

Список литературы

1. Яхонтова Л.К. Геология, свойства и применение вермикулита. Л., 1967.
2. Дубенецкий К.Н., Пожнин А.П. Вермикулит (свойства, технология и применение в строительстве). Л. 1971.
3. Корнеев В.И., Данилов В.В. Растворимое и жидкое стекло. СПб, 1996.

УДК 577.357.464.23

ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ: ХАРАКТЕРИСТИКА, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ТРАНСПОРТА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Т.Е. ЗОРИНА, И.Е. КРАВЧЕНКО, И.И. ХЛУДЕЕВ

*Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь*

Поступила в редакцию 22 ноября 2016

Методом экструзии получены стабильные фосфолипидные наночастицы с включенными в них фотосенсибилизаторами лоринового ряда. Проведена оценка структурных и физико-химических характеристик комплексов липосомальных форм хлоринов. Изучены возможности использования наноразмерных липосом в качестве носителей гидрофобных фотосенсибилизаторов.

Ключевые слова: экструзионные липосомы, фотосенсибилизаторы, производная хлорина, распределение в биологических системах.

Введение

Наноразмерные системы, созданные на основе амфифильных молекул, в настоящее время вызывают большой интерес в фармакологии, так как они являются одним из видов терапевтических систем и дают возможность проводить целевую доставку лекарственных препаратов в организме без потери активности, осуществлять их пролонгированное действие, регулировать накопление включенных соединений в различных органах и тканях [1]. Использование таких систем как фосфолипидные везикулы, полимеры, циклодекстрины и др. – один из наиболее распространенных способов введения нерастворимых в воде порфириновых фотосенсибилизаторов (ФС) при проведении фотодинамической терапии. Процессы биораспределения при этом существенно зависят как от свойств самого активного соединения, так и от структурных характеристик частиц-носителей.

Целью данной работы являлось исследование физических характеристик, параметров связывания с биологическими объектами и оценка возможности использования липосомальных форм (ЛФ) в качестве носителей гидрофобных неполярных производных хлорина e_6 (ПХл e_6) – диметилового эфира Хл e_6 (ДМЭ) и триметилового эфира Хл e_6 (ТМЭ).

Экспериментальная часть

Фотосенсибилизаторы и их липосомальные формы. Синтез хлоринов проводили по модифицированной методике Фишера и Орта [2]. При синтезе неполярных хлоринов, диметилового эфира Хл e_6 и триметилового эфира Хл e_6 , в качестве исходных субстанций использовали феофитин или Хл e_6 . Чистоту Хл e_6 и его производных контролировали хроматографически. Содержание основного вещества в препаратах составляло более 95 %.

Для получения многослойных липосом с инкапсулированными производными хлорина e_6 использовали метод Бенгема. Для приготовления комплексов хлорин-липосомы этанольные растворы димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ), производства Sigma (США), смешивали с пигментом и высушивали на роторном испарителе под вакуумом на водяной бане

при 37 °С до образования липидной пленки. Высушенную липидную пленку гидратировали фосфатно-солевым буфером Дюльбекко, рН 7,4 (ФСБ) при постоянном перемешивании до образования дисперсии многослойных липосом.

Для получения малых однослойных липосом использовали экструзионный метод, который основывается на последовательном продавливании дисперсии липосом через мембранные фильтры «Nucleopore» (Whatman, Великобритания) с диаметром пор 100 нм с применением ручного мини-экструдера (Avanti Mini-Extruder, США).

Метод динамического рассеяния света применялся для определения размеров липосом в растворе. Измерения проводились на высокочувствительном анализаторе Nanoparticle Size Analyzer «Brookhaven 90Plus» (Австрия). Все эксперименты проводили в условиях термостатирования при 25 °С. В опытах использовали липосомы с концентрацией липида 1,0 мг/мл.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Образцы для атомно-силовой микроскопии готовили согласно методике, описанной в [3], с некоторыми модификациями, путем нанесения 10 мкл суспензии липосом с концентрацией липида 5 мг/мл и в разведении 1:10 на предметное стекло (ROTH, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Далее поверхность стекла высушивали на воздухе при 20 °С в течение 10–12 ч. Предметное стекло с образцом помещали на предметный столик атомно-силового микроскопа Solver P47PRO (НТ-МДТ, Россия). Измерения проводились в полуконтактном режиме на частоте 150 кГц с использованием кантилвера NSG 11. Количественная оценка размеров липосом и моделирование их трехмерных изображений производилась с помощью программы NT-MDT Image Analysis.

Спектрально-флуоресцентные характеристики хлоринов. Исследования спектров электронного поглощения проводили с помощью спектрофотометра Solar PV 1251c (СОЛАР, Беларусь). Спектрально-флуоресцентные характеристики пигментов исследовали на спектрофлуориметре Solar SFL-1211A (СОЛАР, Беларусь).

Исследование параметров накопления ФС клетками. Исследование процессов накопления пигментов в клетках проводили на флуоресцентном микроскопе Leica TCS SPE (Германия). Компьютерная обработка результатов проводилась в программе LAS AF.

Клеточные культуры. В работе были использованы клетки лейкемической линии лимфоидного происхождения Raji (коллекция клеточных культур РНИЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии). Суспензии клеток культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (ЭСТ) (Sigma, США).

Результаты и их обсуждение

С использованием экструзионного метода были получены образцы липосом из ДМФХ с различной степенью нагрузки ПХл е₆. В качестве основных показателей различных типов липидных везикул, содержащих ДМЭ или ТМЭ, служили степень включения ФС в везикулы и устойчивость липидных везикул при инкубировании в водном растворе. Для определения степени включения ФС в липосомы был применен стандартный метод очистки липосомальной дисперсии от несвязанного сенсibilизатора, основанный на использовании колоночной гель-хроматографии.

Определение структурных характеристик, в частности, размеров липосомальных частиц проводили методами динамического рассеяния света и АСМ. На основании анализа АСМ-изображений были построены трехмерные модели липосомальных наночастиц и определены их средние размеры (рис. 1). Метод АСМ позволяет оценить влияние нагрузки ФС на структурные характеристики липидных везикул. Были определены размеры липосом в контроле и при соотношении ДМЭ:ДМФХ (1:40) и (1:100). Расчет значений среднего диаметра контрольных и окрашенных липосом дал значения, представленные в табл. 1. Согласно полученным результатам значения среднего диаметра липосом, полученные методом динамического светорассеяния и АСМ, практически совпадают и находятся в пределах 100–110 нм. Из полученных данных можно сделать заключение, что нагрузка липидных везикул ФС ДМЭ практически не влияет на форму и размеры липосомальных частиц.

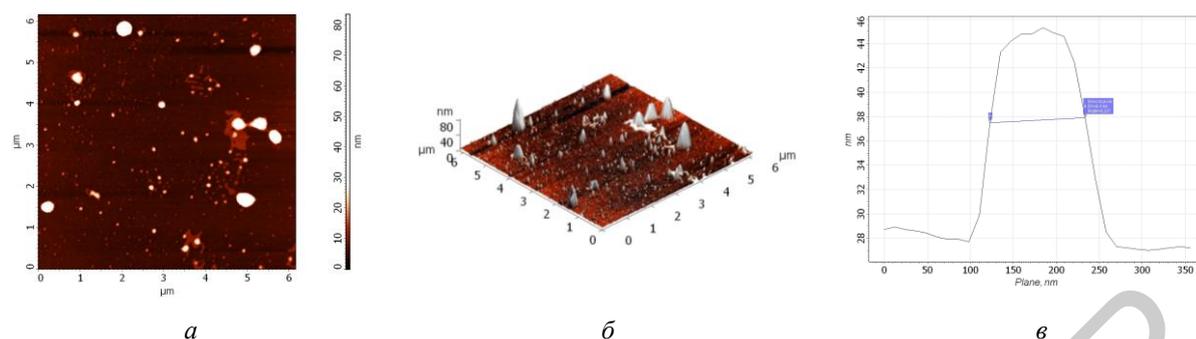


Рис. 1. АСМ-изображение липосом из ДМФХ с ДМЭ (соотношение 40:1) и оценка их размера: а – изображение при окне сканирования 6×6 мкм; б – трехмерная модель липосом, построенная по АСМ-изображению при окне сканирования 6×6 мкм; в – оценка размера указанных на рис. 1, а частицы, сечение рельефа поверхности

Таблица 1. Средний диаметр ненагруженных и нагруженных ДМЭ липидных везикул

Система	Степень нагрузки липосом		
	ДМФХ	ДМЭ:ДМФХ (1:40)	ДМЭ:ДМФХ (1:100)
*Светорассеяние	109,0 нм	112,0 нм	110,0 нм
**АСМ	110,0 нм	98,9 нм	118,0 нм

Примечания. *Расчет среднего диаметра по светорассеянию: относительная точность определения среднего диаметра ненагруженных и нагруженных ДМЭ липидных везикул составляла 2–3 %. Все представленные данные являются результатом от трех до пяти повторных экспериментов.

**Расчет среднего диаметра по АСМ: в таблице приведены результаты из 6 независимых экспериментов. Расчет значений среднего диаметра УЛВ проводился по группе (15–20 частиц) контрольных и окрашенных липосом. Средняя ошибка определения составляла 4–5 %.

Согласно данным динамического светорассеяния и АСМ полученные липосомальные формы хлоринов характеризуются низким уровнем полидисперсности. Фотофизические и структурные характеристики исследованных липидных везикул с включенными в них ФС остаются неизменными на протяжении 15 дней. Спектральные характеристики ДМЭ и ТМЭ в составе липидных везикул практически не изменяются при увеличении степени нагрузки в диапазоне соотношений пигмент: ДМФХ от 1:1000 до 1:100. Однако от степени нагрузки существенно зависит как величина коэффициента экстинкции, так и величина интенсивности флуоресценции. На рис. 2, а, б представлены спектры поглощения и флуоресценции ДМЭ в составе экструзионных липосом из ДМФХ. В пределах точности измерений спектральных характеристик не зафиксировано достоверных изменений положения полос в спектрах поглощения, в спектрах возбуждения и испускания флуоресценции для всех исследованных образцов, исключая суспензии липосом с максимальной степенью нагрузки ФС. Относительно небольшие изменения соотношения интенсивностей полосы Sore и Q-полос для образцов с уровнем нагрузки 1:20 и, в меньшей степени, для 1:50, вероятно, обусловлены эффектом внутреннего фильтра при исследовании сильно окрашенных липидных везикул.

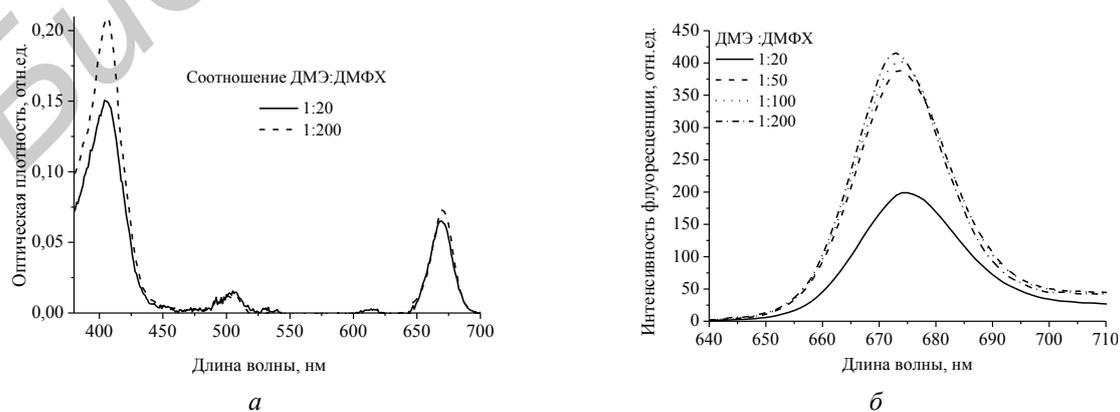


Рис. 2. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) ДМЭ в липосомах с различной степенью нагрузки

Локальная концентрация молекул ФС в везикулах с уровнем нагрузки 1:20 превышает 0,1 моль/л, что соответствует очень плотной его упаковке и, как следствие, допускает перекрытие эффективных сечений молекул ФС в мембранных структурах. Следствием этого является снижение коэффициента экстинкции, особенно заметное в случае интенсивной полосы S_{ore} . Снижение коэффициента экстинкции может служить одной из причин уменьшения относительного квантового выхода флуоресценции ПХл e_6 в липидных везикулах с высокой степенью нагрузки ФС. Анализ спектральных и поляризационных характеристик флуоресценции при введении нагруженных хлоринами липосом в раствор сыворотки крови, показал, что особенности структуры ФС оказывают существенное влияние на скорость перераспределения ПХл e_6 на белки и липопротеины. Практически все молекулы ДМЭ перераспределяются на белки в течении 10–15 мин, тогда как для перераспределения молекул ТМЭ необходимо более 60 мин. При этом, как было показано ранее, перераспределение ФС даже из сильно окрашенных везикул, при нагрузке липосом (1:20) на биологические структуры полностью восстанавливает уровень квантового выхода генерации синглетного кислорода [3]. Результативность фотодинамического воздействия в биологических системах определяется не только фотофизическими характеристиками ФС, но в значительной степени зависит от процессов связывания и локализации в составе клеточных и тканевых структур. Исходя из этого представляет интерес исследование влияния формы введения ФС на процессы накопления Хл e_6 и его производных в клетках при введении их в растворе и в липосомальной форме. Количественный анализ интегральной флуоресценции единичных клеток показал, что при инкубировании в течение 2 ч в одинаковых условиях исследованные ФС – Хл e_6 , ПХл e_6 и их липосомальные формы имеют различный уровень накопления в клетках (табл. 2). Такое соотношение уровней накопления хлоринов связано с временными различиями в кинетиках накопления исследованных ФС и коррелирует с данными, полученными с использованием метода проточной цитометрии [4]. Скорость накопления ЛФ ПХл e_6 в клетках существенно зависит от концентрации сывороточных белков в среде инкубирования.

Таблица 2. Накопление в клетках Raji хлоринов и липосомальных форм ПХл e_6

Фотосенсибилизатор	Хл e_6	ДМЭ	ТМЭ	ЛФ ДМЭ	ЛФ ТМЭ
Интегральная интенсивность флуоресценции	64,6 ± 5,3	530,3 ± 23,2	140,2 ± 8,1	480,1 ± 16,2	180,2 ± 12,2

Примечание: Время инкубирования 120 мин; температура инкубирования 37 °С; Концентрация клеток 1×10^6 /мл; концентрация хлоринов 5×10^{-6} моль/л; Соотношение ДМФХ:ФС = 40:1. Концентрация ЭСТ в среде инкубирования – 2 %.

Заключение

Проведенные исследования показывают, что включение гидрофобных производных хлорина e_6 в экструзионные липосомы позволяет получать стабильные структуры, которые могут быть использованы для создания новых фармакологических форм ФС, позволяющие сохранять их фотофизические свойства и кинетические характеристики.

LIPOSOMAL NANOPARTICLES: CHARACTERISTICS, APPLICATION FOR TRANSPORT OF PHOTOSENSITIZERS IN BIOLOGICAL SYSTEMS

T.E. ZORINA, I.E. KRAVCHENKO, I.I. KHLUDEYEV

Abstract

By extrusion of phospholipids stable nanoparticles loaded with photosensitizers a chlorin e_6 derivatives were obtained. The structural and physico-chemical characteristics of the liposomal forms of chlorins were estimated. The use of nanoscale liposomes as carriers of hydrophobic photosensitizers has been studied.

Keywords: extrusion liposomes, photosensitizers, chlorin derivative, distribution in biological system.

Список литературы

1. Petros R.A., DeSimone J.M. // Nat. Rev. Drug Discov. 2010. Vol. 9 (8). P. 615–627.
2. Fischer H., Orth H. // Acad. Verlag. 1937. Bd. 1. P. 305.
3. Зорина Т.Е., Янковский И.В., Кравченко И.Е. и др. // Биофизика. 2015. Т. 60., вып. 5. С. 922–930.
4. Зорина Т.Е., Янковский И.В., Кравченко И.Е. и др. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2013. № 3. С. 30–35.

УДК 621.391

АДАПТИВНОЕ ДВУХПОРОГОВОЕ КВАНТОВАНИЕ И СЕГМЕНТАЦИЯ ИЗОБРАЖЕНИЙ НА ОСНОВЕ РАЗДЕЛЕНИЯ И СЛИЯНИЯ ОБЛАСТЕЙ

О.М. АЛЬМИЯХИ, В.Ю. ЦВЕТКОВ, В.К. КОНОПЕЛЬКО, О.В. ГУСЕВА

*Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники
П. Бровки, 6, Минск, 220013, Беларусь*

Поступила в редакцию 23 ноября 2016

Приведены результаты оценки эффективности адаптивного двухпорогового квантования в сравнении с однопороговым квантованием для сегментации полутоновых изображений с использованием модифицированного метода разделения и слияния областей, основанного на прогрессивной обратной кластеризации.

Ключевые слова: сегментация изображений, квантование, выращивание областей, разделение и слияние областей.

Введение

Сегментация широко используется в обработке медицинских изображений. Известные методы сегментации, такие как выращивание областей [1] и разделения и слияния областей [2] сравнивают разности значений соседних пикселей с заданным порогом при принятии решения о присоединении пикселя к сегменту. В сегменты объединяются пиксели, примерно равные по значению, с использованием достаточно простого критерия. Усложнение данного критерия с целью повышения качества сегментации приводит к усложнению алгоритма сегментации, а в некоторых случаях – избыточности. Избежать этого позволяет предварительное адаптивное квантование изображений до сегментации [3–6], упрощающее критерий присоединения пикселя к сегменту за счет использования строгого равенства (реализуется как поразрядное суммирование значений сравниваемых пикселей по модулю 2 с проверкой результата на ноль) вместо сравнения модуля разности с заданным порогом или другого более сложного критерия.

Целью работы является оценка эффективности адаптивного двухпорогового квантования для сегментации полутоновых изображений с использованием метода разделения и слияния областей, его модификации на основе прогрессивной обратной кластеризации и метода выращивания областей.

Методы выращивания областей и разделения и слияния областей

Метод выращивания областей [1] основан на присоединении к текущему сегменту, изначально состоящему из одного образующего пикселя (точки роста), других пикселей, совпадающих по значению с образующим пикселем. Когда не остается пикселей, которые могут быть присоединены, сегмент считается сформированным и осуществляется переход на следующий цикл сегментации, начинающийся с выбора следующего образующего пикселя. Образующие пиксели могут назначаться или выбираться автоматически по различным критериям. В простейшем случае значения образующих пикселей выбираются по порядку при построчном сканировании изображения. При использовании адаптивного порога возможность присоединения