

Климович М.А., Сажина Н.Н., Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Шкирдова А.О.,
Замелацков И.А., Кузьмин В.А.
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4
Тел: +7 916-087-98-68, E-mail: natnik48s@yandex.ru

Некоторые физико-химические свойства липосом со встроенным фотосенсибилизатором пиррофофорбидом-а

Липосомы со встроенными фотосенсибилизаторами имеют хорошие перспективы в фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований. ФДТ отличается от традиционных методов лечения опухолей высокой избирательностью воздействия, отсутствием риска хирургического вмешательства, тяжелых системных осложнений лечения, а также возможностью многократного повторения процедур. Поглощение энергии света фотосенсибилизатором (ФС) приводит к фотохимической реакции с образованием цитотоксичных продуктов: активных форм кислорода и свободных радикалов, действие которых на опухолевые клетки ведет к их гибели. Одним из перспективных ФС является РРРа. Однако это соединение нерастворимо в водной среде, что мешает донести его по кровеносному руслу до опухоли. Для доставки подобных труднорастворимых в воде веществ используются различные бионаноконтейнеры, в частности липосомы на основе природных лецитинов, которые хорошо растворимы в биологических жидкостях, защищают ФС от разрушения и не вредны для организма [1].

В настоящей работе проведено изучение физико-химических параметров липосом из фосфатидилхолина (ФХ) с включенным в них ФС порфиринового ряда РРРа. Измерены спектры поглощения липосом, размеры и Z-потенциал, вязкость мембран липосом. Исследовано также инициированное окисление липосом и влияние на него концентрации РРРа.

Для приготовления липосом использовали суспензию соевого ФХ марки L- α -Phosphatidilcholine ("Sigma-Aldrich", Германия) в фосфатном буфере (рН 7,4, ионная сила 1 мМ). Кроме ФХ (63%) в состав продукта входил также фосфатидилэтаноламин (32%), остальные липиды были представлены в малых количествах. Суспензию готовили из известной навески ФХ с объемом буфера, необходимым для получения концентрации ФХ 1 мг/мл. Смесь перемешивали 20 мин в шейкере, добавляя растворы фотосенсибилизатора РРРа в толуоле с разной концентрацией. Липосомы формировали с использованием ультразвукового гомогенизатора VCX-130 (Sonics & Materials, США) в течение 15 мин при мощности 70 Вт. Для предохранения липосом от нагревания и окисления во время озвучивания, сосуд с суспензией помещали в смесь воды со льдом. После озвучивания, дисперсию липосом центрифугировали при T=+4°C в течение 20 мин при 13000об/мин. Спектры поглощения липосом регистрировали в диапазоне (200 – 700) нм на спектрофотометре (Perkin Elmer, Lambda-25). Для инициирования окисления липосом использовался водорастворимый инициатор ААРН - 2,2'-азо-бис(амидинопропан) дигидрохлорид (Fluka, Германия). Кинетику образования продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов (ДК) регистрировали во времени на длине волны максимума поглощения ДК $\lambda=234$ нм [2]. Для определения размеров липосом в растворе использовался метод динамического светорассеяния (ДСР) - метод фотонной корреляционной спектроскопии. Измерения среднего диаметра липосом проводились на высокочувствительном приборе Zetasizer Nano ZS (Великобритания) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного на липосомах под углом 173° лазерного излучения с $\lambda=633$ нм. Концентрация липосом составляла 1 мг/мл, температура 25°C. Для каждого размера D осуществлялась регистрация 5-10 распределений интенсивности по размерам частиц с 15 накоплениями в каждом измерении, усреднение проводилось по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния. Для измерения z-потенциала (Z) липосом этот же прибор использовался в режиме регистрации электрофоретической подвижности (ЭФП) частиц.

С помощью спиновых зондов с использованием метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) измеряли микровязкость поверхностного слоя липосом. В качестве показателя микровязкости использовали время вращательной корреляции зонда τ .

На спектрах поглощения липосом (рис.1, слева) видны две полосы поглощения: Соре с максимумом на $\lambda=417$ нм и в красной области спектра с максимум на $\lambda=673$ нм, последняя используется для ФДТ. Зависимость пиков поглощения линейна от концентрации РРРа.

При инициированном окислении липосом (рис.1, справа) РРРа тормозит окисление также дозозависимо от концентрации РРРа, что свидетельствует о проявлении этим ФС антиокислительных свойств. Влияние различного содержания РРРа в липосомах видно и на изменении размеров липосом и их Z-потенциала (Рис 2). Чем больше нагружены липосомы этим ФС, тем меньше их средний диаметр D и меньше абсолютная величина их Z-потенциала, за исключением сильно нагруженных липосом с РРРа 3. По-видимому, РРРа с такой концентрацией значительно структурирует бислой липосом, что приводит к уменьшению их размера и увеличению отрицательного заряда их поверхности. Об этом свидетельствуют и данные по микровязкости этих липосом - микровязкость поверхностного слоя липосом растет практически в 2,5 раза по сравнению с микровязкостью поверхностного слоя «чистых» липосом ($\tau = 3,1 \times 10^{-10}$ с для липосом с РРРа3 против $\tau = 1,2 \times 10^{-10}$ с для «чистых» липосом). Такая уплотненная структура уменьшает проникновение кислорода в липосому, поэтому окисление липидов в ней замедляется, что подтверждается и результатами по окислению. Увеличение Z-потенциала способствует уменьшению агрегации частиц и увеличивает стабильность и сроки хранения липосомальных растворов.

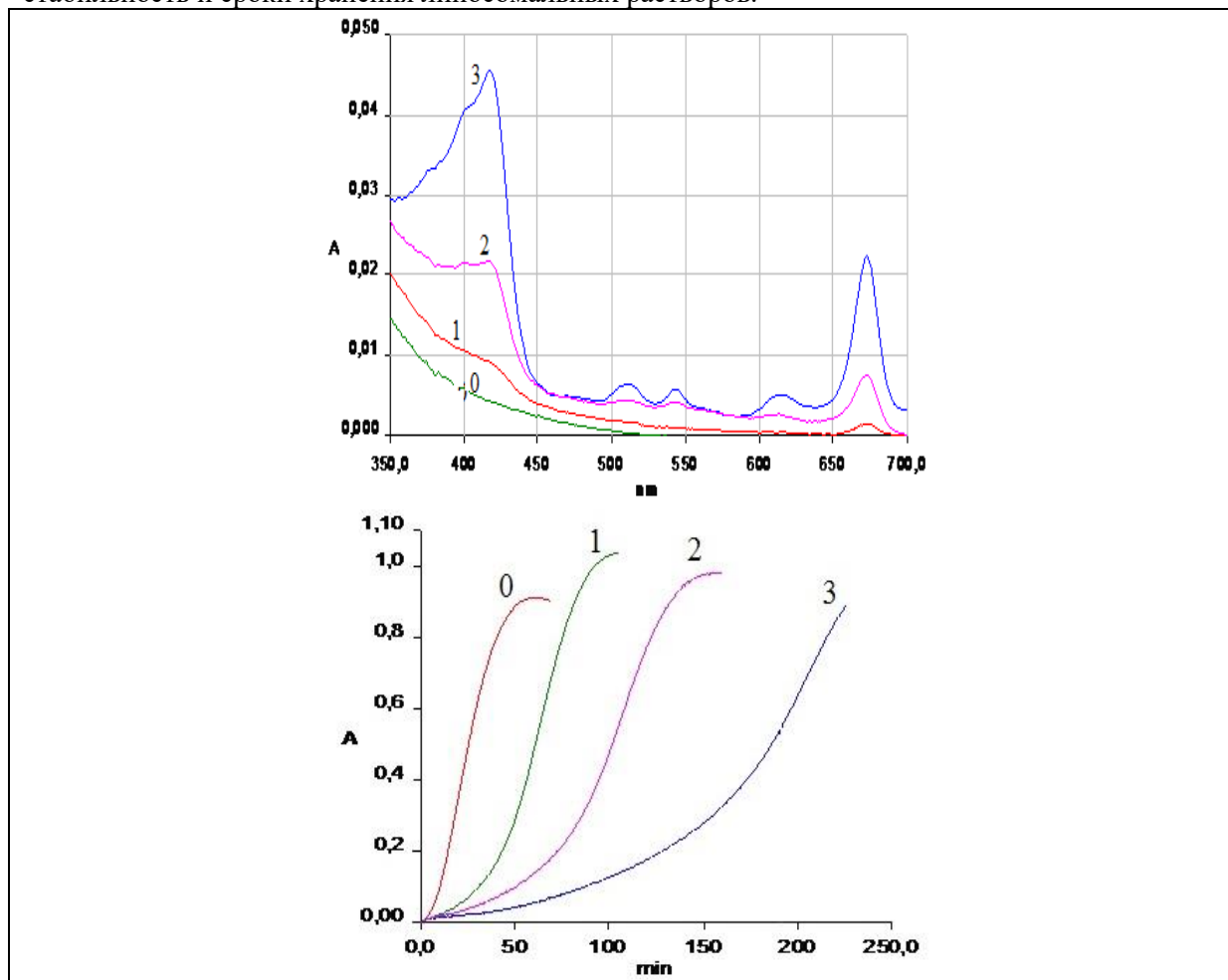


Рис.1. Спектры липосом ФХ с РРРа в толуоле разной концентрации (левый рис.) и кинетика образования ДК при инициированном ААРН окислении липосом ФХ, нагруженных РРР: 0 – «чистые» липосомы, 1 – 0,04 мкМ, 2 – 0,16 мкМ, 3 – 0,46 мкМ, [ФХ]=0,2 мг/мл.

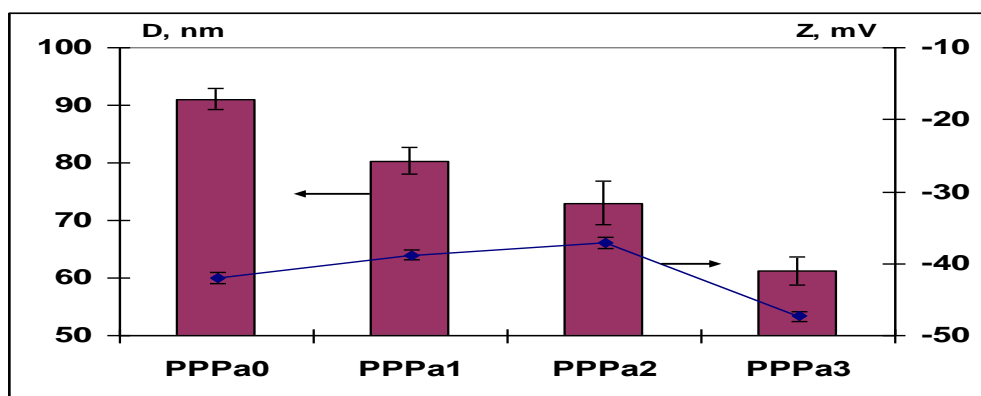


Рис.2. Средний диаметр (D) и Z-потенциал (Z) липосом с различной концентрацией включенных в них РРРА: 0 – «чистые» липосомы, 1 – 0,2 мкМ, 2 – 0,8 мкМ, 3 – 2,3 мкМ, [ФХ]=1 мг/мл.

Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН.

Литература

1. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. 2012. №3. – С. 23-30.
2. Сажина Н.Н., Антипова А.С., Семенова М.Г., Пальмина Н.П. «Иницированное окисление фосфатидилхолиновых липосом с включенными в них функциональными нутрицевтиками», Биоорганическая химия, 2019, Т. 45, № 2, с. 34–39.