

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 615.831.4.015.21:615.263].032-018.1

ВЛИЯНИЕ ПРИСОЕДИНЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРИНА р К МОДУЛЬНЫМ РЕКОМБИНАНТНЫМ ТРАНСПОРТЕРАМ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕГО ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Е. О. Артеменко¹, Д. Г. Гилязова², А. А. Розенкранц^{1, 2}, В. Г. Лунин^{1, 3},
О. В. Сергиенко³, К. Н. Тимофеев², М. А. Грин⁴, А. Ф. Миронов⁴, А. Б. Рубин²,
А. С. Соболев^{1, 2}

¹Лаборатория молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена РАН; ²кафедра биофизики биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ³Лаборатория генетической регуляции биохимических процессов Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, ⁴Кафедра химии и технологии биологически активных веществ Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва

Ковалентное присоединение фотосенсибилизатора бактериохлорина р к модульным рекомбинантным транспортерам для направленного транспорта в ядра злокачественных клеток практически не влияет на его способность генерировать активные формы кислорода, но позволяет на несколько порядков увеличить эффективность его фотодинамического действия на клетках в культуре. Внутрядерная доставка фотосенсибилизатора в клетки меланомы мыши В16-F1 и эпидермоидной карциномы человека А-431 приводит к увеличению его цитотоксического действия в 230 и 715 раз соответственно.

Ключевые слова: фотосенсибилизаторы, фотодинамическая терапия, активные формы кислорода, направленный внутриклеточный транспорт, модульные рекомбинантные транспортеры

EFFECT OF COVALENT ATTACHEMENT OF BACTERIOCHLORIN P TO THE MODULAR RECOMBINANT TRANSPORTERS FOR TARGETED INTRACELLULAR DELIVERY ON ITS PHOTODYNAMIC ACTIVITY. E.O. Artemenko, D.G. Gilyazova, A.A. Rosenkranz, V.G. Lunin, O.V. Sergienko, K.N. Timofeev, M.A. Grin, A.F. Mironov, A.B. Rubin, A.S. Sobolev

Covalent attachment of bacteriochlorin p to the modular recombinant transporters for targeted intranuclear delivery had not an essential influence upon its ability to produce reactive oxygen species. However, such an attachment enhanced its photodynamic activity in vitro by several orders of magnitude: intranuclear delivery of the photosensitizer into the murine melanoma B16-F1 cells and human epidermal carcinoma A-431 cells increased its photocytotoxic effect 230- and 715-fold, respectively.

Key words: photosensitizers, photodynamic therapy, reactive oxygen species, targeted intracellular delivery, modular recombinant transporters

Среди подходов к лечению онкологических заболеваний наиболее распространенными являются хирургия, радио- и химиотерапия. В последнее время интенсивно развивается новое перспективное направление противораковой терапии — фотодинамическая терапия. Однако она также сопровождается рядом побочных эффектов, в частности фотоповреждением здоровых органов и тканей и общей интоксикацией организма. Причиной подобных явлений служат, во-первых, невысокая специфичность накопления фотосенсибилизаторов в раковых клетках и опухоли по сравнению с окружающими тканями, во-вторых, неспособность фотосенсибилизаторов самостоятельно проникнуть в наиболее поражаемые участки раковой клетки (например, клеточные ядра) и как следствие — необходимость введения в организм пациента высоких доз фотосенсибилизаторов.

Для обеспечения клеточной специфичности фотодинамической терапии и снижения эффективной дозы фотосенсибилизаторов нами [2, 3, 13–15] разработан ряд модульных рекомбинантных транспортеров (МРТ), обеспечивающих направленную доставку фотосенсибилизаторов в ядра клеток заданного типа. В состав МРТ входят: лигандный модуль, отвечающий за клеточную специфичность и

транспорт внутрь клетки-мишени; сигнал ядерной локализации, обеспечивающий транспорт в ядро; модуль, опосредующий выход МРТ из эндосом, а также носитель для связывания фотосенсибилизаторов. Лиганд в составе транспортера способен связываться с соответствующими клеточными рецепторами, содержание которых значительно повышено на опухолевых клетках, что приводит к интернализации образовавшегося комплекса путем рецепторопосредованного эндоцитоза. Для предотвращения деградации МРТ в лизосомах и обеспечения дальнейшего транспорта в ядро в состав МРТ введен модуль, отвечающий за его выход из эндосом в цитозоль, где сигнал ядерной локализации транспортера опознается клеточной системой ядерного импорта. Последующая активация фотосенсибилизатора светом определенной длины волны приводит к образованию активных форм кислорода (АФК) — синглетного кислорода (¹O₂) и различных свободных радикалов: гидроксильного ([•]ОН), гидропероксидного ([•]ООН), супероксид-аниона ([•]O₂⁻) и др. АФК повреждают мембраны, ДНК и другие клеточные структуры, приводя в результате к гибели клетки [15].

Для доставки в ядра раковых клеток-мишеней нами были созданы МРТ ДТокс-НМР-СЯЛ-α-

МСГ и НМР-СЯЛ-ДТокс-сп-ЭФР, специфичные для опухолевых клеток с повышенным синтезом рецептора для α -меланоцитстимулирующего гормона- α -МСГ (меланомы [16]) и рецептора для эпидермального фактора роста человека — ЭФР (рак головы и шеи, молочной железы и др. [6, 7], соответственно. Оба МРТ содержат в качестве эндосомолитического модуля транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс), оптимизированный сигнал ядерной локализации большого Т-антигена вируса SV-40 (СЯЛ) и бактериальный гемоглобиноподобный белок (НМР) для присоединения фотосенсибилизатора.

Образующиеся в результате световой активации фотосенсибилизатора АФК обладают различной окислительной способностью по отношению к молекулам биологического субстрата, повреждение которых в конечном счете приводит к гибели клетки. Предполагают, что синглетный кислород является ключевым окисляющим агентом, обеспечивающим основной фотоцитотоксический эффект [10], а из образующихся свободных радикалов наибольшей окислительной способностью по отношению к биомолекулам обладает гидроксильный радикал [1]. Присоединение фотосенсибилизатора к различным носителям для направленной доставки может влиять на его способность генерировать АФК, что будет сказываться на эффективности фотодинамического действия фотосенсибилизатора. В связи с этим возникает необходимость сравнить способность свободного и присоединенного к МРТ фотосенсибилизатора генерировать АФК.

При использовании направленной доставки с помощью МРТ эффективность фотодинамического действия фотосенсибилизатора в клетках-мишенях преимущественно определяется эффективностью его доставки в ядра клеток-мишеней и генерации АФК в клетках, которые, в свою очередь, зависят от функционирования каждого модуля молекулярной конструкции фотосенсибилизатор—МРТ в отдельности.

Целью данной работы явилось изучение влияния присоединения бактериохлорина р к МРТ на генерацию им АФК и исследование эффективности фотодинамического действия фотосенсибилизатора, присоединенного к МРТ, на раковые клетки в культуре.

Материалы и методы

Бактериохлорин р получен щелочной обработкой бактериопурпурина, полученного по методике, описанной ранее [8].

Конструирование модульных плазмид, кодирующих МРТ, синтез и очистка МРТ были проведены, как описано ранее [14].

Культура клеток. Клетки меланомы мыши линии В16—F1 с повышенным синтезом рецепторов для α -МСГ и клетки эпидермоидной карциномы человека линии А-431, обладающие повышенным синтезом рецепторов ЭФР, культивировали в минимальной среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM, "Gibco", США), с 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("Gibco") и 50 мкг/мл гентамицина при 37°C и 5% CO₂.

Синтез конъюгатов. Присоединение фотосенсибилизатора бактериохлорина р к транспортеру ДТокс-НМР-СЯЛ- α -МСГ (в молярном соотношении 2:1) осуществляли при помощи циклогексил-3(2-морфолиноэтил)карбодиимид-мета-4-толуолсульфоната, как описано ранее [14]. Конъюгацию бактериохлорина р с НМР-СЯЛ-ДТокс-сп-ЭФР (в молярном соотношении 1,5:1) осуществляли с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида и N-гидроксисукцинимид (оба "Sigma", США) [11—12]. Очистку конъюгатов проводили при помощи гель-фильтрации на сефадексе G-50 ("Pharmacia", Швеция).

Регистрация активных форм кислорода методом ЭПР. Спектры ЭПР регистрировали на ЭПР-спектрометре РЭ-1307 ("ЗАН", Россия) X-диапазона. Измерения проводили при комнатной температуре в присутствии кислорода воздуха в плоской кварцевой кювете вместимостью 100 мкл. Пробы облучали видимым светом при помощи лампы КГМ-300 (доза облучения за 10 мин составляла 360 кДж/м²).

Все измерения проводили в 40 мМ натрий-фосфатном боратном буфере, рН 9,0, с 5 мкМ бактериохлорина р в пробе. Спиновые ловушки (4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин — ТЕМП-ОН, синтезирован в ИХФ РАН и 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксид — ДМПО, "Sigma", США), азид натрия ("Sigma", США), этанол ("Merck", Германия) и супероксиддисмутаза человека ("Ростэпидкомплекс", Россия) добавляли к пробам до указанных концентраций.

Оценка фотоцитотоксического действия конъюгатов. Для исследования фотоцитотоксического действия фотосенсибилизаторов клетки меланомы В16—F1 и эпидермоидной карциномы А-431 рассеивали в 24- или 96-луночные и 48-луночные плашки, соответственно. Через 24 ч к клеткам добавляли бактериохлорин р или конъюгат (бактериохлорин р)-МРТ и инкубировали указанное время в DMEM с 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА).

После трехкратной промывки раствором Хэнкса клетки помещали в DMEM без индикатора с 2 мг/мл БСА, освещали (730—1000 нм) 75 кДж/м² (100% выживаемость без фотосенсибилизатора) и выращивали в DMEM с 10% сыворотки в атмосфере с 5% CO₂. Выживаемость клеток определяли через 3—4 сут окрашиванием метиленовым синим [5].

Результаты и обсуждение

Регистрация активных форм кислорода, генерируемых свободным и конъюгированным с МРТ бактериохлорином р. Для детекции синглетного кислорода использовали ТЕМП-ОН, который взаимодействует с синглетным кислородом с образованием спинового аддукта 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида [9]. Использованный в работе ТЕМП-ОН содержал следовое количество 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксида, что приводило к появлению незначительного темного сигнала (рис. 1, а). Облучение растворов, содержащих бактериохлорин р и ТЕМП-ОН, приводило к появлению характерного триплетного сигнала с линиями равной интенсивности с расстоянием ме-

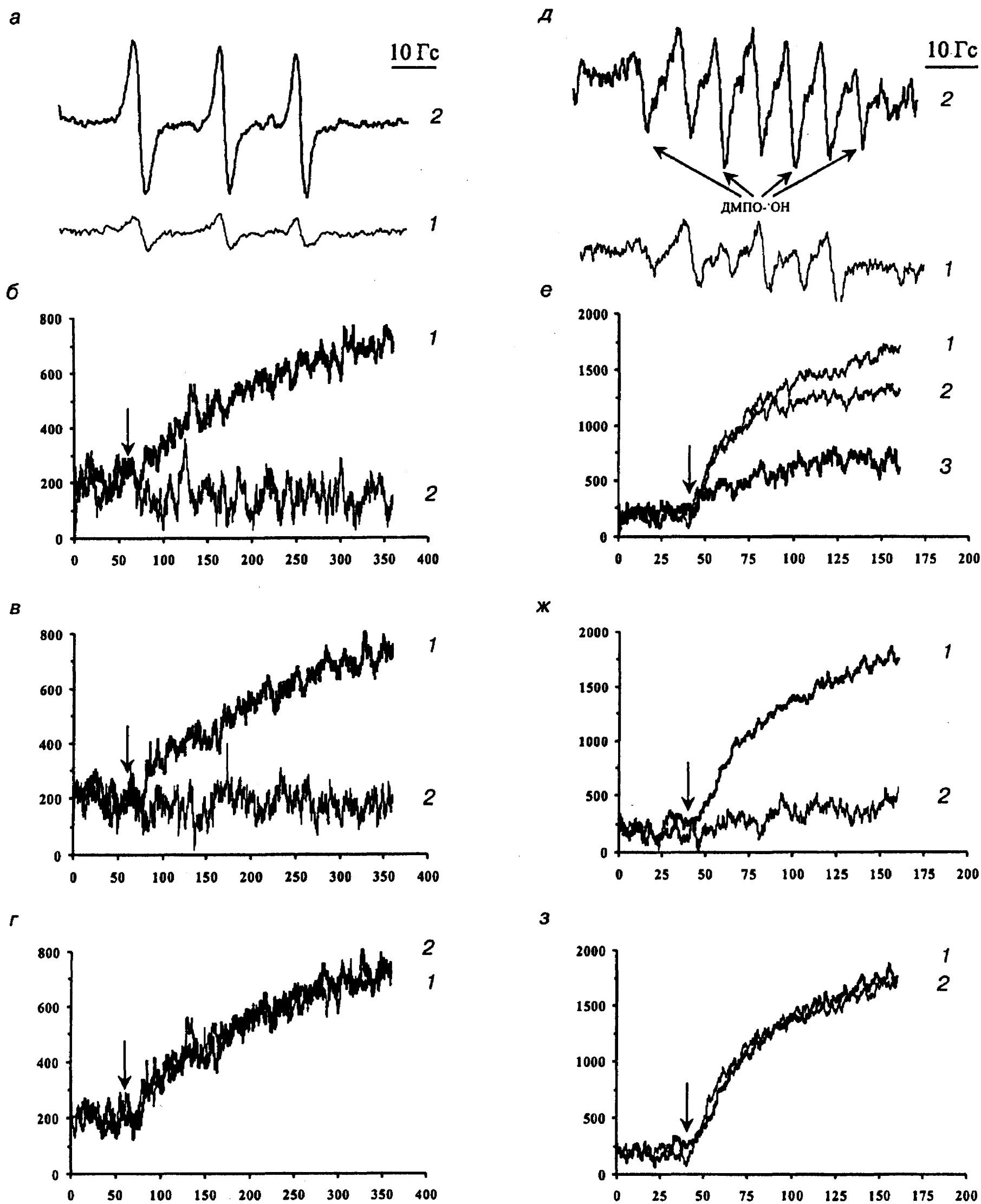


Рис. 1. Регистрация активных форм кислорода методом ЭПР.

Спектры ЭПР спинового аддукта 4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-N-оксида в присутствии бактериохлорина р до (1) и после (2) облучения в течение 10 мин (а) и спинового аддукта ДМПО-ОН в присутствии бактериохлорина р до (1) и после (2) облучения в течение 2 мин (д). На остальных графиках приведены кинетики образования соответствующих спиновых аддуктов (приведены результаты типичных экспериментов). Начало облучения обозначено ↓. Концентрация спиновых ловушек ТЕМПО-ОН (б-г) и ДМПО (е-з) в пробах составляла 50 мМ; б — образование 4-гидрокси-2, 2, 6, 6-тетраметилпиперидин N-оксида при облучении 5 мкМ бактериохлорина р (1) и его ингибирование в присутствии 10 мМ азиды натрия (2); е — образование 4-гидрокси-2, 2, 6, 6-тетраметилпиперидин N-оксида при облучении 5 мкМ конъюгата бактериохлорина р с МРТ (1) и 7,5 мкМ МРТ (2); з — образование 4-гидрокси-2, 2, 6, 6-тетраметилпиперидин N-оксида при облучении 5 мкМ бактериохлорина р (1) и конъюгата бактериохлорина р с МРТ (2); е — образование ДМПО-ОН при облучении 5 мкМ бактериохлорина р (1), влияние на его образование добавления 20 мкг/мл супероксиддисмутазы (2) или 50 мМ этанола (3); ж — образование ДМПО-ОН при облучении 5 мкМ конъюгата бактериохлорина р с МРТ (1) и 7,5 мкМ МРТ (2); з — образование ДМПО-ОН при облучении 5 мкМ бактериохлорина р (1) и конъюгата бактериохлорина р с МРТ (2). По оси абсцисс — время (в с); по оси ординат — регистрируемый сигнал (в отн. ед.).

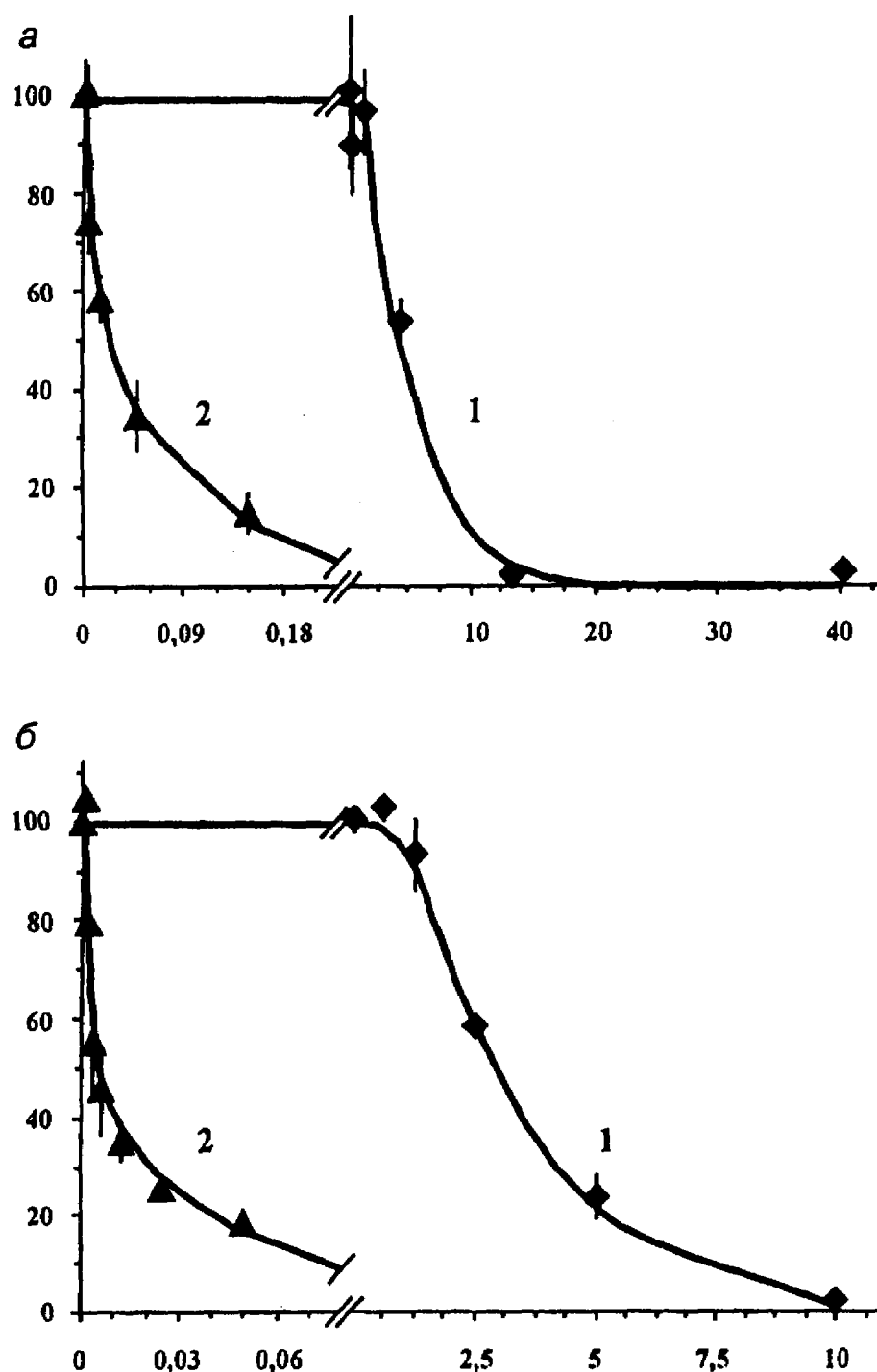


Рис. 2. Усиление фотоцитотоксического действия бактериохлорина *r* при доставке в ядра клеток-мишеней с помощью МРТ.

a — выживаемость клеток мышинной меланомы линии V16-F1, бактериохлорин *r* (1), конъюгат (бактериохлорин *r*)-ДТокс-НМР-СЯЛ- α -МСГ (2); *b* — выживаемость клеток эпидермоидной карциномы человека линии А-431, бактериохлорин *r* (1) и конъюгат (бактериохлорин *r*)-НМР-СЯЛ-ДТокс-сп-ЭФР (2). Приведены результаты типичных экспериментов. Эксперименты выполнены в трех повторах, результаты на графиках представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. По оси абсцисс — концентрация (в мкМ); по оси ординат — выживаемость клеток (в %).

жду линиями 17,2 Гс [9]. В отсутствие освещения или бактериохлорина *r* в облучаемом растворе не было зарегистрировано появления сигнала соответствующего нитроксильного радикала.

Добавление азидата натрия в концентрации 10 мМ к анализируемой пробе, содержащей бактериохлорин *r* и ТЕМП-ОН, приводило полному конкурентному подавлению взаимодействия ТЕМП-ОН с $^1\text{O}_2$ (рис. 1, б), что указывает на участие синглетного кислорода в образовании регистрируемого спинового аддукта.

Регистрацию гидроксильных радикалов осуществляли с помощью спиновой ловушки ДМПО [4]. При взаимодействии с радикалами $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ и другими ДМПО образует различные спиновые аддукты, которые можно идентифицировать по их ЭПР-спектрам [1]. Для доказательства участия гидроксильных радикалов в образовании ДМПО- $\cdot\text{OH}$ аддукта использовали ингибирование взаимодействия ДМПО с $\cdot\text{OH}$ -радикалами в результате туше-

ния гидроксильных радикалов этанолом. Добавление этанола до 50 мМ к анализируемой пробе, содержащей бактериохлорин *r* и ДМПО, приводило к уменьшению интенсивности регистрируемого сигнала примерно в 3 раза (рис. 1, е). Добавление супероксиддисмутазы к исследуемой пробе незначительно уменьшало величину регистрируемого сигнала — примерно в 25% (см. рис. 1, е), что может быть объяснено ингибированием образования $\cdot\text{OH}$ -радикалов в реакциях с участием супероксида [4].

Облучение растворов, содержащих бактериохлорин *r* и ДМПО, приводило к появлению мультиплетного сигнала с линиями разной интенсивности (рис. 1, д). Квартет с интенсивностями линий 1:2:2:1 с расстоянием между линиями 14,9 Гс соответствует появлению спинового аддукта ДМПО- $\cdot\text{OH}$ [4]. Для регистрации кинетики исследуемого процесса образования спинового аддукта ДМПО- $\cdot\text{OH}$ сигнал регистрировали при фиксированном значении поля, соответствующем максимуму одной из характерных полос появляющегося ЭПР спектра.

При облучении растворов, содержащих свободный бактериохлорин *r* и бактериохлорин *r*, ковалентно присоединенный к МРТ, не было выявлено заметных различий в кинетике появления сигналов спиновых аддуктов (рис. 1, з, ж). Облучение растворов, содержащих такую же концентрацию немодифицированного бактериохлорина *r* МРТ, не приводило к появлению детектируемых сигналов от образующихся нитроксильных радикалов (рис. 1, в, ж).

*Эффективность фотоцитотоксического действия бактериохлорина *r* при доставке в ядра клеток-мишеней с помощью МРТ.* Исследование фотоцитотоксического действия бактериохлорина *r* на клетках меланомы мыши V16-F1 показало, что его включение в состав конъюгата сДТокс-НМР-СЯЛ- α -МСГ позволяет значительно повысить эффективность фотодинамического действия (рис. 2, а), концентрация полумаксимального действия (бактериохлорин *r*)-ДТокс-НМР-СЯЛ- α -МСГ на этих клетках была примерно в 230 раз ниже, чем для свободного бактериохлорина *r* (22 нМ и 4,99 мкМ соответственно).

Концентрация полумаксимального действия конъюгата бактериохлорина *r* с транспортером НМР-СЯЛ-ДТокс-сп-ЭФР составила 4,2 нМ, что в 715 раз ниже, чем тот же показатель для свободного бактериохлорина *r* (3 мкМ) (рис. 2, б).

Как известно, фотосенсибилизаторы, представляющие терапевтический интерес, в клетке локализуются преимущественно в плазматической мембране, лизосомах, митохондриях [15] и практически не обнаруживаются в ядре — компартменте, который является одним из наиболее чувствительных к действию АФК, продуцируемых при облучении фотосенсибилизатора. Направленная доставка фотосенсибилизаторов в ядра клеток заданного типа с помощью МРТ позволила повысить эффективность фотодинамической терапии, а также обеспечила клеточную специфичность цитотоксического действия. Ковалентное присоединение фотосенсибилизатора к МРТ могло повлиять на его способность генерировать АФК, обеспечивающие цитотоксический эффект, что сказывалось бы на

эффективности фотодинамического действия фотосенсибилизатора. Сравнение генерации синглетного кислорода и гидроксильных радикалов свободным бактериохлорином р и его конъюгатом с МРТ методом ЭПР не выявило заметных различий в кинетике накопления образующихся спиновых аддуктов, что свидетельствует об отсутствии заметного влияния ковалентного присоединения бактериохлорина р к МРТ на генерацию им АФК.

Как уже упоминалось выше, успешная доставка фотосенсибилизатора в клеточное ядро зависит от эффективного функционирования конъюгата фотосенсибилизатор—МРТ на каждой стадии транспорта. Оценка функциональной активности каждого из модулей транспортера ДТокс-НМР-СЯЛ- α -МСГ показала, что включение отдельных модулей в состав химерной конструкции существенно не изменило их свойств [14]. Важно отметить, что перестановка модулей внутри конструкции и замена одного из модулей также не оказала существенного влияния на свойства модулей. При создании МРТ НМР-СЯЛ-ДТокс-ср-ЭФР мы изменили порядок расположения модулей, а последовательность α -МСГ, выполняющего функцию лиганда и специфичного к ряду меланом, мы заменили на последовательность ЭФР (рецепторы ЭФР сверхэкспонированы на клетках ряда карцином, рака головы и шеи, молочной железы, злокачественных новообразований мозга и др. [6, 7]). Подобные замены, по нашему мнению, позволят доставлять фотосенсибилизаторы в ядра клеток разных типов, у которых повышено содержание мембранных интернализуемых рецепторов к соответствующему лиганду. Заметим, что ковалентная модификация МРТ бактериохлорином р не изменяла свойств транспортеров (данные не приводятся).

Многочисленное усиление фотоцитотоксического действия бактериохлорина р, включенного в состав конъюгатов с МРТ, на клетки в культуре позволяет предположить, что направленная доставка фотосенсибилизаторов в ядра клеток-мишеней может быть использована для увеличения эффективности фотодинамической терапии раковых опухолей. Более выраженный цитотоксический эффект при использовании конъюгата (бактериохлорин р)-НМР-СЯЛ-ДТокс-ср-ЭФР, возможно, связан с большим количеством рецепторов ЭФР на поверхности клеток карциномы А-431 и тем самым — большим поступлением МРТ в эти клетки по сравнению с клетками меланомы В16-Ф1 и меланокортиновыми рецепторами на них.

Заключение. Ковалентное присоединение бактериохлорина р к МРТ практически не влияет на его способность генерировать активные формы кислорода. Фотодинамическая активность фото-

сенсибилизатора при доставке с помощью МРТ в ядра клеток-мишеней увеличивается на 2—3- порядка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецова Н. А., Калия О. Л. Фотокаталитическая генерация активных форм кислорода в биологических средах в методе фотодинамической терапии // Рос. хим. журн. — 1998. — Т. 42. — С. 36—49.
2. Akhlynina T. V., Jans D. A., Rpsenkranz A. A. et al. Nuclear targeting of chlorin e_6 enhances its photosensitizing activity // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 20328—20331.
3. Akhlynina T. V., Jans D. A., Statsyuk N. V. et al. Adenovirus synergize with nuclear localization signals to enhance the nuclear delivery and photodynamic action of internalizable conjugates containing chlorin e_6 // Int. J. Cancer. — 1999. — Vol. 81. — P. 734—740.
4. Das K. S., Misra H. P. Scavengers of hydroxyl radicals and inhibitors of NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine lung microsomes // J. Biol. Chem. — 1992. — Vol. 265. — P. 15371—15374.
5. Finlay G. J., Baguley B. C., Wilson W. R. A semiautomated microculture method for investigating growth inhibitory effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells // Anal. Biochem. — 1984. — Vol. 139. — P. 272—279.
6. Gibbs J. B. Anticancer drug targets: growth factors and growth factor signaling // J. Clin. Invest. — 2000. — Vol. 105. P. 9—13.
7. Mendelsohn J., Baselga J. The EGF receptors family as targets for cancer therapy // Oncogene. — 2000. — Vol. 19. — P. 6550—6565.
8. Mironov A. F., Kozyrev A. N., Brandis A. Sensitizers of second generation for photodynamic therapy of cancer based on chlorophyll and bacteriochlorophyll derivatives // Proc. SPIE. — 1992. — Vol. 1922. — P. 204—208.
9. Misra B. R., Misra H. P. Vasoactive intestinal peptide, a singler oxygen quencher // J. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 267. — P. 19172—19178.
10. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours // J. Photochem. Photobiol. B. Biol. — 1997. — Vol. 39. — P. 1—18.
11. Pearce Biotechnology. EDC // Instructions. — 2002. — N 5. — <http://www.piercenet.com/files/0475as4.pdf>.
12. Pearce Chemical Company. NHS and sulfo-NHS // Instructions. 1999. — N 7. — <http://www.piercenet.com/files/ACF1-E63.pdf>
13. Rosenkranz A. A., Jans D. A., Sobolev A. S. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency // Immunol. Cell. Biol. — 2000. — Vol. 78. — P. 452—464.
14. Rosenkranz A. A., Lunin V. G., Gulak P. V. et al. Recombinant modular transporters for cell-specific nuclear delivery of locally acting enhance photosensitizer activity // FASEB J. — 2003. — Vol. 17. — P. 1121—1123.
15. Sobolev A. S., Jans D. A., Rosenkranz A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers // Prog. Biophys. Mol. Biol. — 2000. — Vol. 73. — P. 51—90.
16. Wikberg J. E., Muceniece R., Mandrika I. et al. New aspects on the melanocortins and their receptors // Pharmacol. Res. — 2000. — Vol. 42. — P. 393—420.

Поступила 13.01.05