

УДК 535.343.32

ЭФФЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕТИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С БЕЛКАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

И.И. ХЛУДЕЕВ^{1,3}, М.П. САМЦОВ², Н.В. БЕЛЬКО², С.К. ДИК³¹Белорусский государственный университет³Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

Аннотация. Исследовано связывание наноструктурированных полиметиновых фотосенсибилизаторов с белками сыворотки крови. Согласно полученным данным, спектральные характеристики фотосенсибилизаторов в составе комплексов с белками существенно меняются в зависимости от типа белка.

Ключевые слова: полиметиновые фотосенсибилизаторы, белки сыворотки крови

Abstract. The binding of nanostructured polymethine photosensitizers with serum proteins was studied. According to the data obtained, the spectral characteristics of photosensitizers in the composition of complexes with proteins vary significantly depending on the type of protein.

Keywords: polymethine photosensitizers, serum proteins.

Введение

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами лечения злокачественных новообразований – малой инвазивностью и избирательностью воздействия на ткани-мишени. В значительной степени это обусловлено селективностью накоплению фотосенсибилизаторов (ФС) в опухолях вследствие особенностей их строения и функционирования (закишение интерстициальной жидкости, хаотичная васкулярная система, повышенное число рецепторов к липопротеинам низкой плотности). В стандартном протоколе ФДТ препарат вводят в организм внутривенно, поэтому локализация и контрастность накопления ФС зависит от процессов транспорта в кровеносной системе. Для большинства ФС, используемых в клинической практике, показано, что в кровотоке они перемещаются в составе комплексов с белками сыворотки крови (БСК), преимущественно с липопротеинами высокой (ЛВП) и низкой плотности (ЛНП) и сывороточным альбумином (САЧ) [1]. Поскольку для оценки содержания ФС в крови и опухолях широко используются оптические методы, необходимо знать и учитывать возможное влияние взаимодействия молекул ФС с БСК не только на их фармакокинетическое поведение в крови, но также и на их фотофизические характеристики.

Полиметиновые (трикарбоиндоцианиновые) красители (ПК) считаются перспективными для использования в ФДТ, поскольку они обладают интенсивной полосой поглощения (720–750 нм) в так называемой «полосе прозрачности тканей». Однако большинство ПК являются гидрофобными соединениями, которые очень слабо либо вообще нерастворимы в воде. Вследствие этого в водной среде наблюдается агрегация ПК, которая может приводить к существенным изменениям их спектральных и фотофизических характеристик. Образование комплексов ПК с белками сыворотки крови также может влиять на спектрально-флуоресцентные характеристики, во-первых, за счет разрушения агрегатов и перехода ПК в мономерное состояние, и, во-вторых, за счет изменения полярности микроокружения молекул ПК в составе комплексов краситель-белок.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось изучение распределения ПК среди белков сыворотки крови и оценка влияния комплексообразования ПК с различными транспортными белками на спектральные и фотохимические характеристики красителей.

Материалы и методы

В работе использовали синтезированные в лаборатории спектроскопии НИИПФП им. Севченко [2] красители: ПК154 и его производное ПК220, полученное путем замещения двух карбоксильных групп молекулами полиэтиленгликоля с молекулярной массой 300 кДа. Исходные растворы ПК с концентрацией 5×10^{-4} моль/л готовили в этаноле (ПК154) и в дистиллированной воде (ПК220). Спектры поглощения и люминесценции регистрировали с помощью спектрофотометра СОЛАР РВ-2201 и спектрофлуориметра СОЛАР СМ-2203. Оценку связывания ПК с компонентами сыворотки крови человека проводили методом эксклюзионной гель-хроматографии на колонках Sigma (1,5×50 см) с гелем Sephadex G-200, уравновешенным фосфатно-солевым буфером Дюльбекко рН 7,4 (ФСБ), который использовался также и в качестве элюента.

Обсуждение результатов

При разделении образцов сыворотки крови человека, окрашенной ПК, с помощью метода эксклюзионной гель-хроматографии было установлено, что исследуемые соединения выходят из колонки вместе с фракциями САЧ, ЛВП и ЛНП (рис.1).

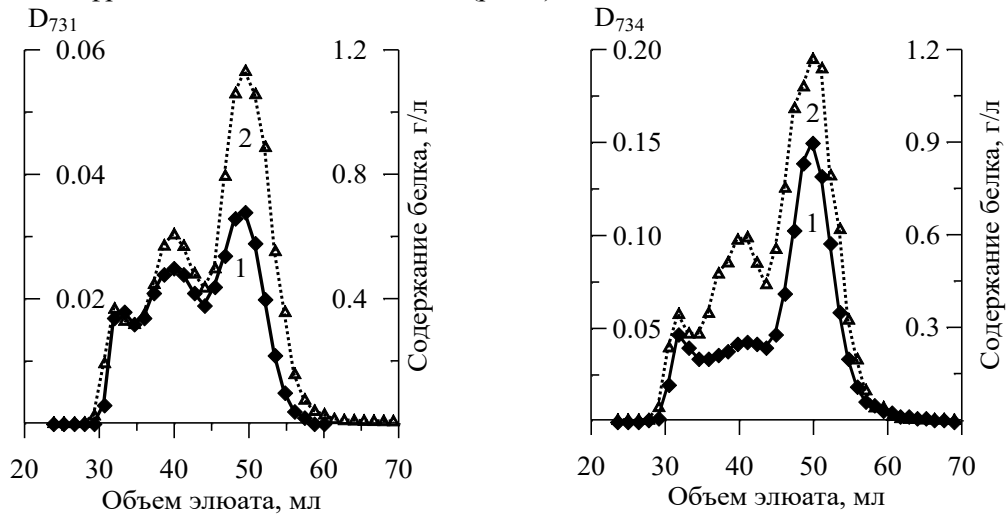


Рисунок 1. Связывание красителей ПК220 (левая панель) и ПК154 (правая панель) с белками сыворотки крови человека
1 – оптическая плотность фракций в максимуме поглощения ПК, 2 – концентрация белка во фракциях

Это свидетельствует о том, что ПК образуют комплексы с БСК. Следует отметить, что длительность предварительной инкубации образцов окрашенной ПК сыворотки, которая необходима для достижения равновесного распределения каждого из красителей среди белков сыворотки, сильно различалась. Так, при комнатной температуре после введения в образец сыворотки водного раствора ПК154 требовалось 2 часа прединкубации, а для ПК220 – 24 часа для достижения равновесия. Это может быть связано с особенностями структуры молекул – скорость диффузии у компактных молекул ПК154 вероятно существенно выше в сравнении с громоздкими молекулами ПК220. Это косвенно подтверждается тем фактом, что при повышении температуры инкубации до 37 °С время достижения равновесного распределения для ПК220 сокращалось до 2 часов.

Для гидрофобного ПК154 относительное количество пигмента, обнаруженного во фракциях САЧ, было почти в 2 раза больше в сравнении с количеством пигмента во всех липопротеиновых фракциях, что свидетельствует о преимущественном связывании молекул ПК154 с молекулами САЧ. В то время как для водорастворимого ПК220 характерно относительно высокое сродство к липопротеинам, поскольку более 50% суммарного количества красителя обнаруживается во фракциях ЛВП+ЛНП. При анализе спектров поглощения ПК было показано, что как ПК154, так и ПК220 при попадании в водную среду (фосфатный буфер, pH 7,4) подвержены самоагрегации, поскольку наблюдался гипсохромный сдвиг полосы поглощения данных красителей по сравнению со спектрами поглощения в органических растворителях [3]. Титрование образцов водных растворов ПК аликвотами сыворотки крови приводило к смещению максимумов спектров поглощения в красную область, что характерно для процессов дезагрегации некоторых неполярных ФС, например, фталоцианинов [4]. При добавлении даже небольших количеств сыворотки крови человека наблюдается батохромный сдвиг полос. Для ПК154 максимум спектра поглощения смещается от 704 нм (ФСБ) до 732 нм (1% сыворотки). Схожий эффект наблюдали и для ПК220, однако требовались более высокие концентрации сыворотки. Так, максимальный длинноволновый сдвиг максимума спектра поглощения с 709 нм (ФСБ) до 729 нм имел место при концентрации сыворотки $\geq 2\%$.

Анализ спектров поглощения ПК в различных белковых фракциях, полученных при гель-хроматографическом разделении образцов окрашенной сыворотки, обнаружил существенные различия в спектральных характеристиках. Как видно из представленных на рис. 2 результатов поло-

сы поглощения ПК в комплексах с липопротеинами сдвинуты в длинноволновую область в сравнении со спектрами поглощения комплексов ПК-САЧ.

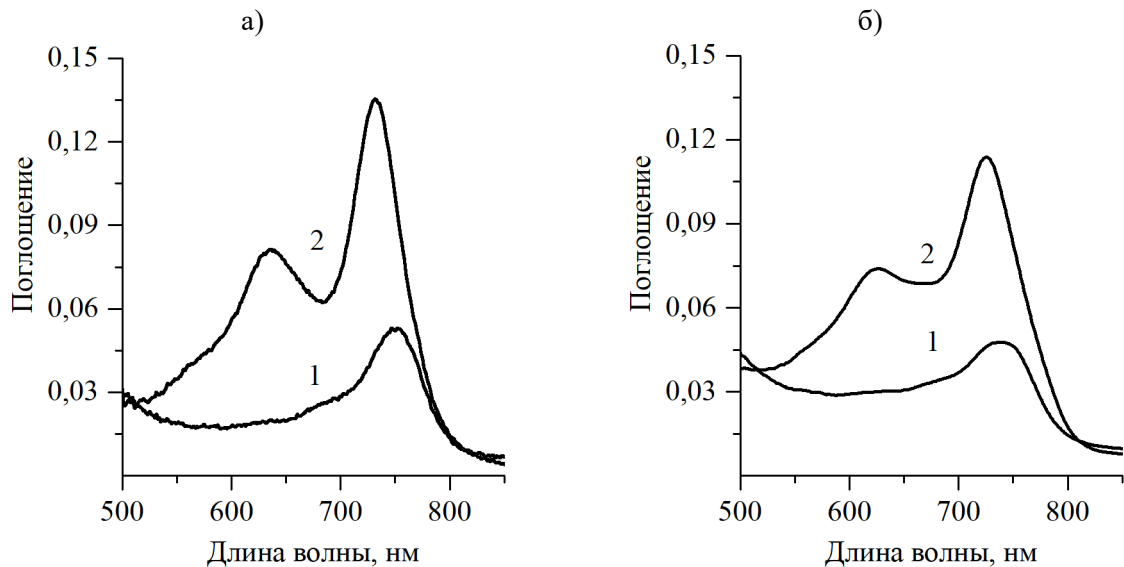


Рис. 2. Спектры поглощения ПК154 (а) и ПК220 (б) в составе комплексов с ЛНП (1) и САЧ (2)

Для ПК 154 разница в положении максимумов поглощения во фракции ЛНП (752 нм) и САЧ (731 нм) превышала 20 нм, в то время как максимумы поглощения комплексов ПК220-ЛНП (737 нм) и ПК220-САЧ (725 нм) различались всего на 12 нм. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что молекулы ПК в составе комплексов с ЛНП находятся в более неполярном микроокружении в сравнении с комплексами с САЧ. Можно предположить, что молекулы ПК могут погружаться в липидный слой липопротеиновой частицы, в то время как связывание с молекулами САЧ происходит на сайтах с различным сродством к молекулам ПК. Можно также предположить, что глубина встраивания молекул ПК154 больше, чем для молекул ПК220, у которых длинные цепочки полиэтиленгликоля могут играть роль «якорей», ограничивающих глубину погружения в липидную оболочку ЛНП.

Кроме того, в спектрах поглощения альбуминовых фракций дополнительно появляются полосы поглощения с максимумами при 636 нм для ПК154 и 626 нм для ПК220. Появление этих полос связано не с процессами агрегации-деагрегации красителей, а с образованием в образцах неких структур, имеющих отличные от ПК спектры поглощения. Вероятно, это происходит в процессе частичной деградации молекул ПК. Это подтверждается результатами проведенного ранее масс-спектрометрического анализа растворов ПК, в ходе которого были обнаружены соединения, поглощающие в области 630 нм и имеющие молекулярную массу приблизительно в два раза меньшую, чем молекулярная масса исходного красителя.

Таким образом, образование комплексов ПК с транспортными белками сыворотки крови способствует переходу красителей из агрегированного в мономерное состояние. При этом наблюдается bathochromic сдвиг спектров поглощения ПК в составе комплексов, величина которого зависит как от химической структуры красителя, так и от природы белка-носителя. Молекулы ПК, связанные с САЧ, в большей степени подвержены деградации в сравнении с молекулами красителя в составе комплексов ПК-ЛНП.

Заключение

Проведенные исследования показывают, что образование комплексов ПК с БСК существенно влияет на спектральные характеристики полиметиновых фотосенсибилизаторов. Природа белка-носителя сказывается как на спектрах поглощения ПК в составе комплексов, так и на интенсивности протекания процессов деградации ПК. Установленные особенности требуют более тщательного подхода к разработке методик измерения содержания ПК в плазме крови с использованием оптических методов.

Список литературы

1. Photosensitizer Transport and Distribution / T. Hasan [et al.] // Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Hamilton: [BC Decker](#); 2003.

2. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics / A. Lugovski [et al.] // J. Photochem. Photobiol. A. 2016. V. 316. P. 31–36.
3. Влияние комплексообразования с белками плазмы крови на спектральные характеристики трикарбоцианиновых красителей / Н.В. Белько и др. // Весці БДПУ. Серыя 3. Фізіка. Матэматыка. Інфарматыка. Біялогія. Геаграфія. 2018. №1. С. 14–20.
4. Harvey, P. D. Recent advances in free and metalated multiporphyrin assemblies and arrays; a photophysical behavior and energy transfer perspective // In: The porphyrin handbook / Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard. – Elsevier Science, USA, 2003. V. 18. P. 63–250.

УДК 616.858-008.6: 616.831-089

ВОЗМОЖНОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СТАБИЛОГРАФИИ В ОЦЕНКЕ ПРОИЗВОЛЬНОГО ПОЗНОГО КОНТРОЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА ПРИ ОТБОРЕ К ОПЕРАТИВНОМУ ЛЕЧЕНИЮ И НА ФОНЕ ГЛУБОКОЙ СТИМУЛЯЦИИ МОЗГА

С.А. ЛИХАЧЕВ, И.П. МАРЬЕНКО, А.Г. БУНЯК

Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии

Аннотация. Применение функционального динамического стабилметрического «Теста со ступенчатым воздействием» позволили выявить и оценить степень нарушения инициации произвольного движения и проследить их динамику на фоне нейростимуляции. Полученные результаты указывают на улучшение определенных показателей произвольного позного контроля у пациентов в течение первого месяца глубокой нейростимуляции с последующей стабилизацией в течение 2-х лет наблюдения.

Ключевые слова: произвольный позный контроль, болезнь Паркинсона, глубокая стимуляция мозга, стабилметрия.

Abstract. The use of the dynamic stabilometric “Test with step effect” made it possible to identify and assess violations of the voluntary movement and their dynamics during DBS. The results indicate the improvement of certain indicators of dynamic postural control in patients during the first month of DBS and stabilization during 2 years of observation.

Keywords: dynamic postural control, Parkinson's disease, deep brain stimulation, stabilometric research.

Введение

В основе стереотаксического оперативного лечения при болезни Паркинсона (БП) лежит целенаправленное воздействие на субталамическое ядро (STN), вентролатеральную группу ядер таламуса (Vim), внутренний сегмент бледного шара (GPi), и другие группы ядер, которые регулируют активность экстрапирамидной системы и осуществляют конвергенцию ее связей с центральной нервной системой на различных уровнях. Данные литературы о влиянии глубокой стимуляции мозга (ГСМ) у пациентов с БП на функцию произвольного позного контроля неоднозначны и противоречивы, а способы оценки постуральной функции не всегда объективны [1,2]. С помощью существующих методов оценки постуральных нарушений – комплексного показателя, характеризующего постуральную функцию и изменения походки – Postural Instability and Gait Disorder (PIGD), модифицированной шкалы оценки двигательной активности по М.Е. Tinetti и соавт. 1986 г. - Tinetti Balance and Gait Test, шкалы баланса Берга - Berg Balance Scale проводится клиническая качественная оценка постуральной функции. В ходе проведенных ранее исследований определена высокая надежность метода стабилграфии с функциональными тестами для диагностики нарушений реактивного позного контроля у пациентов с БП [3,4]. Поэтому на наш взгляд является важным разработка методических подходов, которые позволяют количественно объективизировать постуральные нарушения на этапе отбора и адаптацию постуральной функции пациента на фоне ГСМ.

Методика и экспериментальная часть

В основную группу вошли 52 пациента с БП, которым была проведена имплантация электродов в глубокие структуры головного мозга, нейростимулятора в подключичную область для электростимуляции определенных групп ядер головного мозга, чтобы откорректировать патологически разбалансированную активность в двигательных путях центральной нервной системы. В субталамические ядра электроды имплантированы 40 пациентам, во внутренний сегмент бледного шара – 9 пациентам, промежуточное ядро таламуса – 3 пациентам. Средний возраст 55,98±7,04 лет, длительность заболевания составила 11,37±3,49 лет, распределение по стадиям заболевания: