

Исследование устойчивости фотосенсибилизаторов на основе тетрапиррольных комплексов алюминия, магния и цинка при различных факторах

А. Р. Крот^{1,*}, Ю. Д. Строганова¹, И. А. Сергеева¹, К. В. Федорова^{1,†}

Ю. С. Коростей², И. О. Балашова², В. Е. Пушкарев², П. А. Тараканов²

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества

Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

²Институт физиологически активных веществ РАН

Россия, 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1

(Статья поступила 15.05.2018; Подписана в печать 17.07.2018)

Одной из ключевых задач при создании успешных фотосенсибилизаторов третьего поколения является поиск соединений и композиций, отвечающих основным требованиям оптимальных фармакоформ. Методом гидратации пленки с использованием в качестве полимера-носителя поливинилпирролидона (ПВП) приготовлены мицеллярные водные растворы на основе порфиразиновых и фталоцианиновых комплексов алюминия, магния и цинка, являющихся перспективными фотосенсибилизаторами (ФС) для диагностики и фотодинамической терапии онкологических заболеваний. Одним из основных требований к мицеллярным фармакоформам состава ФС–ПВП является формирование наночастиц, средний размер которых в большинстве случаев не должен превышать 200 нм. Данные частицы способны к пассивному накоплению в опухолевых тканях благодаря характерному эффекту «повышенной проницаемости и удержания» (enhanced permeability and retention, EPR). Методом динамического светорассеяния впервые определены значения гидродинамических радиусов биосовместимых мицеллярных форм состава ФС–ПВП и выявлены композиции, образующие наиболее стабильные наночастицы. Обнаружена тенденция к увеличению размеров частиц в растворах с повышенным относительно ФС содержанием ПВП. Возможность управления размерами наночастиц в мицеллярных растворах ФС–ПВП важна с точки зрения перспективы реализации адресной доставки в опухолевые ткани методом «пассивного таргетинга».

PACS: 87.15.bk; 87.25.hg

УДК: 535.36, 53.082.5, 612.398.1, 577.32

Ключевые слова: фталоцианины, порфиразины, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизаторы, мицеллярные фармакоформы, динамическое рассеяние света, гидродинамический радиус, адресная доставка, пассивный таргетинг.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных причин долгосрочного лишения трудоспособности и смертности населения — злокачественные новообразования (ЗНО), которых в Российской Федерации выявлено порядка 600 тыс. за 2016 г. [1]. Фотодинамическая терапия — одна из разновидностей химиотерапии, которая успешно применяется при терапии ЗНО поверхностных тканей [2]. Ткани ЗНО обладают особой структурой. Образовываясь самопроизвольно, клетки опухоли постоянно делятся, поглощая кислород. Состояние гипоксии в той или иной степени характерно для всех типов раковых опухолей [3], что приводит к неконтролируемому росту сосудов — ангиогенезу тканей [4]. Причем данный тип сосудов характеризуется наличием межклеточных промежутков, обеспечивающих повышенную проницаемость [5]. Кроме того, лимфатические сосуды в таких тканях развиты слабо, в результате чего низкий лимфатический отток создает эффект удержания частиц [6, 7]. В результате наблюдается EPR-эффект

(Enhanced Permeability and Retention) [8], благодаря которому и происходит накопление и удержание наночастиц в опухолевых тканях (пассивный таргетинг). Далее под действием энергии лазерного излучения в клетках и тканях развивается фотохимическая реакция с выделением активных форм кислорода, что приводит к двум основным типам гибели опухолевых клеток: некрозу и апоптозу. На данный момент, согласно литературным данным, фотосенсибилизаторы (ФС) на основе порфиразинов и фталоцианинов цинка и алюминия широко исследуются на предмет цитотоксической активности, как новые противоопухолевые препараты, что подтверждается появлением актуальных публикаций в данном направлении [9, 10].

Доставка ФС осуществляется парентеральным способом, в частности, при помощи внутривенной инъекции. Вследствие EPR-эффекта размеры капиллярных пор в опухолевых тканях составляют от 380 нм до 1.2 мкм в зависимости от типа опухоли. Размер пор в нормальных тканях составляет порядка 7 нм [11]. Такая разница в проницаемости кровеносных сосудов и создает возможность пассивного накопления, накладывая при этом ограничения на размер наночастиц. Именно поэтому определение размеров частиц в фармакоформах ФС является ключевой задачей.

*E-mail: ar.krot@physics.msu.ru

†E-mail: fedorova@physics.msu.ru

Данная исследовательская работа является частью научного проекта по созданию ФС третьего поколения и посвящена исследованию следующего ряда ФС: VP-6 на основе конъюгата фталоцианина цинка и производного хлорина е6, УК-3 и УК-2 на основе мономерного и димерного фталоцианинов алюминия и РТ-1 на основе диазепинопорфиразината магния. Оптимальным способом определения размеров наночастиц (гидродинамического радиуса) в прозрачных и полупрозрачных средах является метод динамического светорассеяния (ДСР). В процессе работы были определены размеры частиц, а также исследовано поведение форм при длительном воздействии на двух длинах волн. В результате были выявлены наиболее стабильные образцы — потенциальные фармакоформы, для которых в дальнейшем будет исследовано поведение в присутствии основных белков сыворотки крови *in vitro*.

1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поливинилпирролидон (ПВП, РVP-К30, $M_w \sim 40000$, Aldrich) был использован без дополнительной очистки. Мицеллярные водные растворы на основе ПВП и тетрапиррольных ФС готовили методом гидратации пленки [8]. Диапазон рабочих концентраций ФС в растворах при исследовании размеров мицеллярных наночастиц ПВП-ФС методом ДСР составил $3 \times (10^{-7} - 10^{-5})$ М.

1.1. Мицеллярный раствор РТ-1 – ПВП

Индивидуальный ФС РТ-1 (Рис. 3) синтезировали по ранее разработанной методике [14, 15]. Мицеллярный раствор готовили, смешивая РТ-1 и ПВП в мольном отношении 1:1.

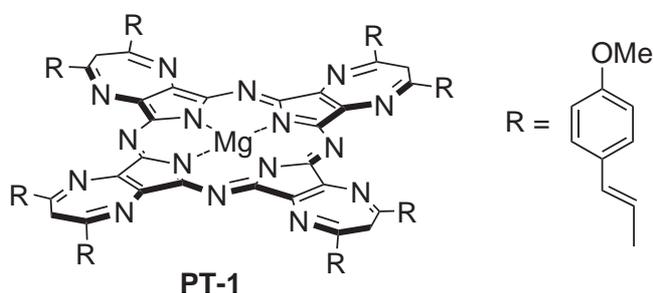


Рис. 1: Структура фотосенсибилизатора РТ-1

1.2. Мицеллярные растворы VP-6 – ПВП

Индивидуальный ФС VP-6 (рис. 1) синтезировали по методике, ранее разработанной для его ближайше-

го аналога [12]. Мицеллярные растворы готовили, смешивая VP-6 и ПВП в мольных отношениях 1:2 и 1:5.

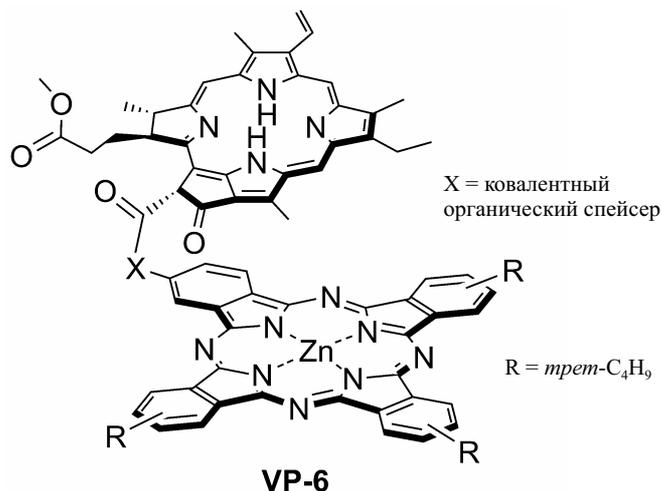


Рис. 2: Структура фотосенсибилизатора VP-6

1.3. Мицеллярные растворы УК-2 – ПВП и УК-3 – ПВП

Индивидуальные ФС УК-2 и УК-3 (Рис. 2) синтезировали по ранее разработанной методике [13]. Мицеллярные растворы готовили, смешивая УК-2 (УК-3) и ПВП в мольном отношении 1:1.

2. МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе измерение параметров диспергированных в жидкости наночастиц проводилось с использованием анализатора размеров частиц Photocor Compact, принципиальная схема которого представлена на рис. 4.

Метод фотонной корреляционной спектроскопии основан на изучении корреляции количества фотонов во времени, рассеянных в наблюдаемом объеме в заданном направлении. Броуновское движение рассеивающих частиц обуславливает временные флуктуации интенсивности рассеянного света, формирующие на детекторе сигнал $I(t)$. Коррелятор, анализируя полученный сигнал, строит автокорреляционную функцию, показывающую корреляцию интенсивности рассеянного света через промежуток времени τ :

$$g(\tau) = \langle I(0)I(t - \tau) \rangle. \tag{1}$$

Причем усреднение производится по различным моментам времени t :

$$\langle I(0)I(t - \tau) \rangle = \lim_{\Delta t \rightarrow \infty} \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} I(t)I(t - \tau) dt, \tag{2}$$

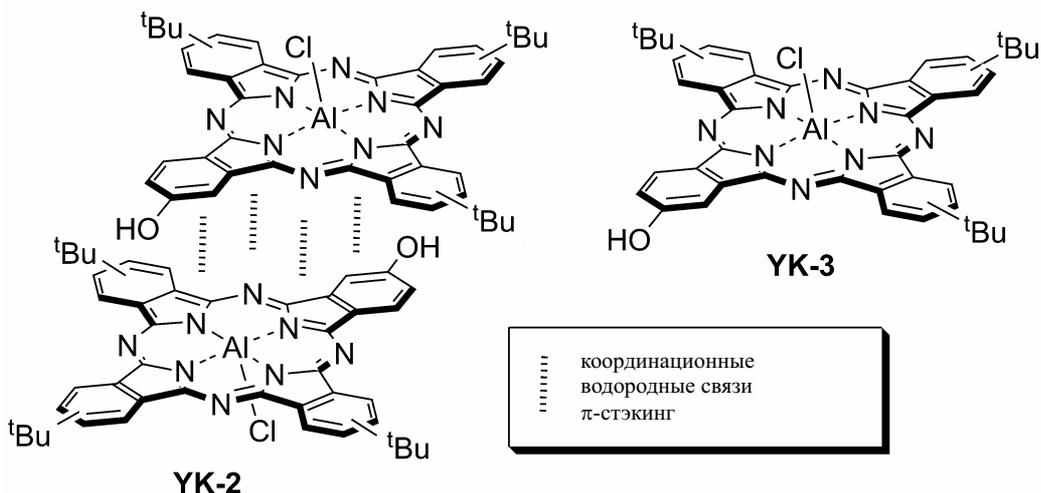


Рис. 3: Строение фотосенсибилизаторов YK-2 и YK-3

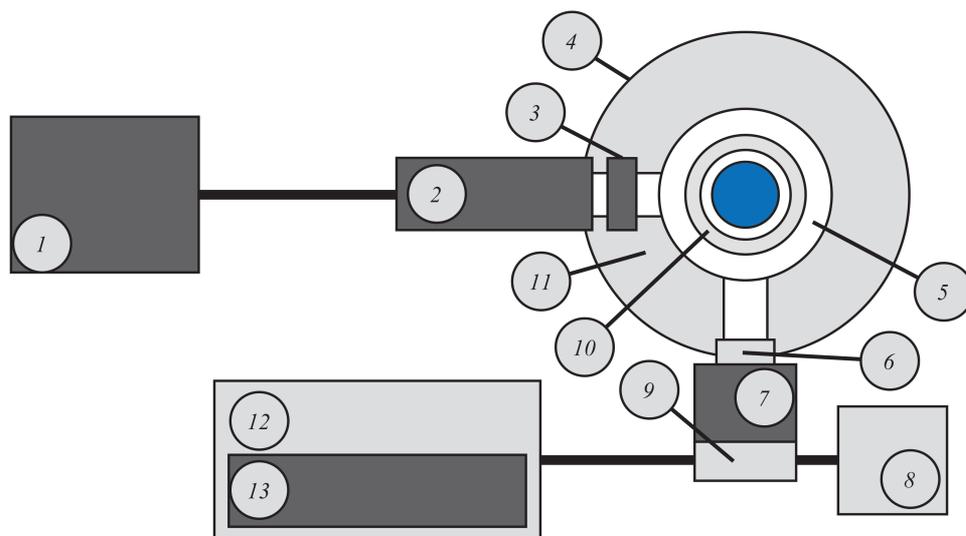


Рис. 4: Принципиальная схема экспериментальной установки Photocor Compact: 1 — источник питания, 2 — лазер (445 нм или 647 нм), 3 — фокусирующая линза, 4 — адаптер кювет, установленный коаксиально оси гониометра, 5 — консоль гониометра, 6 — приемная оптическая система, 7 — фотоумножитель, работающий в режиме счета фотонов, 8 — специальный высоковольтный источник питания ФЭУ без паразитных корреляций, 9 — усилитель-дискриминатор со сквозным по постоянному току трактом, 10 — термостат, 11 — жесткое основание, 12 — персональный компьютер, 13 — коррелятор, подключенный непосредственно к персональному компьютеру

где Δt — время накопления корреляционной функции. Релаксация микроскопических флуктуаций концентрации, в соответствии с гипотезой Онзагера, может быть описана уравнением диффузии:

$$\frac{\partial c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = -D\nabla^2 c(\mathbf{r}, t), \tag{3}$$

где $c(\mathbf{r}, t)$ — концентрация, D — коэффициент диффузии частиц. Автокорреляционная функция интенсивности в такой системе экспоненциально затухает во

времени:

$$g(\tau) = a \exp\left(\frac{-2\tau}{t_c}\right) + b, \tag{4}$$

где a и b — экспериментальные константы. В соответствии с решением уравнения диффузии обратное время корреляции:

$$\frac{1}{t_c} = Dq^2, \tag{5}$$

где волновой вектор флуктуаций концентрации имеет

следующий вид:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (6)$$

где n — показатель преломления среды, λ — длина волны лазерного излучения, θ — угол рассеяния. Используя соотношение Стокса–Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (7)$$

где k_B — константа Больцмана, T — абсолютная температура среды, η — коэффициент вязкости среды, где взвешены частицы радиуса R_h . R_h — гидродинамический или Стоксовый радиус — размер, рассчитываемый из предположения сферической формы объекта. Таким образом, исходя из аппроксимации автокорреляционной функции интенсивности рассеянного света при помощи формулы (5) можно определить коэффициент диффузии частиц. Далее — размеры исследуемых частиц из формулы (7) [16, 17].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

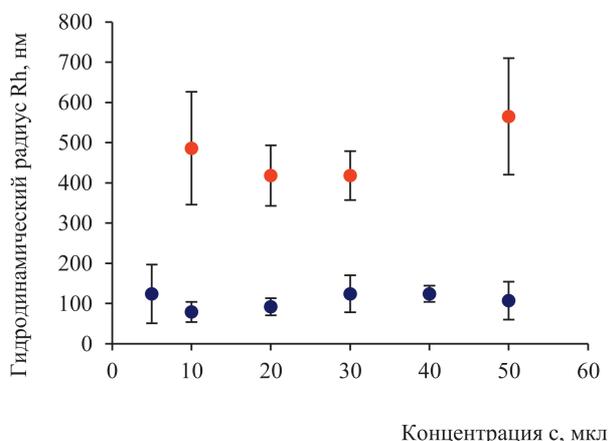


Рис. 5: Зависимость гидродинамического радиуса компонент от концентрации наночастиц в водном растворе РТ-1 – ПВП (1:1) (синим — размеры первой компоненты, красным — размеры второй компоненты)

На рис. 5–7 представлены графики зависимости гидродинамического радиуса компонент изучаемых образцов от их концентрации в водном растворе. Исследуемые образцы были приготовлены следующим образом: в кювету с водой для инъекций объемом 5 ± 0.1 мл добавлялся исходный образец с шагом в 5 ± 0.5 мкл исходного образца. Точки, соответствующие одному значению концентрации, являются выборкой из пяти корреляционных функций (КФ). Конечный результат выбирается как наилучший из исследуемой статистики с учетом вида КФ, наблюдаемой интенсивности, распределения по размерам и соотношения с артефактным

пиком (статистическая ошибка) [18]. Каждая корреляционная функция — результат усреднения тридцати КФ, каждая из которых имела время накопления 10 с. Таким образом, суммарное время облучения образца составляет более 150 мин. Причем для каждого образца устанавливалось предельное допустимое значение отклонения интенсивности рассеянного света от среднего значения, выше которого КФ автоматически отсеивались. Такая фильтрация данных позволяет исключить влияние флуктуаций, вызванных, например, мелкими частицами пыли [16].

Итоговые средние значения гидродинамического радиуса наночастиц приведены в табл. 1. Значения определялись с учетом влияния артефактного пика на реальный размер частиц.

В течение всего эксперимента (более 150 мин), лазерное воздействие на длинах волн 445 нм и 647 нм не оказало какого-либо влияния на образцы. Это подтверждается сохранением линейной зависимости роста интенсивности при увеличении концентрации.

Из графиков на рис. 5–7 видно, что в данных растворах присутствуют две компоненты. Это объясняется тем, что данные вещества способны образовывать ассоциаты большего размера. Однако анализ интенсивностей показывает, что вклад компоненты большего размера мал по сравнению с основной. На рис. 5 и 6, отсутствие второй компоненты в ряде экспериментов свидетельствует о незначительном вкладе ассоциатов большего размера в общее распределение корреляционной функции.

Наличие больших значений погрешностей свидетельствует о флуктуациях гидродинамического радиуса наночастиц, что говорит о высокой склонности образца к формированию ассоциатов, размеры которых распределены в более широком диапазоне (рис. 7,а). Это определяет его нестабильное поведение в водной среде при данных условиях получения. Напротив, образцы имеющие малое отклонение от основной компоненты значения среднего гидродинамического радиуса (табл. 1) являются стабильными квазимонодисперсными системами. Такие формы являются перспективными с точки зрения дальнейших исследований поведения наночастиц в растворе с основным белком крови — сывороточным альбумином человека (САЧ).

Согласно данным табл. 1 для образцов состава VP-6 — ПВП наблюдается тенденция к увеличению среднего размера наночастиц ФС–ПВП с ростом концентрации ПВП. Таким образом, при подборе соотношения ФС/ПВП возможно создание мицеллярных форм ФС с заданными размерами частиц, что позволит повысить селективность их накопления в определенных типах опухолей.

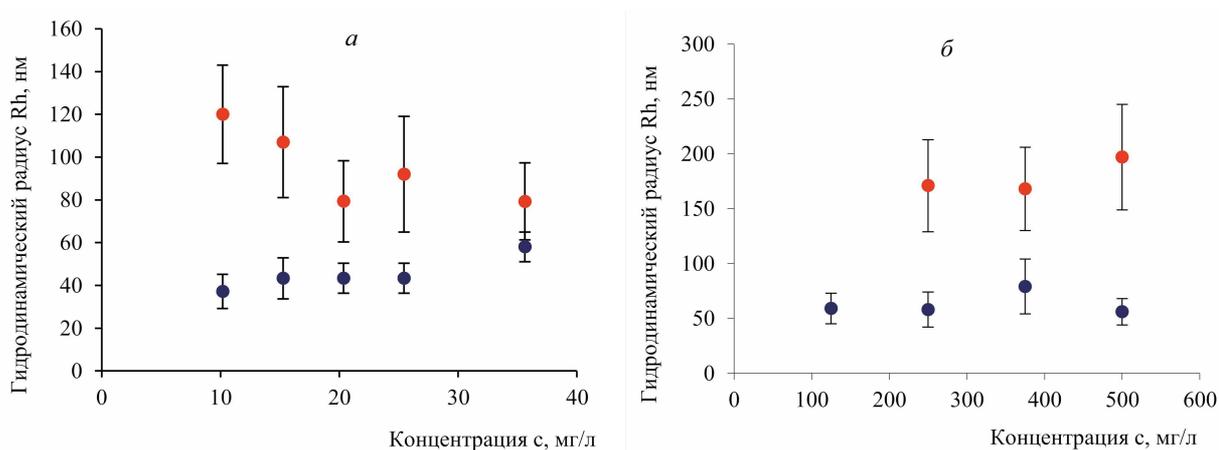


Рис. 6: Зависимость гидродинамического радиуса компонент от концентрации наночастиц в водном растворе VP-6 – ПВП: а – 1:2, б – 1:5 (синим – размеры первой компоненты, красным – размеры второй компоненты)

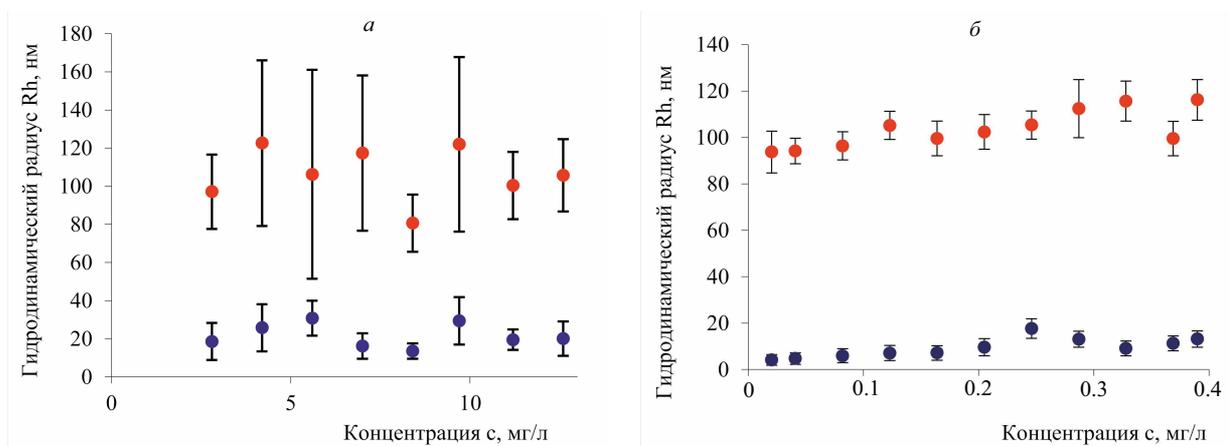


Рис. 7: Зависимость гидродинамического радиуса компонент от концентрации наночастиц в водном растворе: а – YK-2 – ПВП (1:1), б – YK-3 – ПВП (1:1) (синим – размеры первой компоненты, красным – размеры второй компоненты)

Таблица I: Гидродинамический радиус наночастиц в мицеллярных формах фотосенсибилизаторов (по данным динамического рассеяния света), вклад интенсивности компонент

Образец	Средний гидродинамический радиус компонент, нм	Средний вклад интенсивности компоненты, %	Допустимое отклонение интенсивности, %
PT-1 – ПВП (1:1)	124 ± 20; 418 ± 75	48; 17	60
VP-6 – ПВП (1:2)	43 ± 7; 79 ± 19	50; 17	70
VP-6 – ПВП (1:5)	59 ± 17; 169 ± 43	67; 7	40
YK-2 – ПВП (1:1)	23 ± 7; 107 ± 37	38; 24	80
YK-3 – ПВП (1:1)	10 ± 4; 104 ± 8	8; 73	40

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все исследованные в данной работе образцы устойчивы к облучению на длинах волн 445 нм и 647 нм, что позволяет успешно проводить исследования содержащихся в них наночастиц методом динамического рассеяния света. Данный метод способен выявлять стабильные формы и в дальнейшем позволит определить их поведение в присутствии основных белков сыворотки крови человека (сывороточного альбумина и гамма-глобулина), что будет являться основной при создании ФС третьего поколения. Задача по изготовлению успешного ФС на основе фталоцианина широко обсуждается в зарубежной литературе [19–21].

Обнаруженный эффект увеличения размера наночастиц при увеличении концентрации ПВП позволит отладить методику приготовления образцов с необходи-

мыми размерами частиц для практического применения в конкретных случаях терапии злокачественных новообразований.

Коллектив авторов выражает благодарность члену-корреспонденту РАН профессорам О. И. Койфману и Г. В. Пономареву за предоставление образцов производных хлорина еб.

Работа выполнена в рамках Государственного задания 2018 г. (тема № 45.5 «Создание соединений с заданными физико-химическими свойствами») при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (грант МД-2991.2017.3) и Российского научного фонда (грант 17-73-10413).

-
- [1] Каприна А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена, 2018.
- [2] Филоненко Е. В., Акопов А. Л., Вельшер Л. З., Гельфонд М. Л., Истомин Ю. П., Каплан М. А., Лощенов В. Б., Лукьянец Е. А., Миронов А. Ф., Пономарев Г. В. и др. Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. 2014.
- [3] Avni R., Cohen B., Neeman M. NMR in Biomedicine. 2011. **24**. P. 581.
- [4] Oettgen P. J. of Oncology. 2010. **2010**. P. 767384.
- [5] Le Guelle A., Dwyer J., Gavard J. Biology of the Cell. 2011. **103**. P. 605.
- [6] Барышников А. Ю. Вестник РАМН. 2012. № 3. С. 96.
- [7] Терехов С. С. Дип. работа. МГУ имени М. В. Ломоносова. Химический факультет, 2012.
- [8] Torchilin V. P. Polymeric micelles for therapeutic applications in medicine. In Polymer based Nanostructures: Medical Applications. Ed. P. Broz, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010, Ch. 8, P. 261.
- [9] Бармин Р. А., Тараконов П. А., Неганова М. Е., Мищенко Д. В. Российский биотерапевтический журнал. 2017. **16**, № S1. С. 88.
- [10] Machacek M., Kollar J., Miletin M., Kucera R., Kubat P., Simunek T., Novakova V., Zimcik P. RSC Adv. 2016. **6**, № 12. P. 10064.
- [11] Тазина Е. В., Оборотова Н. А. Российский биотерапевтический журнал. 2008. **7**, № 3. С. 103.
- [12] Balashova I. O., Pushkarev V. E., Shestov V. I., Tomilova L. G., Koifman O. I., Ponomarev G. V. Macroheterocycles. 2015. **8**, № 3. P. 233.
- [13] Korostei Yu. S., Tolbin A. Yu., Dzuban A. V., Pushkarev V. E., Sedova M. V., Maklakov S. S., Tomilova L. G. Dyes Pigm. 2018. **149**. P. 201.
- [14] Stuzhin P. A., Tarakanov P., Shiryayeva S., Zimenkova A., Koifman O. I., Viola E., Pia Donzello M., Ercolani C. J. Porphyrins Phthalocyanines. 2012. **16**. P. 968.
- [15] Tarakanov P. A., Tarakanova E. N., Dorovatovskii P. V., Zubavichus Ya. V., Khrustalev V. N., Trashin S. A., De Wael K., Neganova M. E., Mischenko D. V., Sessler J. L., Stuzhin P. A., Pushkarev V. E., Tomilova L. G. Dalton Trans. 2018. Advance Article.
- [16] Бочаров К. В., Марукович Н. И., Куксин А. Ю. Методы статического и динамического рассеяния света для исследования наночастиц и макромолекул в растворах. М.: МФТИ, 2016.
- [17] Левшин Л. В., Салецкий А. М. Оптические методы исследования молекулярных систем. М., 1994.
- [18] Кириченко М. Н., Саноева А. Т., Чайков Л. Л. Краткие сообщения по физике. ФИАН. 2016. № 8. С. 40.
- [19] Liang R., Ma L., Zhang L., Li Ch., Liu W., Wei M., Yan D., Evans D. G., Duana X. Chem. Comm. 2014. **50**. P. 14983.
- [20] Liang R., You Sh., Ma L., Li Ch., Tian R., Wei M., Yan D., Yin M., Yang W., Evans D. G., Duan X. Chem. Sci. 2015. **6**. P. 5511.
- [21] Hong E. J., Choi D. G., Shimn M. S. Acta Pharm. Sinica B. 2016. **6**. P. 297.

The study of the stability of photosensitizers based on tetrapyrrolic aluminum, magnesium and zinc complexes at various factors

A. R. Krot^{1,a}, Y. D. Stroganova¹, I. A. Sergeeva¹, K. V. Fedorova^{1,b}, Yu. S. Korostei², I. O. Balashova², V. E. Pushkarev², P. A. Tarakanov²

¹*Department of molecular processes and extreme states of matter, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University
Moscow 119991, Russia*

²*IPAC RAS, Moscow region 142432, Russia*

E-mail: ^aar.krot@physics.msu.ru, ^bfedorova@physics.msu.ru

The complexes of nanoparticles — promising photosensitizers that are used for diagnostics and photodynamic therapy of oncological diseases, were synthesized by the combination of inorganic nanostructures with polymerization of organic monomer method based on porphyrazines and phthalocyanines of aluminum, magnesium, zinc and polyvinylpyrrolidone as a polymer. As a result of the circulation of nanoparticles in the bloodstream, they passively accumulate in the tumor tissues due to the EPR effect. One of the key conditions for observing this effect is the particle size, which in most cases should not exceed 200 nm. The dynamic light scattering method was used to determine for the first time the values of the hydrodynamic radii of biocompatible micellar forms and the most stable complexes of these nanoparticles were established. The tendency to increase the size of the photosensitizer with an increase in the relative concentration of the polymer is revealed, which makes it possible to form a well-established technology for the synthesis of nanoparticles of the required size, to implement targeted delivery to tumor tissues using the «passive targeting» method.

PACS: 87.15.bk; 87.25.hg

Keywords: photodynamic therapy, photosensitization, nanoparticle synthesis, micelles, dynamic light scattering, hydrodynamic radius, targeted delivery, passive targeting.

Received 15 May 2018.

Сведения об авторах

1. Крот Алексей Романович — студент; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: ar.krot@physics.msu.ru.
2. Стrogанова Юлия Дмитриевна — студент; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: yd.stroganova@physics.msu.ru.
3. Сергеева Ирина Александровна — канд. физ.-мат. наук, доцент; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: sergeeva@physics.msu.ru.
4. Федорова Ксения Вячеславовна — канд. физ.-мат. наук, ассистент; тел.: (495) 939-10-88, e-mail: fedorova@physics.msu.ru.
5. Коростей Юлия Сергеевна — аспирант; тел.: (496) 524-25-66, e-mail: jkorostei@mail.ru.
6. Балашова Ирина Олеговна — канд. хим. наук, науч. сотрудник; тел.: (496) 524-25-66, e-mail: bekki666@yandex.ru.
7. Пушкарев Виктор Евгеньевич — докт. хим. наук, зав. лабораторией; тел.: (496) 524-25-66, e-mail: pushkarev@ipac.ac.ru.
8. Тараканов Павел Александрович — канд. хим. наук, науч. сотрудник; тел.: (496) 524-25-93, e-mail: tarakanov_pa@ipac.ac.ru.