием, и оценить его фототоксическое действие на клетки асцитной опухоли Эрлиха. Установлено, что при 5-минутном облучении длиной волны 645 нм и энергией 6 Дж/см² синтезированный молекулярный конъюгат PEI/E6/DTPA/FA/Eu генерирует активные формы кислорода в 5.1 раза интенсивнее, чем свободный Хлорин Е6. На 4-е сут после фотодинамического воздействия с PEI/E6/DTPA/FA/Eu показатель гибели клеток составил 75%, в то время как с Хлорином Е6 – только 24%.

Ключевые слова: молекулярный конъюгат, Хлорин Е6, красный свет, фотодинамическая терапия, клетки Эрлиха

DOI: 10.31857/S0044457X22090112

ВВЕДЕНИЕ

Выдающиеся успехи в области терапии злокачественных новообразований в последние десятилетия обусловлены разработкой новых препаратов и методов лечения, а также модификацией широко используемых методов для повышения их эффективности. Фотодинамическая терапия (ФДТ) зарекомендовала себя как действенный способ лечения новообразований различной природы. Одной из ключевых проблем метода является ограниченная область его применения. Светочувствительные вещества (фотосенсибилизаторы, ФС), являющиеся неотъемлемым компонентом терапии, имеют максимумы поглощения в области до 700 нм. Следовательно, возбуждающий их красный свет лазера не способен проникать в ткани глубже, чем на 3 мм. Это обуславливает применение ФДТ, в основном, для поверхностно локализованных заболеваний [1–5].

Синтезирован молекулярный конъюгат, имеющий в составе широко применяемый ФС хлорин нового ряда Хлорин Е6 и ионы европия [6, 7]. Предполагалось, что при воздействии излучения за счет передачи энергии от европия к Хлорину Е6 будет повышаться эффективность терапии из-за более интенсивной генерации супероксидного аниона (O₂⁻), разрушающего опухолевые клетки [8], рис. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез молекулярного конъюгата полиэтиленмин/Хлорин Е6/ диэтилентриаминпентауксусная кислота/фолиевая кислота/европий (PEI/E6/DTPA/FA/Eu) осуществляли по ранее разработанной методике [6, 7].

Исследование функциональности препаратов. Одним из способов регистрации активных форм кислорода (АФК) является применение флуорес-

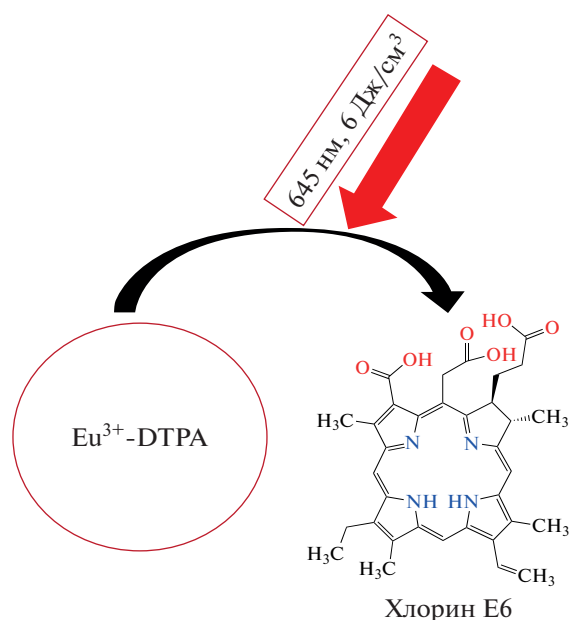


Рис. 1. Ферстеровский перенос энергии от донора (европий) к акцептору (Хлорин Е6) при воздействии длины волны красного света 645 нм.

центных зондов. Хлорин Е6 и PEI/E6/DT-PA/FA/Eu вносили в 96-луночный планшет по 100 мкл, добавляли по 4 мкл/ячейку 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина и облучали в течение 15 мин красным светом 645 нм. Регистрацию параметров флуоресценции проводили при облучении 485 нм и флуоресценции при 530 нм.

Исследование фотоцитотоксичности. Клетки асцитной аденокарциномы Эрлиха в концентрации 1×10^6 кл/мл инкубировали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (Lonza, Verviers, Бельгия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies Inc., США) и 0.05% гентамицина (Sigma Aldrich, США), со свободным Хлорином Е6 и PEI/E6/DTPA/FA/Eu в различных концентрациях (1.56, 3.125, 6.25, 12.5 мкг/мл) в течение суток в термостате при 37°C, 5% CO₂. Непоглощенные соединения удаляли путем отмывания монослоя средой и облучали красным светом длиной волны 645 нм (полупроводниковый лазер) в течение 15 мин по аналогии с реальной процедурой ФДТ. Через сутки после облучения в каждую лунку вносили по 20 мкл Resazurin, инкубировали 3 ч и определяли оптическую плотность образцов при 570 нм. Жизнеспособность клеток определяли на 2, 3 и 4 сут.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office (Excel) и Prism 7 (GraphPad Software Inc. v.7, Сан-Диего, США).

Характеристика методов исследования. Для синтеза молекулярного конъюгата использовали

ФС Хлорин Е6 (ООО "Вега-Гранд", Россия); полиэтиленимин (PEI, 25000 Da, Sigma Aldrich, США), диэтилтриаминапентауксусную кислоту (DTPA, Acros, США); фолиевую кислоту (FA, Bio-Chemica, Испания); 1-Ethyl-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC)/водорастворимый карбодиимид (WSC, Sigma-Aldrich, США); N-гидроксисукцинимид и 4-диметиламинопиридин (DMAP, Sigma-Aldrich, США). На финальном этапе синтеза конъюгаты насыщали раствором хлорида европия (EuCl₃, Sigma-Aldrich, США). Низкомолекулярные соединения удаляли из конъюгатов с использованием мелкопористых мембран (6–8 кДа, SpectraPor, США) против дистиллированной воды.

Спектры поглощения и флуоресценции записывали на спектрофлуориметре Synergy H1 (BioTek, США). Для исследования качественного и количественного элементного состава использовали метод растровой электронной микроскопии. В качестве флуоресцентного зонда применяли 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин (Sigma-Aldrich, USA).

Энергодисперсионные спектры получали на электронном сканирующем микроскопе S5500 Hitachi (Япония).

Исследование фототоксичности синтезированного препарата осуществляли на клеточной линии асцитной аденокарциномы Эрлиха (Ehrlich ascitic tumor, EAT) при облучении препаратов красным светом длиной волны 645 нм от полупроводникового лазера (ОАО "Свет и жизнь", Россия), дозой облучения 6 Дж/см². Жизнеспособность клеток определяли с помощью Resazurin (Abscam, США) согласно протоколу производителя [9]. Апоптотические клетки определяли после окрашивания Аннексин V/йодидом пропидия (BioLegend, США) с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Observer (Carl Zeiss, Германия) [10, 11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерные для Хлорина Е6 полосы поглощения с максимумами при 405, 503 и 662 нм, присутствующие в спектрах рис. 2, позволяют сделать заключение о его наличии в составе синтезированных структур [12]. В процессе синтеза в структуру молекулярного конъюгата была введена фолиевая кислота. Известно, что онкотрансформированные клетки гиперэкспрессируют рецептор фолиевой кислоты в большом количестве [13]. В связи с этим, фолиевая кислота широко используется в качестве диагностического и терапевтического агента для визуализации и обеспечения адресной доставки в опухоли [14, 15]. В спектрах синтезированного синтона PEI/E6/DTPA/FA и финального конъюгата PEI/E6/DTPA/FA/Eu присутствуют полосы по-

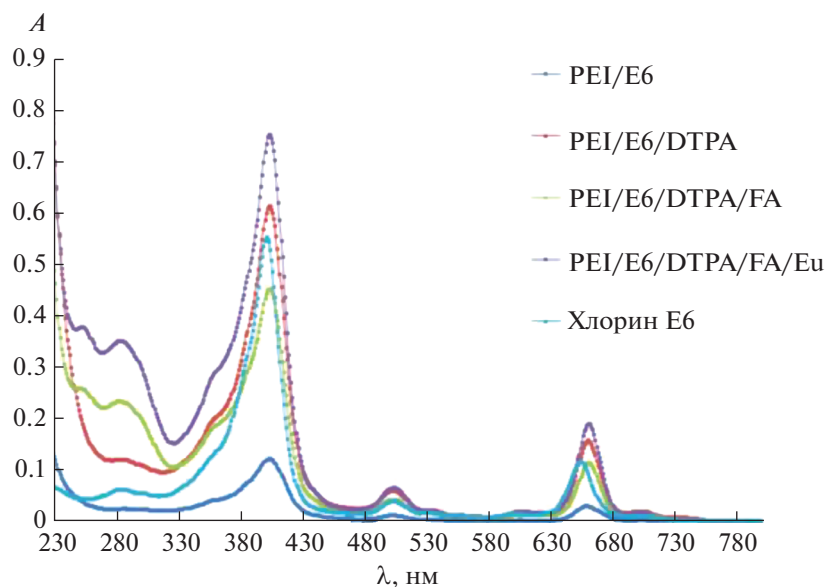


Рис. 2. Спектры поглощения в фосфатно-солевом буфере pH 7.4 после диализа.

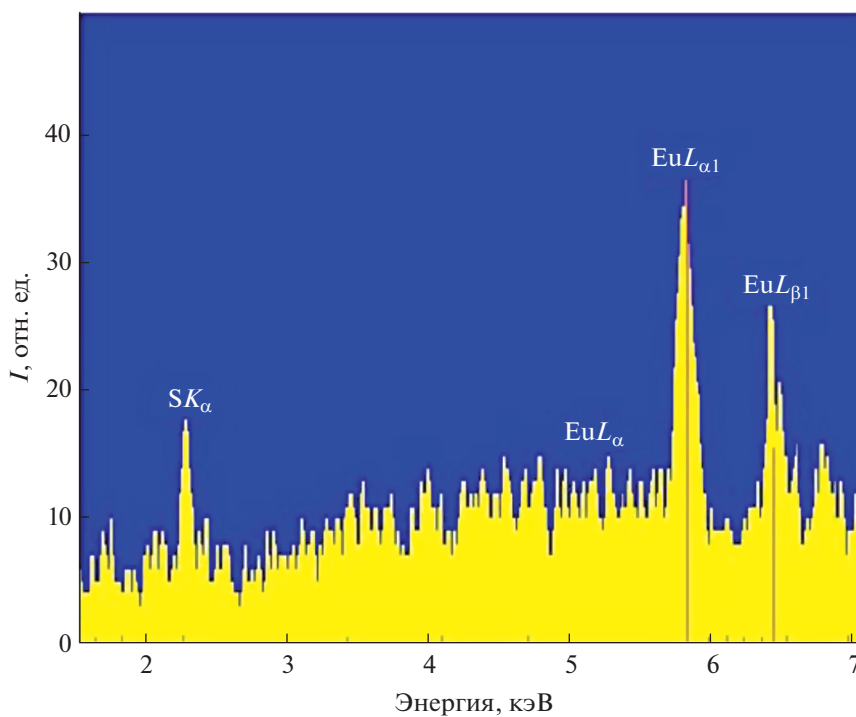


Рис. 3. Энергодисперсионный спектр конъюгата PEI/E6/DTPA/FA/Eu.

глощения с максимумами в области 250 и 280 нм, характерными для фолиевой кислоты [16].

Методом растровой электронной микроскопии подтверждено наличие европия в конечном конъюгате, рис. 3а. Содержание европия в PEI/E6/DTPA/FA/Eu составило 12.1%.

Морфология поверхности

Физико-химические процессы, происходящие при фотодинамической терапии, можно описать согласно диаграмме Яблонского, рис. 4 [17, 18]. В обычных условиях на молекулярной орбитали ФС располагаются 2 электрона с противополож-

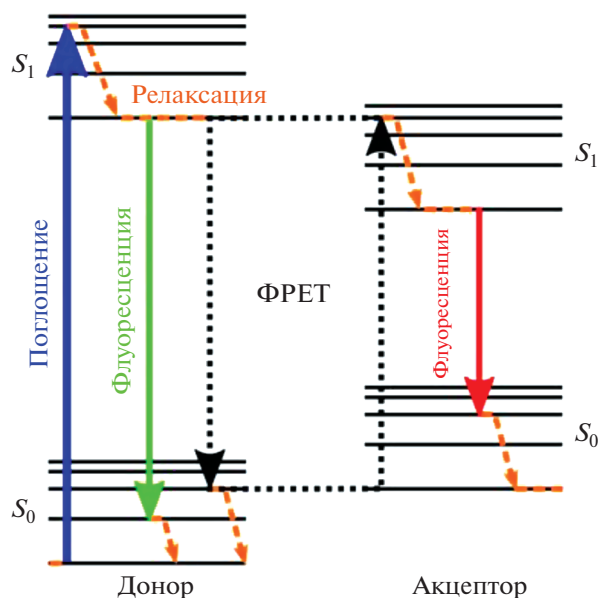


Рис. 4. Дополненная диаграмма Яблонского [7]. ФРЕТ – ферстеровский перенос энергии.

ными спинами и низкой энергией. В процессе облучения ФС происходит процесс поглощения фотонов, в результате один из электронов переходит на уровень с более высокой энергией при сохранении своего спина (первое возбужденное синглетное состояние S_0). В таком состоянии электрон находится наносекунды и теряет энергию, испуская свет (флуоресценция) или преобразуя его в тепло. Возбужденное синглетное состояние (S_1) ФС характеризуется тем, что спин

активированного электрона инвертируется в триплетное состояние на относительно долгий период (от микро- до миллисекунд), при котором оба электронных спина параллельны. Возбужденный триплет ФС может взаимодействовать с молекулами, согласно Яблонскому, по двум типам реакций. В результате реакции II типа образуется супероксидный анион, который индуцирует последующую продукцию АФК, разрушающих клетки опухоли [7, 8].

При активации свободного Хлорина Е6 и PEI/E6/DTPA/FA/Eu красным светом отмечалось дозозависимое возрастание флуоресценции при увеличении содержания Хлорина Е6 (рис. 5). Интенсивность генерации АФК молекулярным конъюгатом PEI/E6/DTPA/FA/Eu при облучении красным светом 645 нм в присутствии 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (специфический сенсор активных форм кислорода) в 5.1 раза превышала продукцию этой молекулы свободным Хлорином Е6 при облучении 5 мин и в 4.0 раза после облучения 30 мин, рис. 6.

Таким образом, генерация супероксидного аниона молекулярным комплексом в 4–5 раз интенсивнее, чем свободным Хлорином Е6, рис. 7.

Исследование фототоксичности проводили с помощью теста с Resazurin. Живые клетки метаболически активны и способны восстанавливать при участии митохондриальной редуктазы нефлуоресцентный краситель Resazurin до флуоресцирующего соединения Resorufin [9]. Установлено, что уже по истечении суток после облучения наблюдается более активная гибель клеток в

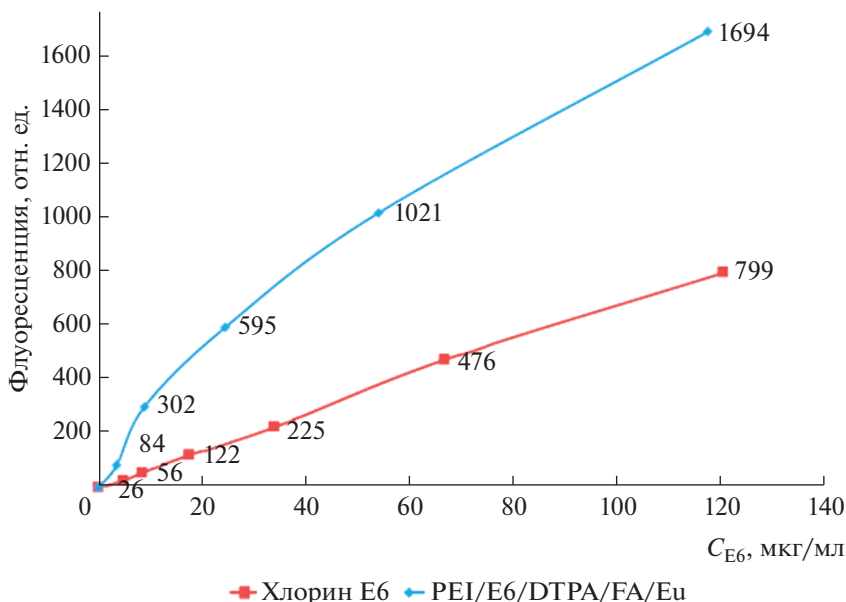


Рис. 5. Дозозависимое увеличение флуоресценции в препаратах при облучении красным светом в течение 5 мин.

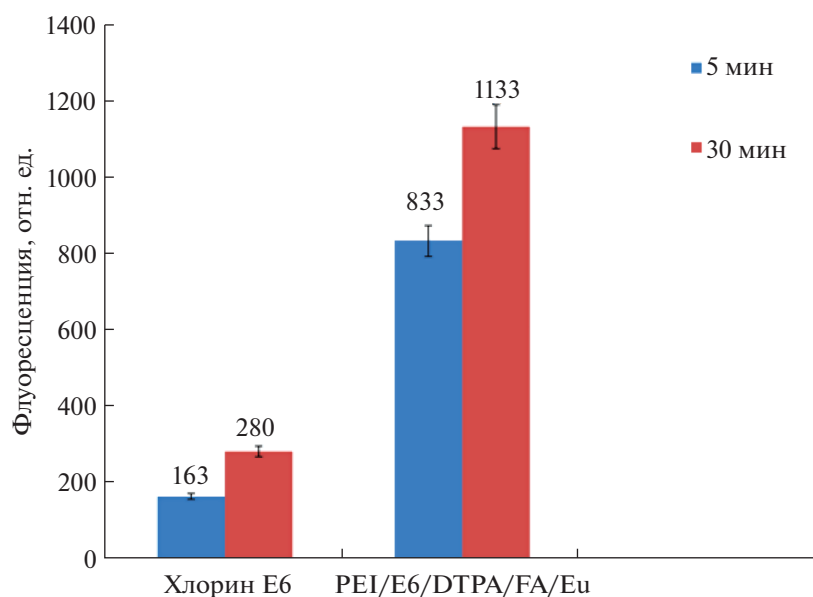


Рис. 6. Интенсивность генерации АФК свободным Хлорином E₆ и молекулярным конъюгатом PEI/E₆/DTPA/FA/Eu (10 мкг E₆/мл).

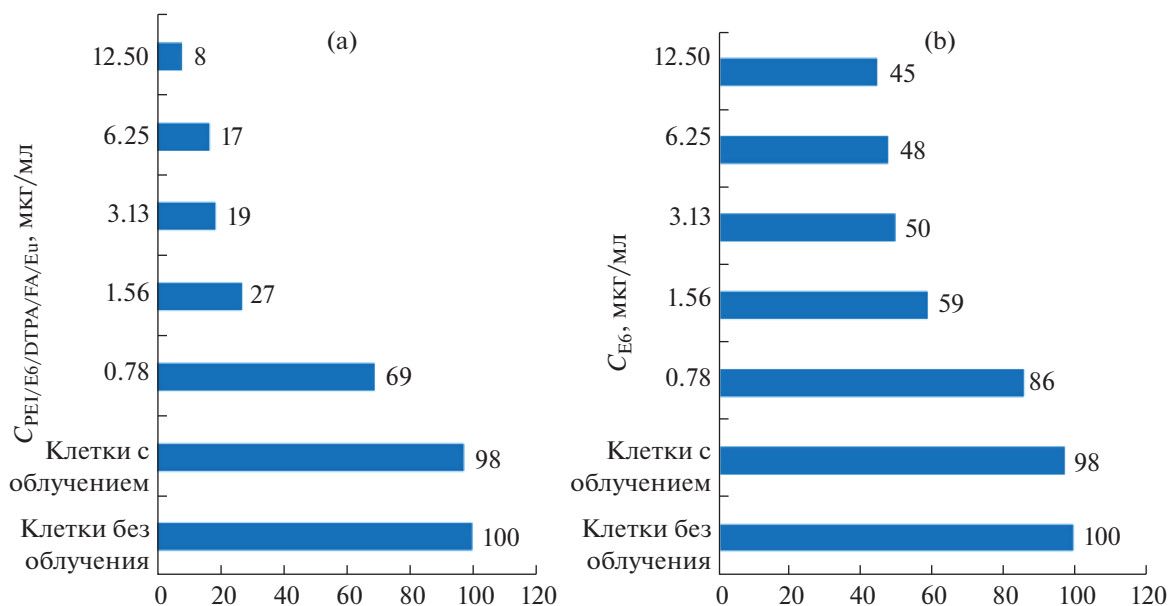


Рис. 7. Интенсивность генерации АФК свободным Хлорином E₆ и конъюгатом PEI/E₆/DTPA/FA/Eu (31.3 мкг E₆/мл) при облучении красным светом.

присутствии молекулярного конъюгата по сравнению с действием свободного Хлорина E₆, рис. 8.

Окрашивание клеток анексином V и припидиум иодидом (PI) широко используется для изучения апоптоза клеток. PI не способен проникать в живые или ранние апоптотические клетки из-за наличия неповрежденной цитоплазматической мембраны [10]. В поздних апоптотических и некротических клетках целостность плазматических и

ядерных мембран снижается, что позволяет PI проходить через мембраны и флуоресцировать в красном диапазоне [10]. С помощью флуоресцентного микроскопа определяли показатели жизнеспособности и апоптоза клеток, рис. 9.

На 4-е сутки после воздействия Хлорина E₆ (12.5 мкг/мл) показатель клеток в начальной степени некроза составил 76% и в конечной стадии 24%. Тогда как при указанной дозе эффект конъю-

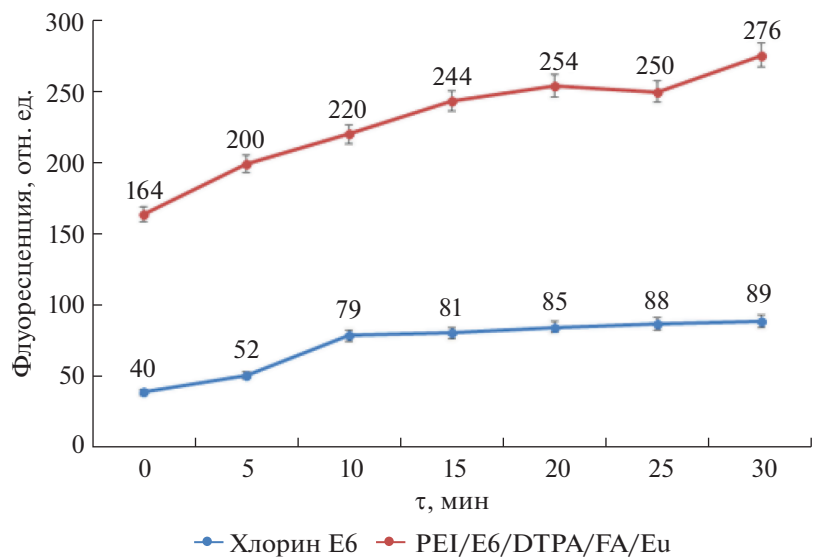


Рис. 8. Жизнеспособность клеток аденокарциномы Эрлиха в присутствии PEI/E6/DTPA/FA/Eu и свободного Хлорина E6.

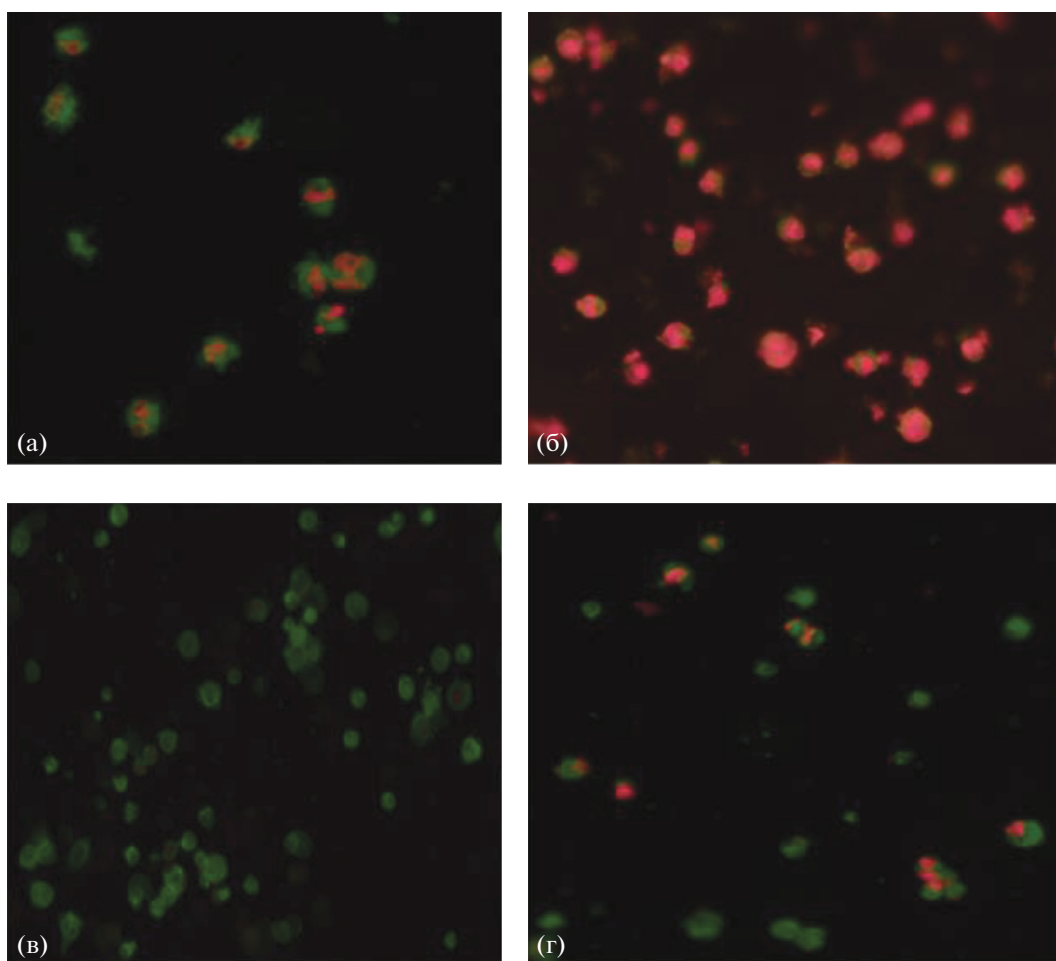


Рис. 9. Клетки опухоли Эрлиха после воздействия Хлорина E6 (а) и PEI/E6/DTPA/FA/Eu (б) в дозе 6.25 мкг/мл без (в) и после облучения (г), 4-е сут инкубации. Окраска Annexin V/PI, ув. X1000.

югата PEI/E6/DTPA/FA/Eu на гибель клеток оказался более выраженным и соответственные показатели были 25 и 75%. Для клеток без воздействия препаратов и облучения показатель некроза был равен 10%, причем 86% составили живые клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена серия экспериментов по исследованию функциональности впервые синтезированного конъюгата Хлорина Е6 и европия. Показана бóльшая способность соединения интенсивно генерировать АФК при облучении красным светом 645 нм, чем у свободного Хлорина Е6. Обнаруженные фотохимические и цитотоксические свойства позволяют рассматривать соединение PEI/E6/DTPA/FA/Eu в качестве перспективного и эффективного препарата для ФДТ при онкологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-33-90185.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grosjean P., Wagnieres G., Fontollet C. et al. // Br. J. Cancer. 1998. № 11. P. 1989.
2. Lambert A., Nees L., Nuyts S. et al. // Frontiers in Oncology. 2021. № 11. P. 518. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.626394>
3. Yanovsky R.L., Bartenstein D.W., Rogers G.S. et al. // Photodermatology, Photoimmunology Photomedicine. 2019. № 35. P. 295. <https://doi.org/10.1111/phpp.12489er.2010.07.007>
4. Collier N.J., Rhodes L.E. // Molecules. 2020. №. 22. P. 5398. <https://doi.org/10.3390/molecules25225398>
5. Коршунова О.В., Плехова Н.Г. // Тихоокеанский медицинский журн. 2020. № 4(82). P. 15. <https://doi.org/10.34215/1609-1175-2020-4-15-19>
6. Шевченко О.В., Апанасевич В.И., Лукьянов П.А. // Известия СПбГТИ. 2020. № 52. С. 23. <https://doi.org/10.36807/1998-9849-2020-52-78-23-27>
7. Стеблевская Н.И., Медков М.А., Белобелецкая М.В. // Журн. неорган. химии. 2020. Т. 65. № 3. С. 327. <https://doi.org/10.31857/S0044457X2003017416>
8. Yang H., Villani R.M., Wang H. et al. // J. Experimental Clinical Cancer Res. 2018. Т. 37. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0909-x>
9. Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T. et al. // Food Frontiers. 2020. № 3. P. 332. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
10. Rieger A.M., Nelson K.L., Konowalchuk J.D. // JoVE. 2011. № 50. P. e2597 <https://doi.org/10.3791/2597>
11. Özdemir Ö. // Allergologia et immunopathologia. 2011. № 5. P. 259. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2010.07.007>
12. Kuluncsics Z., Perdi D., Brulay E. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1999. № 1. P. 71. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(99\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00130-X)
13. Fernández M., Javaid F., Chudasama V. // Chem. Sci. 2018. № 4. P. 790. <https://doi.org/10.1039/C7SC04004K>
14. Ledermann J.A., Canevari S., Thigpen T. // Annals Oncology. 2015. № 10. P. 2034. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv250>
15. Prasad R., Agawane S.B., Chauhan D.S. et al. // Bioconjugate Chem. 2018. № 12. P. 4012. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00522>
16. Modupe O., Maurras J.B., Diosady L.L. // J. Agriculture Food Res. 2020. № 2. P. 100060. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100060>
17. Allison R.R., Moghissi K. // Clinical Endoscopy. 2013. № 1. P. 24. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.24>
18. Benov L. Photodynamic therapy: current status and future directions // Medical Principles and Practice. 2015. Т. 24. Suppl. 1. P. 14. <https://doi.org/10.1159/000362416>