

УДК 577.37

**ИНКАПСУЛЯЦИЯ ХЕЛАТОВ ЕВРОПИЯ И ДОКСОРУБИЦИНА В ЛИПИДНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ****Е.В. Пахомова<sup>1</sup>, О.К. Куценко<sup>1</sup>, Г.П. Горбенко<sup>1</sup>, В.М. Трусова<sup>1</sup>  
Т. Делигеоргиев<sup>2</sup>, А. Василев<sup>2</sup>, С. Калоянова<sup>2</sup>, Н. Лесев<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077<sup>2</sup>Кафедра прикладной органической химии, Факультет Химии, Университет Софии, Болгария

Представлено 2 октября 2011 г.

Принято ...20 октября 2011

Исследовано распределение новых противоопухолевых агентов, хелатов европия (ХЕ) между водной и липидной фазами. Проведена оценка возможности коинкапсуляции двух препаратов (доксорубицина и комплекса европия) в липидные везикулы. Полученные с помощью метода равновесного диализа коэффициенты распределения свидетельствуют о том, что ХЕ могут эффективно захватываться липидной фазой липосом. Измерение собственной флуоресценции доксорубицина показало, что этот агент располагается преимущественно во внутренней водной фазе липосом. Обнаружено тушение флуоресценции Лаурдана и пирена хелатами европия. Установлено, что встраивание комплексов европия в липидный бислой зависит от химической структуры хелатов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** хелаты европия, доксорубицин, липосомы, тушение флуоресценции**ИНКАПСУЛЯЦИЯ ХЕЛАТИВ ЕВРОПИО І ДОКСОРУБИЦИНУ В ЛІПІДНІ ВЕЗИКУЛИ****О.В. Пахомова<sup>1</sup>, О.К. Куценко<sup>1</sup>, Г.П. Горбенко<sup>1</sup>, В.М. Трусова<sup>1</sup>  
Т. Делигеоргиев<sup>2</sup>, А. Василев<sup>2</sup>, С. Калоянова<sup>2</sup>, Н. Лесев<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077<sup>2</sup>Кафедра прикладної органічної хімії, Факультет Хімії, Університет Софії, Болгарія

Досліджено розподіл хелатів европію (ХЕ) між водною та ліпідною фазами. Проведена оцінка можливості коінкапсуляції двох препаратів (доксорубіцину і комплексу европію) в ліпідні везикули. Отримані за допомогою методу рівноважного діалізу коефіцієнти розподілу свідчать про те, що ХЕ можуть ефективно захоплюватись ліпідною фазою липосом. Вимірювання власної флуоресценції доксорубіцину показало, що цей агент розташовується переважно у внутрішній водній фазі липосом. Виявлено гасіння флуоресценції Лаурдану і пірену хелатами европію. Встановлено, що вплив доксорубіцину на вбудовування комплексів европію в ліпідний бішар залежить від хімічної структури хелатів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** хелати европію, доксорубіцин, ліпосоми, гасіння флуоресценції**ENCAPSULATION OF EUROPIUM CHELATES INTO LIPID VESICLES****E.V. Pakhomova<sup>1</sup>, O.K. Kutsenko<sup>1</sup>, G.P. Gorbenko<sup>1</sup>, V.M. Trusova<sup>1</sup>  
T. Deligeorgiev<sup>2</sup>, A. Vasilev<sup>2</sup>, S. Kaloianova<sup>2</sup>, N. Lesev<sup>2</sup>**<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov, 61077<sup>2</sup>Department of Applied Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Sofia, Bulgaria

The partitioning of europium chelates (EC) between the aqueous and lipid phases was studied. The possibility of coencapsulation of two anticancer drugs (doxorubicin and europium complex) into lipid vesicles was evaluated. Partition coefficients obtained by equilibrium dialysis technique indicate that EC can be effectively entrapped by the lipid phase of liposomes. Measurement of intrinsic fluorescence of doxorubicin suggests that this agent is located mainly in the inner aqueous phase of liposomes. EC were found to quench the fluorescence of Laurdan and pyrene. The effect of doxorubicin on incorporation of europium complexes into lipid bilayer was demonstrated to depend on chemical structure of chelates.

**KEY WORDS:** europium chelates, doxorubicin, liposomes, fluorescence quenching

В настоящее время липосомальные формы лекарственных препаратов являются предметом многих биомедицинских и биофизических исследований благодаря целому ряду их преимуществ: во-первых, липосомы формируются из липидов, имеющих биологическое происхождение, что делает их полностью биосовместимыми [1]. В случае их деструкции липиды могут быть использованы организмом как строительный материал. Во-вторых, амфифильная структура липосомальных липидов дает возможность нагружать эти системы как липофильными, так и гидрофильными соединениями [2]. Инкапсулированные в липосомы лекарства защищаются от деградации и трансформации в организме. Вариации размера и состава липидных везикул позволяют реализовать целенаправленную доставку лекарств, минимизировать побочные эффекты и увеличить терапевтическую активность [3]. Использование липосомальных систем особенно важно в терапии рака. Доксорубин – известный противоопухолевый антибиотик, фармакологическое действие которого заключается в интеркаляции в ДНК, формировании свободных радикалов и действии на мембраны клеток. Использование доксорубина в липосомальной форме позволяет ему накапливаться в опухоли в больших концентрациях по сравнению со свободной формой этого агента. Во многих случаях терапевтический результат достигается при использовании его комбинаций с различными препаратами. Хелаты европия принадлежат к новому классу потенциальных противоопухолевых препаратов, обладающих высокой цитотоксической активностью. Для того, чтобы добиться увеличения эффективности подобных лекарств, нужно оценить возможность их коинкапсуляции с известными агентами, в частности, доксорубином, в липосомы. Цель данной работы заключалась в исследовании распределения координационных комплексов европия между водной и липидной фазами липосом из фосфатидилхолина и его смеси с кардиолипином, и оценке возможности коинкапсуляции двух препаратов (доксорубин и хелата европия).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали фосфатидилхолин из яичного желтка и кардиолипин из бычьего сердца ("Биолек", Харьков, Украина), пирен, доксорубин ("Sigma", США), Лаурдан ((6-лауроил-2-диметиламинонафтаген) Invitrogen Molecular probes, Eugene, США). Координационные комплексы европия (V3, V6 – V11) и флуоресцентный зонд SQ-1 были синтезированы в Университете Софии «Св. Климент Охридский» (Болгария).

Мультислойные липосомы из цвиттерионного липида фосфатидилхолина (ФХ) и его смеси с анионным фосфолипидом кардиолипином (КЛ) были получены путем гидратирования липидной пленки. Оптическая плотность измерялась на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия). Измерения флуоресценции проводились на спектрофлуориметре LS-55 (Perkin-Elmer, Великобритания). Спектры флуоресценции пирена регистрировали при длине волны возбуждения 340 нм, SQ-1 – 640 нм, Лаурдана – 364 нм, доксорубин – 450 нм.

#### *Метод тушения флуоресценции*

Добавление различных веществ может приводить к уменьшению интенсивности флуоресценции зондов (тушению флуоресценции). Тушение может быть обусловлено различными процессами, имеющими место при взаимодействии флуорофора с окружающими молекулами, например, столкновениями молекул (динамическое тушение) [4] или формированием комплексов в основном состоянии (статическое тушение) [5], молекулярными перегруппировками, переносом энергии и т.д. [6]. Исследование тушения может дать информацию о локализации флуорофоров в белках

и мембранах и об их доступности тушителю. И статическое, и динамическое тушение требуют молекулярного контакта между флуорофором и тушителем. В случае динамического тушения, тушитель должен диффундировать к флуорофору в течение времени жизни возбужденного состояния. При взаимодействии зонда с тушителем флуорофор возвращается в основное состояние без излучения фотона. При статическом тушении формируется нефлуоресцирующий комплекс между зондом и тушителем. Тушение флуоресценции является источником ценной информации о взаимодействии лекарственных препаратов с мембранами [7].

Поскольку молекулы зонда излучают из низшего возбужденного состояния, измеряемая интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации возбужденных молекул зонда ( $A^*$ ).

В данной работе наблюдалось динамическое тушение. В том случае, когда молекулы зонда доступны тушителю, переход из возбужденного в основное состояние описывается как:

$$[A^*] = [A^*]_0 e^{-(k_1+k_2+k_q[Q])t} = [A^*]_0 e^{-t/\tau} \quad (1)$$

где  $\tau$  – время жизни флуоресценции в присутствии тушителя

$$\tau = 1/(k_1 + k_2 + k_q[Q]) \quad (2)$$

Поскольку уменьшение интенсивности флуоресценции, обусловленное тушением, пропорционально уменьшению времени жизни флуоресценции, подстановка ур-я (1) в ур-е (2) дает

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{k_1 + k_2 + k_q[Q]}{k_1 + k_2} = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (3)$$

где  $k_q$  – бимолекулярная константа скорости динамического тушения,  $F_0$  и  $F$  – интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя. Выражение (3) называется уравнением Штерна-Фольмера, а параметр  $k_q\tau_0$  – константой Штерна-Фольмера [6, 8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Определение коэффициентов распределения ХЕ в липидную фазу методом равновесного диализа*

Равновесный диализ – это простой, но эффективный метод исследования взаимодействий между молекулами. Этот метод используется для измерения концентраций связанного с макромолекулами и свободного лиганда [9]. Метод равновесного диализа основан на использовании полупроницаемой мембраны с размером пор, через которые могут проникать только небольшие молекулы свободного лиганда. В результате большие по размеру липидные везикулы и связанные с ними препараты будут удерживаться мембраной. Практическое применение метода равновесного диализа основано на использовании диализных ячеек. Обозначим объем отсека ячейки, первоначально заполненного только буфером –  $V_{out}$ , а объем отсека, содержащего смесь липосом и комплексов европия –  $V_{in}$ . После заполнения первого отсека молекулы исследуемых препаратов начнут распределяться в

Таблица 1 Молярные коэффициенты распределения ХЕ в липосомы

	Коэффициент распределения $K_p$
V3	$(3.8 \pm 1.1) \times 10^3$
V6	$(7.6 \pm 2.2) \times 10^3$
V6	$(1.6 \pm 0.5) \times 10^4$
V7	$(1.3 \pm 0.4) \times 10^4$
V8	$(3.2 \pm 0.8) \times 10^3$
V8	$(8.8 \pm 2.5) \times 10^3$
V9	$(9.0 \pm 0.3) \times 10^3$
V10	$(1.2 \pm 0.4) \times 10^5$
V11	$(4.0 \pm 1.1) \times 10^3$

предоставленном объеме. Часть из них свяжется с липосомами, а в то время как несвязанные молекулы начнут проникать через мембрану во второй отсек ячейки, первоначально содержащий только буфер. По истечении некоторого времени установится равновесие. Равновесные концентрации можно найти, измеряя оптическую плотность раствора, находящегося в объеме  $V_{out}$ . Для определения концентраций свободных и связанных с липосомами хелатов европия проводились измерения оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимуму поглощения препаратов (330 нм (V8), 262 нм (V3), 337 (V6), 318 нм (V7), 322 нм (V9), 347 нм (V10), 336 нм (V11)) внешних растворов контрольной и содержащей липосомы ячеек.

Коэффициент распределения находили из следующего соотношения:

$$K_p = \frac{(A_0^c - A_{out}^{eq})[water]}{[lipid]A_{out}^{eq}} \quad (4)$$

где  $A_0^c$  и  $A_{out}^{eq}$  - оптические плотности ХЕ в объеме  $V_{out}$  после установления равновесия в отсутствие и в присутствии липосом. Коэффициенты распределения, полученные таким образом представлены в Табл. 1. Анализ полученных результатов показывает, что исследуемые комплексы европия могут эффективно захватываться липидной фазой липосом.

#### Локализация доксорубицина в липосомах

Для определения локализации доксорубицина в липосомах были проведены две серии экспериментов, которые включали измерения собственной флуоресценции препарата. Во-первых, было проведено исследование тушения флуоресценции доксорубицина комплексом европия V7. Оказалось, что добавление V7 не приводит не к тушению, а к небольшому возрастанию флуоресценции (Рис. 1).

Во-вторых, было проведено титрование липосом, нагруженных доксорубицином, сквараиновым зондом SQ-1. Спектр поглощения SQ-1 перекрывается со спектром излучения доксорубицина. Поэтому можно ожидать переноса энергии между препаратом и зондом, если они находятся на расстоянии порядка нескольких нанометров, т.е., если они оба находятся в мембране.

Увеличение концентрации SQ-1 сопровождалось появлением пика флуоресценции зонда при 680 нм без уменьшения флуоресценции доксорубицина (Рис. 2А). При титровании липосом без препарата были обнаружены аналогичные изменения флуоресценции SQ-1 (Рис. 2Б). Следовательно, наблюдаемые спектральные эффекты не являются следствием переноса энергии. SQ-1 и комплексы европия имеют высокое сродство к липидному бислою [10-12], и легко распределяются в бислою из водной фазы.

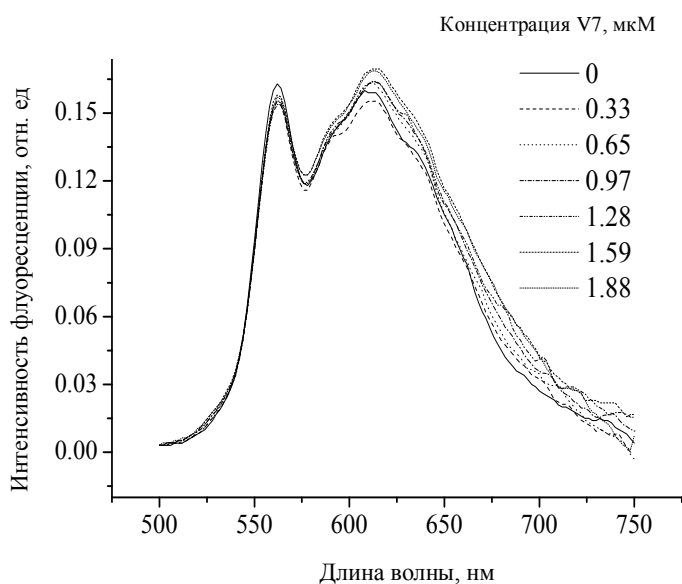


Рис. 1. Спектры флуоресценции доксорубицина при разных концентрациях комплекса европия V7. Концентрация липида 62.5 мкМ, соотношение доксорубицин.липид – 0.036

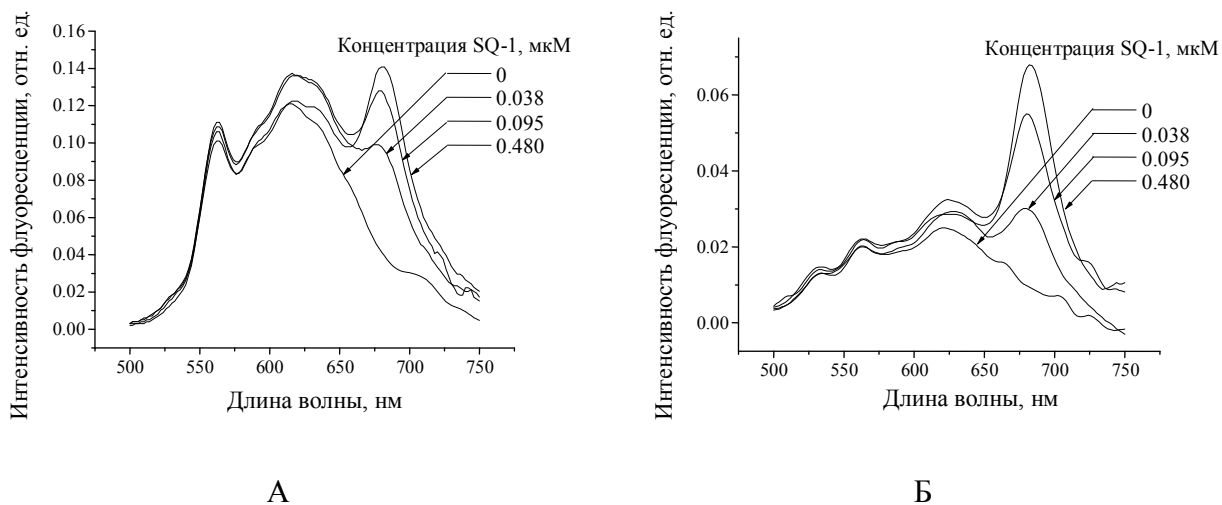


Рис. 2. Спектры флуоресценции липосом с доксорубицином (А) и без него (Б) при увеличении концентрации SQ-1. Концентрация липида 38 мкМ, соотношение доксорубицин:липид – 0.036

Поэтому отсутствие переноса энергии между доксорубицином и SQ-1 свидетельствует о том, что они находятся на расстоянии, превышающем характерное расстояние переноса энергии ( $\sim 10$  нм). Это возможно, когда один из этих агентов локализуется преимущественно в водной фазе. Отсутствие тушения флуоресценции доксорубицина V7 также свидетельствует об отсутствии одного из препаратов в мембране. Поэтому можно сделать вывод, что большая часть доксорубицина находится не в липидной, а во внутренней водной фазе липосом. Это означает, что доксорубицин может быть эффективно коинкапсулирован в водную фазу липосом вместе с комплексами европия, находящимися в липидном бислое. В то же время, некоторая часть доксорубицина может находиться в липидном бислое. Для проверки этого предположения и оценки возможности коинкапсуляции доксорубицина с ХЕ в липидную фазу липосом были проведены эксперименты по тушению флуоресценции.

*Коинкапсуляция комплексов европия и доксорубицина в липосомы различного состава по данным тушения флуоресценции*

С использованием метода тушения флуоресценции были определены коэффициенты распределения комплексов европия между липидной и водной фазами в разных видах липосомальных суспензий, и рассчитаны бимолекулярные константы тушения, зависящие от эффективности тушения и доступности молекул флуорофора тушителю. Как видно из Рис. 3А, интенсивность флуоресценции мембранного зонда Лаурдана уменьшалась с ростом концентрации хелата европия. Такой эффект наблюдался при разных концентрациях липида, причем, как видно из графиков Штерна-Фольмера (Рис. 3Б), с увеличением концентрации липида эффективность тушения снижалась. Эти данные указывают на то, что комплекс европия V3 является эффективным тушителем флуоресценции Лаурдана.

В последующих экспериментах была проведена оценка возможности одновременной инкапсуляции хелата европия и доксорубицина в липосомы. Эффекты тушения флуоресценции другого мембранного зонда, пирена, комплексами V6 и V9 наблюдались в суспензиях ФХ и ФХ/КЛ (10 мол% КЛ) липосом (Рис. 4А) без и в присутствии доксорубицина, для которых также были построены графики Штерна-Фольмера (Рис. 4Б).

На основе данных по тушению были определены коэффициенты распределения исследуемых хелатов европия в липидную фазу и бимолекулярные константы скорости тушения в различных видах липосомальных суспензий.

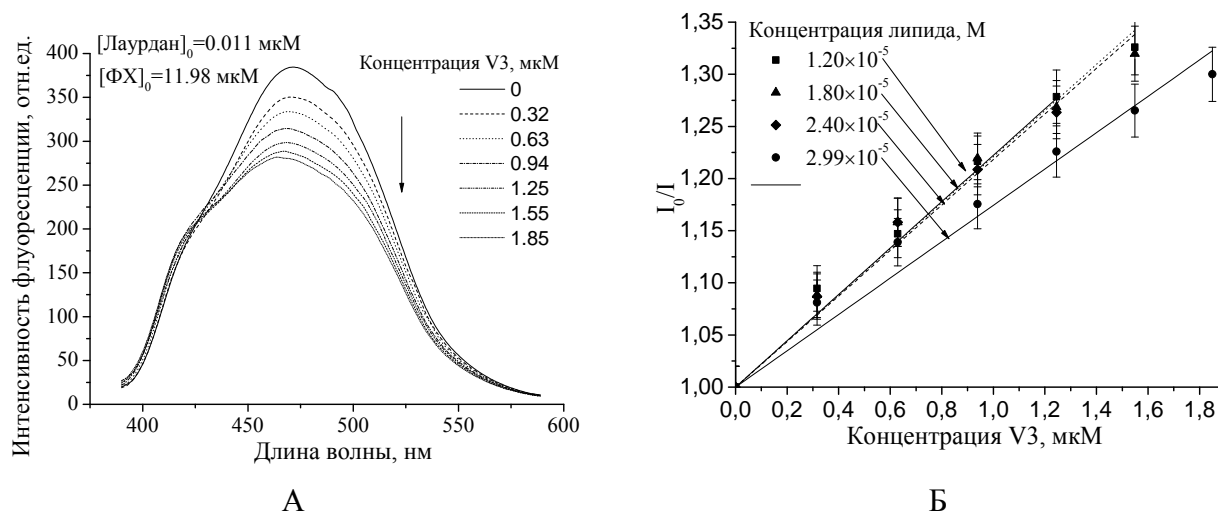


Рис. 3. Спектры флуоресценции Лаурдана в суспензии ФХ липосом (А). Графики Штерна-Фольмера для тушения флуоресценции Лаурдана комплексом европия V3 (Б).

Как можно видеть из Таблицы 2, доксорубин не препятствует распределению V9 в оба вида липосом и распределению V6 в ФХ/КЛ 10% липосомы. В случае ФХ липосом, доксорубин даже способствует проникновению V6 в мембрану.

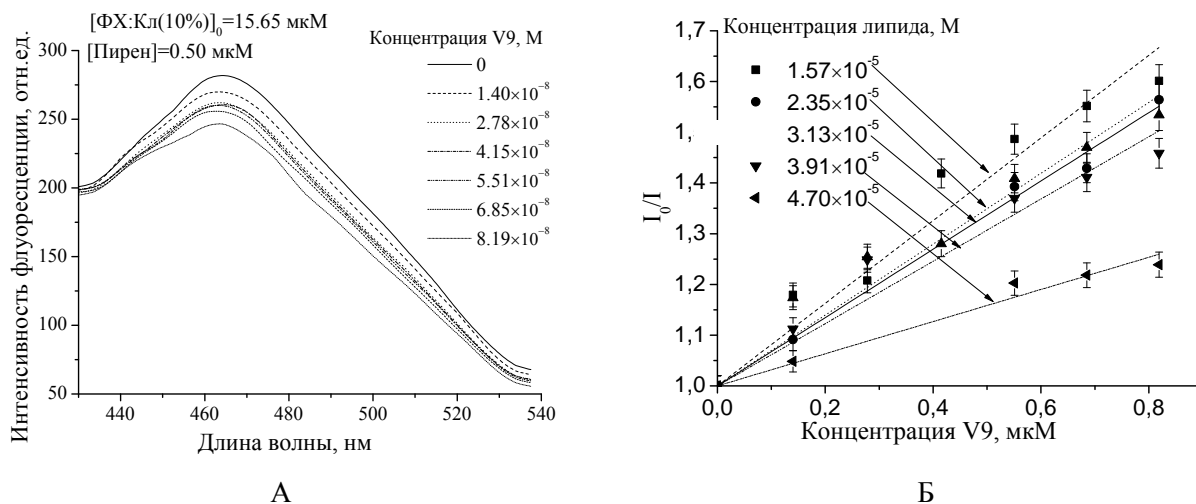


Рис. 4. Спектры флуоресценции пирена в суспензии ФХ липосом (А). График Штерна-Фольмера для тушения флуоресценции пирена комплексом европия V9 в суспензии ФХ липосом (Б).

Сравнение коэффициентов распределения, полученных разными способами (равновесный диализ и тушение флуоресценции) показывают, что они практически не отличаются. Это свидетельствует о том, что оба метода применимы для оценки связывания хелатов европия с липосомами.

Таблица 2. Параметры тушения флуоресценции Лаурдана и пирена комплексами европия V3, V6 и V9 в разных видах липосомальных суспензий

Комплекс европия	Липосомы	Коэффициент распределения	Бимолекулярная константа тушения, $M^{-1}s^{-1}$
V3	ФХ	$(1.74 \pm 0.35) \times 10^4$	$(1.60 \pm 0.32) \times 10^9$
	ФХ/КЛ 10%	$(4.93 \pm 0.99) \times 10^3$	$(1.95 \pm 0.39) \times 10^9$
V6	ФХ	$(8.48 \pm 1.70) \times 10^3$	$(4.81 \pm 0.96) \times 10^9$
	ФХ/КЛ 10%	$(1.38 \pm 0.28) \times 10^4$	$(1.67 \pm 0.33) \times 10^9$
	ФХ с доксорубицином	$(4.51 \pm 0.90) \times 10^4$	$(1.21 \pm 0.24) \times 10^9$
	ФХ/КЛ 10% с доксорубицином	$(1.48 \pm 0.29) \times 10^4$	$(4.28 \pm 0.86) \times 10^8$
V9	ФХ	$(1.59 \pm 0.32) \times 10^4$	$(1.86 \pm 0.37) \times 10^9$
	ФХ/КЛ 10%	$(7.21 \pm 1.44) \times 10^3$	$(6.21 \pm 1.24) \times 10^9$
	ФХ с доксорубицином	$(1.57 \pm 0.31) \times 10^4$	$(5.98 \pm 1.19) \times 10^8$
	ФХ/КЛ 10% с доксорубицином	$(8.13 \pm 1.63) \times 10^3$	$(1.20 \pm 0.24) \times 10^9$

### ВЫВОДЫ

1. С помощью метода равновесного диализа получена количественная информация о распределении комплексов европия между водной фазой и липидным бислоем ФХ липосом. Высокие значения коэффициентов распределения свидетельствуют об эффективном встраивании хелатов в липидный бислой.
2. Исследование локализации доксорубицина в мультислойных липосомах показало, что этот препарат располагается преимущественно во внутренней водной фазе везикул.
3. С использованием метода тушения флуоресценции проведено исследование взаимодействия хелатов европия с модельными мембранами. Полученные результаты показали, что комплексы европия являются эффективными тушителями флуоресценции пирена и Лаурдана. Способность комплексов тушить флуоресценцию этих зондов свидетельствует об инкорпорации препаратов в неполярную область мембран. Это предположение подтверждается высокими значениями коэффициентов распределения хелатов европия ( $\sim 10^4$ ).
4. Показано, что доксорубицин может накапливаться в липидной фазе везикул. Обнаружено, что влияние антибиотика на встраивание хелатов европия в липидный бислой зависит от их химической структуры.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawat M., Singh D, Saraf S, Saraf S. Lipid carriers: a versatile delivery for proteins and peptides // Yakugaku Zasshi. – 2008. – 128(3). – P. 269-280.
2. Shaheen S.M., Ahmed F.R.S., Hossen N., Ahmed M., Amran S., Anvar-UL-Islam. Liposome as a carrier for advanced drug delivery // Pak. J. Biol. Sci. – 2006. – 9(6). – P. 1181-1191.
3. Yamauchi M., Tsutsumi K., Abe M., Uosaki Y., Nakakura M., Aoki N. Release of drugs from liposomes varies with particle size // Biol. Phar. Bull. – 2007. – 30(5). – P. 963-966.
4. Jezewska M.J., Bujalowski W. Quantitative analysis of ligand-macromolecule interactions using differential dynamic quenching of the ligand fluorescence to monitor the binding // Biophys. Chem. – 1997. – 64. – P. 417-420.
5. Ahmad A., Kurkina T., Kern K., Balasubramanian K. Applications of the static quenching of rhodamine B by carbon nanotubes // Chem. Phys. Chem. – 2009. – 10. – P. 2251-2255
6. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescent Spectroscopy, third ed. Plenum Press, New York. 2006
7. Parry M.J., Jutila A., Kinnunen P.K., Alakoskela J.M. A versatile method for determining the molar ligand-membrane partition coefficient // J. Fluoresc. – 2007. – 17. – P. 97-103

8. Valeur B. Molecular fluorescence: principles and applications. Weinheim: Wiley-VCH. 2002
9. Santos N.C., Prieto M., Castanho M.A.R.B. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods // *Biochim. Biophys. Acta* – 2003. – 1612. – P. 123 – 135.
10. Yudintsev A., Trusova V., Gorbenko G., Deligeorgiev T., Vasilev A. Partitioning of EU(III) coordination complexes into lipid bilayer // *Biophys. Bull.* Vol. 19 (2). – 2007. – P. 65-68.
- 11 Yudintsev A., Trusova V., Gorbenko G., Deligeorgiev T., Vasilev A., Gadjev N. Lipid bilayer interactions of Eu(III) tris- $\beta$ -diketonato coordination complex // *Chem. Phys. Let.* – 2008. – 457. – P. 417-420.
12. Ioffe V.M., Gorbenko G.P., Deligeorgiev T., Gadjev N., Vasilev A. Fluorescence study of protein-lipid complexes with a new squarilium probe // *Biophys. Chem.* – 2007. – 128. – P. 75-86.