

ЭФФЕКТИВНОСТЬ В СИСТЕМЕ *IN VITRO* ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА ХЛОРИНА e_6 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛОЖЕНИЯ УГЛЕВОДНОГО ФРАГМЕНТА В МАКРОЦИКЛЕ

Р.И. Якубовская¹, А.Д. Плютинская¹, Е.А. Плотникова¹, М.А. Грин², А.Ф. Миронов², В.С. Сергеева³

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, г. Москва

²Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, г. Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, г. Москва

Резюме

Изучены физико-химические и фотофизические свойства гликоконъюгатов на основе триметилового эфира хлорина e_6 с углеводными заместителями в разных положениях макроцикла, а также их фотоиндуцированная активность относительно опухолевых клеток человека (HEp2, A549 и HT29) и животных (LLC) в системе *in vitro*. Показано, что все фотосенсибилизаторы оставались стабильными в течение длительного времени в темновых условиях. При оценке эффективности соединений выявлено, что наибольшую активность проявлял фотосенсибилизатор с галактозой в пирроле А (величина $ИК_{50}$ варьировалась от 27 ± 2 до 75 ± 5 нМ в зависимости от клеточной культуры), в то время как наличие остатка углевода в пирроле С снижало фотоиндуцированную активность в 5–10 раз.

Ключевые слова: фотодинамическое воздействие, гликозилированные производные хлорина e_6 , фотосенсибилизаторы.

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – перспективное направление лечения злокачественных новообразований. Одним из путей усиления эффективности ФДТ является повышение селективности накопления фотосенсибилизаторов (ФС) в опухоли, которое может быть достигнуто за счет связывания молекул красителя с различными системами адресной доставки: моноклональными антителами, липопротеидами, белками и другими векторными молекулами [1]. В качестве лигандов, способных специфически связываться с рецепторами на поверхности опухолевых клеток, могут также выступать и углеводы.

Известно, что на поверхности опухолевых клеток присутствуют рецепторы, распознающие все типы углеводов. Среди них особое место занимают галектины, представляющие собой белки семейства лектинов, специфичные к β -галактозидам. Галектины встречаются в ядре, в составе цитоплазматической мембраны и в экстрацеллюлярном матриксе. Специфичность галектинов к β -галактозидам обусловлена наличием белков консервативного углеводузнающего домена, включающего около 135 аминокислотных остатков, которые образуют два β -складчатых листа, формирующих полость, способную удерживать линейный тетрасахарид [2, 3]. Поэтому β -галактозидные заместители способны улучшить направленную доставку ФС в клетку путем связывания гликоконъюгатов с галек-

тинами на поверхности клетки [4–6]. Также следует отметить, что присоединение углеводных фрагментов к макроциклическому кольцу придает молекуле амфифильный характер, способствует увеличению растворимости ФС в водных средах [7, 8].

Авторами были синтезированы гликоконъюгаты на основе триметилового эфира хлорина e_6 с углеводными остатками в разных положениях макроцикла и изучены их физико-химические и фотофизические свойства, а также фотоиндуцированная противоопухолевая активность в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Фотосенсибилизаторы

В качестве фотосенсибилизаторов использовали триметиловый эфир хлорина e_6 (3MeChI) и конъюгаты на его основе с остатком галактозы в пирроле А (3MeChI_gal_NoAc), пирроле С (2MeChI_gal_NoAc) и экзоцикле Е (MeCycloImChI_gal_NoAc) (рис. 1). Синтез фотосенсибилизаторов проведен в МИТХТ им. М.В. Ломоносова [2, 4, 9].

Гликоконъюгаты на основе производных хлорофилла а – гидрофобные соединения, для проведения спектрофотометрических исследований и биологических тестов в системе *in vitro* их растворяли в 100%-ном Кремофоре EL и доводили до концентрации 1 мг/мл 0,9%-ным раствором хлористого натрия. Концентрация Кремофора EL в конечных растворах составляла 5%.

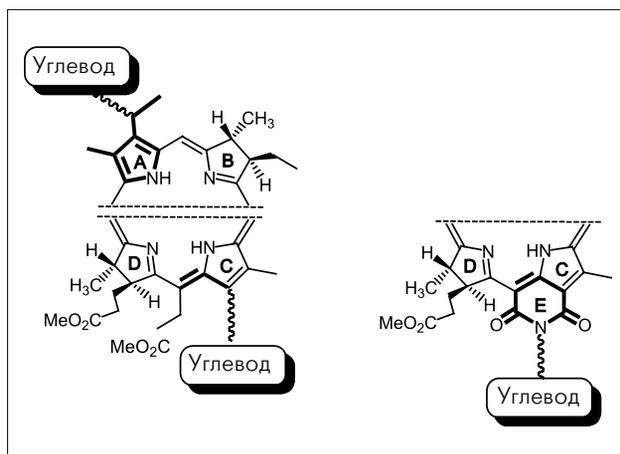


Рис. 1. Способы присоединения углеводных остатков к макроциклическому кольцу триметилового эфира хлорина e_6

Исследования в системе *in vitro*

Методика проведения абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии фотосенсибилизаторов в растворах.

Спектры поглощения исследованных фотосенсибилизаторов в культуральной среде регистрировали на спектрофотометре «Genesys 2» (США) в диапазоне волн длиной от 450 до 850 нм сразу после приготовления растворов, через 0,5; 2; 4 и 24 ч. Концентрация фотосенсибилизаторов в растворе составляла 10 мкг/мл. Растворителем служила среда Игла-МЕМ, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). В ходе исследования оценивали изменения оптической плотности и характер спектра в выбранном временном диапазоне.

Флуоресценцию регистрировали контактным способом на лазерном спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей «ЛЭСА-6» (ТОО «БИО-СПЕК», Россия). Возбуждали флуоресценцию He-Ne лазером при волне генерации длиной 632,8 нм, спектральный диапазон составлял 300–900 нм. Регистрацию спектров флуоресценции проводили сразу после приготовления растворов, через 0,5; 2; 4 и 24 ч. Выбранная концентрация (2,5 мкг/мл) достигалась путем последовательного разведения исходного раствора. В качестве растворителя использовали среду Игла-МЕМ, содержащую 10% ЭТС. Оценивали изменения в интенсивности флуоресценции и характер спектра.

Методика оценки фотостабильности фотосенсибилизаторов в бесклеточной среде

В опытах использовали растворы фотосенсибилизаторов, концентрация красителей в них составляла 2,5 мкг/мл. Растворы готовили непосредственно перед проведением опыта с использованием среды Игла-МЕМ, содержащей 10% ЭТС.

В лунки плоскодонного 96-луночного микропланшета (Corning, США) вносили по 150 мкл раствора. Источником оптического излучения служила галогеновая лампа мощностью 500 Вт, использовался широкополосный фильтр КС-10 ($\lambda \geq 620$ нм) и водный фильтр

толщиной 5 см. Плотность мощности составляла 17,0–17,5 мВт/см², а световая доза – 5 и 10 Дж/см². Интенсивность флуоресценции оценивали до и после облучения в диапазоне 600–800 нм.

Методика проведения фотодинамического воздействия (ФДВ) на опухолевые клетки

Исследования проводили на опухолевых клетках человека, полученных из НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН: эпидермоидной карциноме гортаноглотки (HEp2), аденокарциноме легкого (A549) и карциноме толстой кишки (HT29), а также на опухолевых клетках мыши – карциноме легкого Льюис (LLC), выделенных из солидной опухоли и адаптированных для культивирования в системе *in vitro*. Для пассирования клеток и проведения экспериментов использовали среду Игла-МЕМ с добавлением 2 мМ L-глутамин и 8–10% эмбриональной телячьей сыворотки. Культивировали клетки при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5%-ным содержанием CO₂.

Клетки рассеивали в лунки плоскодонного 96-луночного микропланшета (Corning, США) в концентрации $0,7 \times 10^5$ кл/мл, затем инкубировали в течение 28–30 ч в термостате. Далее в лунки планшета вносили тестируемые соединения, варьируя их концентрацию от 5 нМ до 10 мкМ. Для оценки фототоксичности через 0,5; 2; 4 и 6 ч инкубации с фотосенсибилизаторами клетки облучали галогеновой лампой через широкополосный фильтр КС-10 ($\lambda \geq 600$ нм) и водяной фильтр толщиной 5 см, оснащенный системой циркуляции жидкости. Плотность мощности составляла 17,0–17,5 мВт/см², расчетная световая доза – 10 Дж/см². После воздействия клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Для оценки цитотоксической активности клетки помещали в затемненные условия на 24 ч. Оценку выживаемости проводили как визуально, с помощью световой микроскопии, отмечая морфологические изменения клеток, так и колориметрическим методом с использованием МТТ-теста [10]. Биологически значимым эффектом считали ингибирование роста клеток в культуре более чем на 50%. Уровень ингибирования роста клеток вычисляли по формуле

$$IP = [(OD_k - OD_o) / OD_k] \cdot 100,$$

где IP – уровень ингибирования роста клеток в культуре, %; OD_o – оптическая плотность в опытных лунках; OD_k – оптическая плотность в контрольных лунках без воздействия, $\lambda = 550$ нм. Данную величину рассчитывали как среднюю по результатам трех независимых тестов.

Результаты исследования

Исследованные соединения

При поиске эффективных фотосенсибилизаторов направленного действия были синтезированы гликоконъюгаты на основе хлорина e_6 с углеводными остатками в разных положениях макроцикла: конъюгат с остатком галактозы в пирроле А (3MeChl_{gal}_NoAc), пирроле С (2MeChl_{gal}_NoAc) и экзоцикле Е

(MeCycloImChI_gal_NoAc). Для их сравнения использовали триметилловый эфир хлорина e_6 (3MeChI), не содержащий углеводных заместителей. Поскольку физико-химические и фотофизические свойства ФС в значительной степени определяют как фотоиндуцированную активность красителей, так и их перспективность для фармакологии, то на первом этапе проводили спектрофотометрические исследования, оценивая стабильность гликоконъюгатов при хранении в темновых условиях и при облучении, что является одним из основных требований, предъявляемых к фотосенсибилизаторам.

Физико-химические и фотофизические свойства гликоконъюгатов

Фотосенсибилизаторы 3MeChI и 3MeChI_gal_NoAc имеют максимумы поглощения и флуоресценции в области 665–670 нм; наличие имидного экзоцикла в структуре MeCycloImChI_gal_NoAc способствует сдвигу максимума в значительной степени в более длинноволновую область ($\lambda_{max} = 699 \pm 2$ нм), а введение остатка галактозы в пиррол С (2MeChI_gal_NoAc) приводит к смещению максимума поглощения на 10–12 нм влево ($\lambda_{max} = 654 \pm 3$ нм).

При изучении спектров поглощения и флуоресценции во времени установлено, что все производные хлорина e_6 стабильны в течение 24 ч инкубации при комнатной температуре в затемненных условиях.

Фотосенсибилизаторы в бесклеточной среде подвержены фотовыцветанию, что сопровождается снижением интенсивности флуоресценции в максимуме (рис. 2). Следует отметить, что конъюгаты с остатком галактозы в пиррольном цикле А и экзоцикле Е оказались более устойчивыми. Так, при облучении энергией плотностью 5 Дж/см² интенсивность флуоресценции данных флуорохромов снижалась незначительно (в 1,3–1,4 раза) относительно показателя, детектированного до воздействия светом, и при дальнейшем увеличении плотности энергии до 10 Дж/см² оставалась неизменной.

Фотоиндуцированная активность гликоконъюгатов

На следующем этапе изучали и оценивали фотоиндуцированную активность и темновую цитотоксичность гликоконъюгатов на культурах опухолевых клеток различного генеза в зависимости от концентрации соединений и времени инкубации. Все

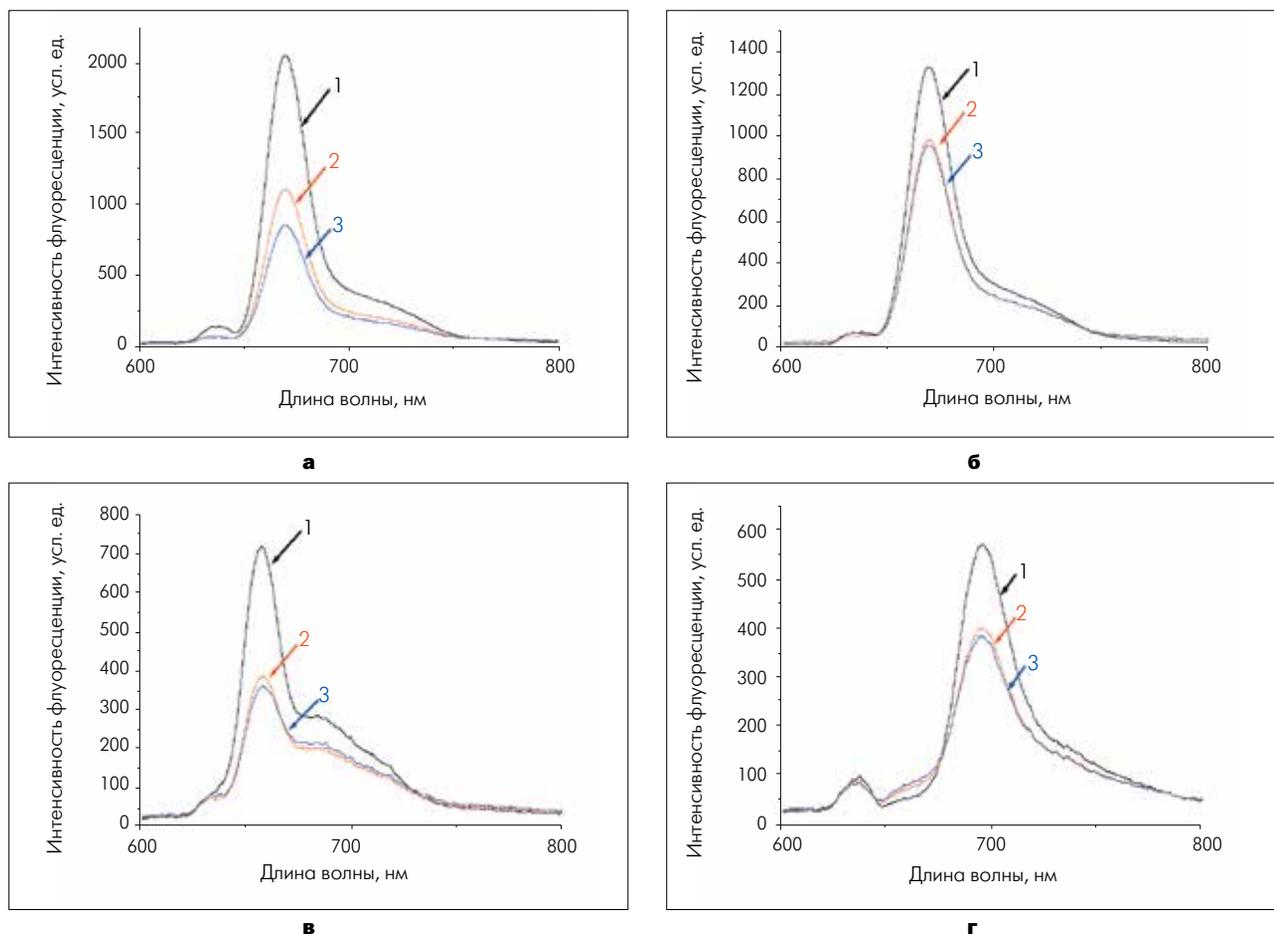


Рис. 2. Спектры флуоресценции 3MeChI (а), 3MeChI_gal_NoAc (б), 2MeChI_gal_NoAc (в), MeCycloImChI_gal_NoAc (г) до воздействия светом (1), при облучении с плотностью энергии 5 Дж/см² (2) и 10 Дж/см² (3) в культуральной среде

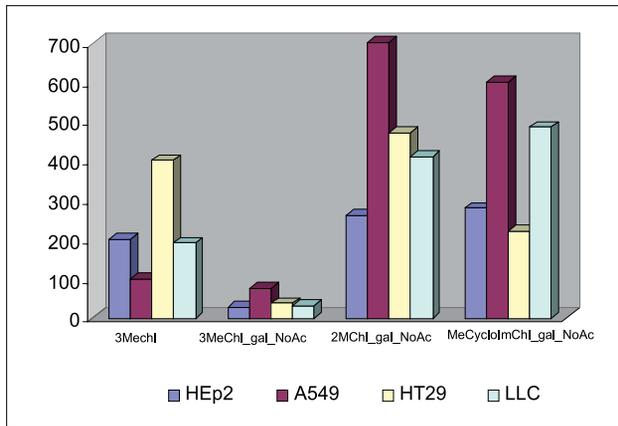


Рис. 3. Фотоиндуцированная активность гликоконъюгатов на клеточных культурах HEp2, A549, HT29 и LLC (время инкубации 4 ч)

фотосенсибилизаторы проявили высокую фотоиндуцированную активность относительно клеток в культуре, без светового воздействия красители не оказывали цитотоксического действия на клетки. Максимальное время накопления ФС в клетках составило 4 ч, при увеличении временного интервала до 6 ч величина $ИК_{50}$ изменялась незначительно (рис. 3).

Среди гликоконъюгатов наибольшей фотоиндуцированной активностью обладал ФС с углеводным фрагментом в пирроле А ($ИК_{50} = 27 \pm 2, 75 \pm 5, 38 \pm 3$ и 31 ± 2 нМ для клеток HEp2, A549, HT29 и LLC, соответственно), что в 7,4; 1,3; 10,5 и 6,1 раза, соответственно, выше, чем у негликозилированного триметилового эфира хлорина e_6 . Введение остатка галактозы в пиррол С и экзоцикл Е уменьшает фотоактивность ФС на порядок.

Таким образом, фотоиндуцированная активность гликоконъюгатов относительно клеток культур

HEp2, A549, HT29 и LLC существенным образом зависит от положения углеводных заместителей в макроцикле.

Удаление фотосенсибилизаторов из культуральной среды перед воздействием светом позволяет оценить вклад фотоиндуцированного повреждения, обусловленного красителем, накопившимся внутри клеток. Удаление конъюгата с остатком галактозы в пирроле А из культуральной среды перед воздействием света не приводило к изменению эффективности фотодинамического воздействия. Это косвенно свидетельствует о том, что уже через 4 ч после внесения ФС фотоиндуцированная цитотоксичность реализуется преимущественно за счет активации внутриклеточного красителя. Удаление остальных флюорохромов значительно снижало эффективность фотодинамического воздействия (таблица).

Заключение

Таким образом, проведенные исследования по изучению фотоиндуцированной активности производных хлорофилла а с углеводными остатками в системе *in vitro* показали, что наиболее эффективным, приводящим к значительному увеличению фотоиндуцированной активности, оказалось введение остатка углевода в пиррол А хлоринового макроцикла (величина $ИК_{50}$ составила 27 ± 2 нМ), тогда как наличие углеводного остатка в пирроле С или в экзоцикле Е значительно снижало фотоиндуцированную активность соединений. По-видимому, изменение положения углеводного остатка в макроцикле влияет на эффективность трансмембранного переноса гликоконъюгатов и их внутриклеточную локализацию.

Таблица

Фотоактивность в зависимости от присутствия фотосенсибилизатора в среде инкубации во время облучения (культура HEp2, время инкубации 4 ч)

Фотосенсибилизатор	Величина $ИК_{50}$, нМ, при	
	облучении с ФС в среде инкубации	облучении без ФС в среде инкубации (удаление непосредственно перед облучением)
3MeChI	200±12	280±17
3MeChI_gal_NoAc	27±2	29±3
2MeChI_gal_NoAc	260±15	640±22
MeCycloImChI_gal_NoAc	280±14	690±24

* 3MeChI – триметиловый эфир хлорина e_6 ; 3MeChI_gal_NoAc – конъюгат на основе триметилового эфира хлорина e_6 с остатком галактозы в пирроле А; 2MeChI_gal_NoAc – конъюгат на основе триметилового эфира хлорина e_6 с остатком галактозы в пирроле С; MeCycloImChI_gal_NoAc – конъюгат на основе триметилового эфира хлорина e_6 с остатком галактозы в экзоцикле Е; ФС – фотосенсибилизатор.

ЛИТЕРАТУРА

1. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соровский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – С. 32–40.
2. Grin M.A., Lonin I.S., Makarov A.I. et al. Synthesis of chlorin-carbohydrate conjugates by «click chemistry» // Mendeleev Commun. – 2008. – Vol. 18. – No. 3. – P. 135–137.
3. Zhang M., Zhang Z., Blessington D. et al. Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters // Bioconjugate Chem. – 2003. – V. 14(4). – P. 709–714.
4. Grin M.A., Lonin I.S., Lakhina A.A., Ol'shanskaya E.S. et al. 1,3 – dipolar cycloaddition in the synthesis of glycoconjugates of natural chlorins and bacteriochlorins // J. Porphyrins Phthalocyanines. – 2009. – Vol. 13. – P. 336–345.
5. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment // Medicina. – 2003. – V. 39 (12). – P. 1137–1150.
6. Park Y.K., Bold B., Cui B.C. et al. Binding Affinities of Carbohydrate-Conjugated Chlorins for Galectin-3 // Bull. Korean Chem. Soc. – 2008. – V. 29 (1). – P. 130–134.
7. Bonnett R., Martinez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy // Tetrahedron. – 2001. – V. 57 (47). – P. 9513–9547.
8. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W. et al. Photodynamic therapy // J. Natl. Cancer I. – 1998. – V. 90 (12). – P. 889–905.
9. Grin M.A., Lonin I.S., Lakhina A.A., Mironov A.F. Cross-metathesis of olefins in a synthesis of glycoconjugates based on chlorophyll a derivatives // Mendeleev Communication. – 2012. – V. 22. – P. 157–158.
10. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F. et al. // Cancer Res. – 1987. – Vol. 47. – P. 936–942.

INFLUENCE OF THE CARBOHYDRATE FRAGMENT POSITION IN THE MACROCYCLE OF CHLORINE e_6 TRIMETHYL ESTER GLYCOSYLATED DERIVATIVES ON THEIR IN VITRO PHOTO-INDUCED ACTIVITY

Yakubovskaya RI¹, Plyutinskaya AD¹, Plotnikova EA¹, Grin MA², Mironov AF², Sergeeva VS³

¹ P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute, Moscow

² Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow

³ N.I. Pirogov Russian State Medical University, Moscow

The physicochemical and photophysical properties, as well as photo-induced activity, of glycoconjugates based on chlorine e_6 trimethyl ether with various positions of carbohydrate fragment in the macrocycle have been studied. The photo-induced activity was investigated in the human (HEp2, A549 and HT29) and animal (LLC) cell lines. The tested compounds showed *in vitro* both high photo-induced activity and high stability in the dark. The photosensitizer with galactose in the A pyrrole ring demonstrated the highest activity (the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) varied from 27±2 nM to 75±5 nM in tests on different cell lines). Dyes with sugar substitutes in the C pyrrole ring were 5–10 times less active.

Keywords: photodynamic exposure, chlorin-carbohydrate conjugates, photosensitizers.

Контакты: Плютинская А.Д. E-mail: anna2031@rambler.ru