

PACS numbers: 81.16.Be, 87.19.xj, 87.64.kv, 87.85.jj, 87.85.Qr, 87.85.Rs, 87.85.St

Мультифункциональные липосомальные наносистемы для доставки новых противоопухолевых лекарственных препаратов на основе хелатов европия

Л. А. Лиманская, А. В. Юдинцев, О. К. Куценко, В. М. Трусова,
Г. П. Горбенко, С. Калоянова*, Т. Делигеоргиев*, Н. Лесев*,
А. Васильев*

*Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,
площадь Свободы, 4,
61077 Харьков, Украина*

**Кафедра прикладной органической химии,
Университет Софии,
1164 София, Болгария*

Недавно была продемонстрирована высокая цитотоксическая активность новых потенциальных противоопухолевых препаратов — координационных комплексов европия (КЕ). Однако применение таких препаратов в свободной форме ограничено их высокой токсичностью и метаболической нестабильностью. Один из способов повышения эффективности лекарственных препаратов основан на использовании различных систем для их доставки, например, липосом. Цель данной работы состояла в оценке эффективности включения КЕ в липидную фазу, а также в изучении возможности создания мультифункциональных нанопереносчиков, содержащих как лекарственный препарат, так и визуализирующий агент. В качестве визуализирующих агентов применялись новые сквараиновые зонды SQ-1, SQ-2, SQ-3 и цианиновый зонд V2. С использованием метода тушения флуоресценции пирена были определены коэффициенты распределения хелатов европия между водной и липидной фазами.

Нещодавно було продемонстровано високу цитотоксичну активність нових потенційних протипухлинних препаратів — координаційних комплексів европію (КЕ). Проте застосування таких препаратів у вільній формі обмежено їх високою токсичністю й метаболічною нестабільністю. Один із способів підвищення ефективності лікарських препаратів засновано на використанні різних систем для їх доставляння, наприклад, ліпосом. Метою даної роботи була оцінка ефективності включення КЕ в ліпідну фазу, а також вивчення можливості створення мультифункціональних нанопереносників, що містять як лікарський препарат, так і візуалізаційний агент. Як

візуалізаційні агенти застосовувалися нові сквараїнові зонди SQ-1, SQ-2, SQ-3 та ціаніновий зонд V2. З використанням методи гасіння флюоресценції пірену було визначено коефіцієнти розподілу хелатів европію між водною і ліпідною фазами.

Recently high cytotoxic activity of new antitumor drugs—europium coordination complexes (EC)—has been demonstrated. However, application of such drugs in free form is limited by their high toxicity and metabolic instability. One way of increasing of drug efficiency is based on application of different systems for their delivery, for example, liposomes. The aim of the present work consisted in evaluating the efficiency of EC incorporation into the lipid phase as well as in exploring the possibility of creation of multifunctional nanocarriers, which would include both the drug and the visualizing agent. New squaraine probes SQ-1, SQ-2, SQ-3, and cyanine probe V2 are used as the visualizing agents. Using pyrene fluorescence-quenching technique, the partition coefficients of europium chelates within the water and lipid phases are determined.

Ключевые слова: хелат европия, липосомы, тушение флуоресценции, коэффициент распределения, визуализирующий агент.

(Получено 19 октября 2010 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одной из основных проблем биомедицинских исследований является разработка и исследование различных наноструктур, включая липосомы, наночастицы, нанотрубки и многие другие, которые предоставляют уникальные возможности для целенаправленной доставки лекарственных средств. Липосомы широко используются для создания нанопереносчиков различных фармакологических препаратов. Интенсивное применение липидных везикул для доставки лекарств обусловлено множеством их преимуществ, включая: сродство с природными мембранами клеток по химическому составу; способность к полному разложению в организме; низкая токсичность; способность переносить как гидрофильные, так и липофильные лекарства, защищая их от химической деградации и трансформации; постепенное высвобождение лекарственного препарата из липосом; уменьшение побочных эффектов лекарств и т.д. [1]. Недавно была продемонстрирована высокая цитотоксическая активность новых потенциальных противоопухолевых препаратов — координационных комплексов европия (КЕ) [2]. Цель настоящего исследования состояла в: 1) определении эффективности включения КЕ в липидную фазу; 2) оценке возможности создания мультифункциональных переносчиков, содержащих как лекарственный препарат (КЕ), так и визуализирующий агент, в качестве которых были

протестированы новые сквараиновые зонды SQ-1, SQ-2, SQ-3 и цианиновый зонд V2.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фосфатидилхолин (ФХ) из яичного желтка был получен от «Биолек» (Харьков, Украина). Пирен был получен от Sigma (Германия). Хелаты европия (здесь обозначены как КЕ1–КЕ10), сквараиновые и цианиновый зонды были синтезированы по ранее описанной методике [3, 4, 5]. Липидные везикулы, состоящие из ФХ, были получены методом экструзии [6]. Соответствующие количества исходных растворов липида и КЕ были растворены в смеси этанол:метанол (соотношение 1:1), выпарены под вакуумом в течение 1.5 ч для испарения растворителя. Далее полученные липидные пленки гидратировались 1.2 мл 5 мМ Na-фосфатным буфером (рН 7.4). Липидную суспензию экструдировали через поликарбонатный фильтр с размером пор 100 нм (Nucleopore, Pleasanton, CA). Флуоресцентные измерения выполнялись на спектрофлуориметре LS-55 (Perkin Elmer, Великобритания). Длины волн возбуждения составили 640 нм для SQ-1, 660 нм для SQ-2, 620 нм для SQ-3, 685 нм для V2 и 340 нм для пирена. Ширина щелей возбуждения и испускания при флуоресцентных измерениях была выбрана 5 нм для SQ-1, V2, SQ-2, пирена и 10 нм для SQ-3.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы была выполнена оценка эффективности встраивания хелатов европия в липидную фазу модельных мембран с использованием флуоресцентного зонда пирена. Примеры структурных формул комплексов европия приведены на рис. 1, а структурная формула пирена — на рис. 2.

Для определения коэффициентов распределения КЕ между липидным бислоем и водной фазой применяли метод тушения флуоресценции. Полученные этим методом данные количественно обрабатывались в соответствии с моделью динамического тушения флуоресценции, которая предполагает диффундирование тушителя к флуорофору на протяжении времени жизни возбужденного состояния. После контакта с тушителем флуорофор переходит в основное состояние с испусканием фотона. Динамическое тушение флуоресценции описывается уравнением Штерна–Фольмера [7]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_m \tau_0 [Q], \quad (1)$$

где F_0 и F — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно; k_m — бимолекулярная кон-

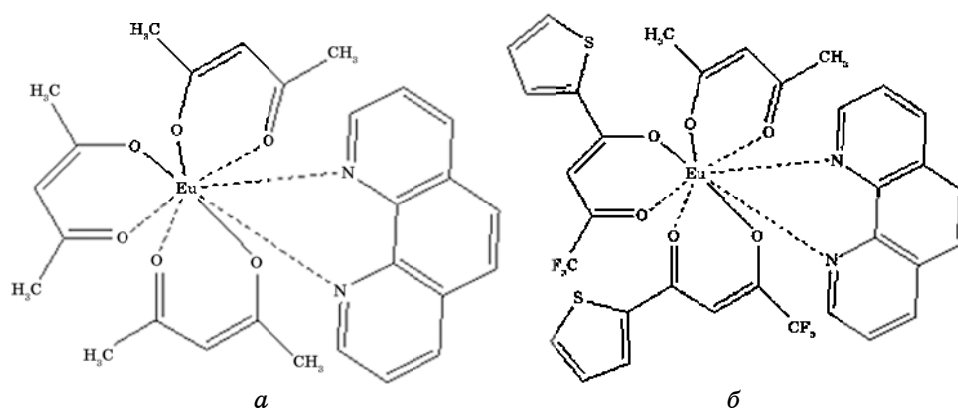


Рис. 1. Структура хелатов европия KE1 (а) и KE2 (б).

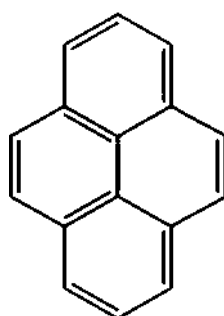


Рис. 2. Структура флуоресцентного зонда пирена.

станта тушения; τ_0 — время жизни флуорофора в отсутствие тушителя; $a [Q]$ — концентрация тушителя.

Пирен — это липофильный флуоресцентный зонд, который локализуется в гидрофобной области мембраны. Было обнаружено, что интенсивность флуоресценции встроенного в мембрану пирена уменьшается с увеличением концентрации КЕ без сдвига положения максимума спектра. Предполагается, что исследуемые хелаты европия являются тушителями флуоресценции данного зонда. Комплексы европия — гидрофобные соединения, которые локализуются в неполярной области мембраны. В связи с этим, наблюдаемое явление было объяснено проникновением КЕ в гидрофобную область мембранной фазы, которое сопровождалось тушением флуоресценции пирена по динамическому механизму.

Наблюдаемое тушение флуоресценции связанного с мембраной пирена позволило оценить коэффициенты распределения КЕ между липидной и водной фазами. В соответствии с общепринятым подходом [7], коэффициент распределения определяется как

отношение между концентрациями зонда в липидной ($[Q_L]$) и водной ($[Q_W]$) фазами:

$$P = [Q_L] / [Q_W]. \quad (2)$$

Учитывая уравнение Штерна–Фольмера (уравнение (1)) и данное выражение, получим следующее уравнение:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \frac{\tau_0 k_m P [Q_T]}{P \alpha_m + 1 - \alpha_m} = 1 + \tau_0 k_{app} [Q_T], \quad (3)$$

где k_m — бимолекулярная константа тушения для связанного с мембраной флуорофора, которая отражает эффективность тушения, или, доступность флуорофора тушителю; $k_{app} = k_m P / (P \alpha_m + 1 - \alpha_m)$ — кажущаяся константа тушения. Следует отметить, что этот параметр зависит от объема фракции мембранной фазы α_m (и концентрации липида):

$$\frac{1}{k_{app}} = \alpha_m \left(\frac{1}{k_m} - \frac{1}{k_m P} \right) + \frac{1}{k_m P}. \quad (4)$$

Зависимости относительной интенсивности флуоресценции (F_0/F) пирена от концентрации КЕ были проанализированы в соответствии с выражением (4). Типичные графики Штерна–Фольмера для КЕ5 представлены на рис. 3, а.

Линейность полученных графиков свидетельствует о динамическом механизме тушения [7]. Аппроксимация экспериментальных результатов уравнением (4) позволила оценить кажущиеся кон-

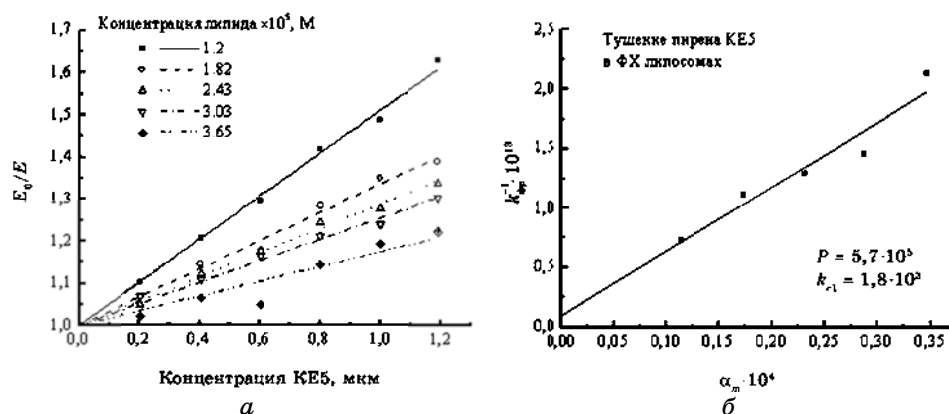
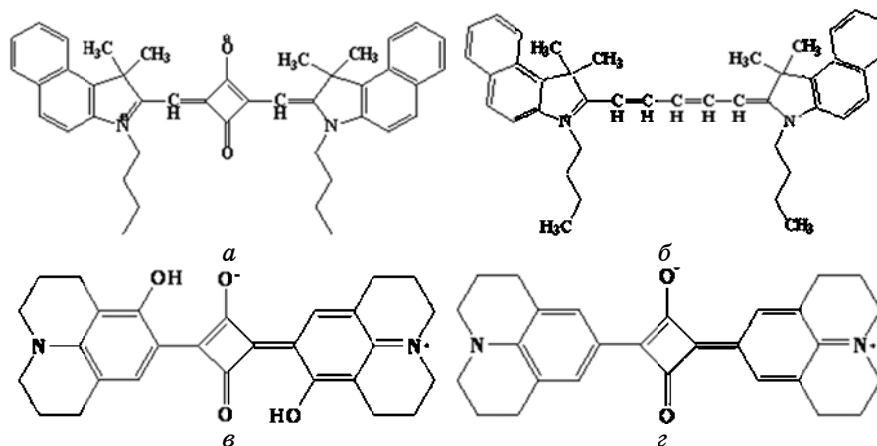


Рис. 3. Тушение флуоресценции пирена хелатом европия КЕ5 в ФХ липосомах (а) и зависимость кажущейся константы тушения пирена от объемной фракции липидной фазы (б).

ТАБЛИЦА 1. Параметры распределения хелатов европия в мембрану липосом и параметры тушения флуоресценции пирена.

Хелат европия	КЕ1	КЕ2	КЕ3	КЕ4	КЕ5	КЕ6	КЕ7	КЕ8	КЕ9	КЕ10
$P, \times 10^4$	10,8	6,8	13,7	4,9	60,0	1,9	17,7	5,2	26,3	16,5
$k_m, \times 10^8$	1,2	1,9	1,7	4,4	1,8	8,3	2,4	73,2	3,0	3,1

**Рис. 4.** Структурные формулы флуоресцентных зондов SQ-1 (а), V2 (б), SQ-3 (в), SQ-2 (з).

станты тушения Штерна–Фольмера ($k_{SV}^{app} = \tau_0 k_{app}$) по углу наклона линейной зависимости. Для вычисления k_{app} значения k_{SV}^{app} делили на время жизни флуоресценции эксимеров пирена (37.3 нс, [8]). В соответствии с рис. 3, б данный параметр зависит от концентрации липида линейно. Результаты аппроксимации $k_{app}(\alpha_m)$ уравнением (4) представлены в табл. 1.

Видно, что коэффициенты распределения КЕ в ФХ бислой достаточно высоки. Поскольку КЕ являются неполярными соединениями, их встраивание в гидрофобную область мембраны является наиболее вероятным.

На следующем этапе исследований было изучено связывание сквараинового зондов SQ-1, SQ-2, SQ-3 и цианинового зонда V2 с липосомами, в оболочку которых были встроены КЕ [9]. Структурные формулы используемых зондов представлены на рис. 4. Преимуществами данных зондов являются высокий коэффициент экстинкции, значительный квантовый выход, большой стоксов сдвиг и химическая стабильность. Ассоциация красителей с липидным бислоем сопровождалась увеличением интенсивности флуоресценции.

С целью получения коэффициентов распределения экспериментальные зависимости изменений интенсивности флуоресценции от концентрации липида (типичные графики представлены на рис. 5) аппроксимировались следующим выражением:

$$\Delta I = \frac{K_p C_L \gamma \Delta I_{\max}}{1 + K_p C_L \gamma}, \quad (5)$$

где K_p — коэффициент распределения; C_L — концентрация липида; γ — объем липидной фазы; ΔI — изменение интенсивности флуоресценции зонда; ΔI_{\max} — максимальное изменение интенсивности флуоресценции зонда в липидном окружении.

Коэффициенты распределения сквараиновых и цианинового зондов в липосомы представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, значения коэффициентов распределения исследуемых зондов существенно не различаются для липосом без КЕ и со встроенными КЕ. Данный факт свидетельствует о

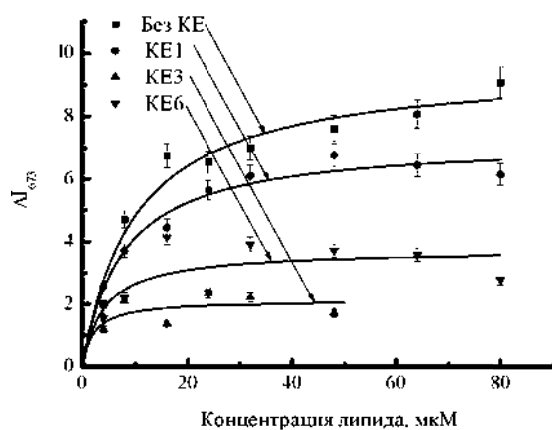


Рис. 5. Изотермы связывания SQ-3 с ФХ модельными мембранами. Сплошными линиями представлены теоретические кривые, соответствующие случаю наилучшей подгонки.

ТАБЛИЦА 2. Коэффициенты распределения SQ-1, SQ-2, SQ-3 и V2 в ФХ бислой.

Липосомные системы	SQ-1	SQ-2	SQ-3	V2
Без КЕ	$(6,5 \pm 1,0) \cdot 10^4$	$(4,7 \pm 3,4) \cdot 10^2$	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(7,9 \pm 0,8) \cdot 10^4$
КЕ1	$(5,5 \pm 1,0) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(6,6 \pm 0,8) \cdot 10^4$
КЕ3	$(1,0 \pm 3,2) \cdot 10^5$	$(9,3 \pm 2,8) \cdot 10^2$	$(2,6 \pm 1,8) \cdot 10^5$	$(5,4 \pm 0,9) \cdot 10^4$
КЕ6	$(9,3 \pm 1,8) \cdot 10^4$	$(3,0 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(4,9 \pm 4,7) \cdot 10^5$	$(4,5 \pm 0,6) \cdot 10^4$

том, что комплексы европия не препятствуют встраиванию зондов SQ-1, SQ-2, SQ-3, и V2 в липидный бислой модельных мембран. Таким образом, изученные сквараиновые и цианиновый зонды могут применяться в качестве визуализирующих агентов.

4. ВЫВОДЫ

Показано, что комплексы европия являются тушителями флуоресценции пирена. Продемонстрировано, что хелаты европия не препятствуют встраиванию исследуемых сквараиновых и цианинового зонда в липидный бислой модельных мембран. Показали, что изучаемые длинноволновые красители могут использоваться для визуализации биораспределения липосом. Полученные результаты свидетельствуют о возможности создания мультифункциональных нанопереносчиков потенциальных противоопухолевых препаратов на основе хелатов европия с использованием липосом. Данные исследования предлагают возможный вариант эффективного лечения онкологических заболеваний.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Эта работа была выполнена при поддержке Украинского Научно-Технологического Центра (грант № 4534) и Государственного Фонда фундаментальных исследований (проект № Ф.28.4/007).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **4**: 145 (2005).
2. X. Zhang, X. Lei, and H. Dai, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, **34**, No. 6: 1123 (2004).
3. G. Momekov, T. Deligeorgiev, A. Vasilev, K. Peneva, S. Konstantinov, and M. Karaivanova, *Medicinal Chemistry*, **2**: 439 (2006).
4. S. H. Kim, S. H. Hwang, J. J. Kim, C. M. Yoon, and S. R. Keun, *Dyes Pigm.*, **37**: 145 (1998).
5. J. V. Ros-Lis, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, M. Spieles, and K. Rurack, *Chem. Eur. J.*, **14**: 10101 (2008).
6. B. Mui, L. Chow, and M. Hope, *Meth. Enzymol*, **367**: 3 (2003).
7. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (New York: Plenum Press: 2006).
8. Y. Barenholz, *J. Biol. Chem.*, **271**, No. 6: 3085 (1996).
9. V. M. Ioffe, G. P. Gorbenko, T. Deligeorgiev, N. Gadjev, and A. Vasilev, *Biophys. Chem.*, **128**: 75 (2007).