

ОБМЕН НА ЛЕКАРСТВЕНИ СРЕДСТВА МЕЖДУ ЕРИТРОЦИТНИ МЕМБРАНИ И ПРОТЕИНОВИ НАНОЧАСТИЦИ

Биляна Тачева, Бояна Първанова, Иван Т. Иванов, Радостина Георгиева, Мирослав Карабалиев

Катедра "Медицинска физика, биофизика, рентгенология и радиология", Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора 6000, България

Резюме:

Влиянието на хлорпромазин и тиоридазин върху еритроцитни мембрани е изследвано чрез метода хемолиза в хипотонична среда. И двете вещества имат двуфазов ефект на въздействие върху мембраните - стабилизиране при ниски концентрации и дестабилизиране след достигане до съответна критична концентрация. Критичната концентрация на тиоридазина е по-малка от тази на хлорпромазина, което е в съответствие със съотношението на коефициентите им на разпределение. При наличие на наночастици от говежди серумен албумин (BSA) в разтвора се наблюдава нарастване в критичните концентрации, дължащо се на инкорпориране на част от лекарствените вещества в наночастиците.

Ключови думи: *фенотиазинови лекарствени вещества, наночастици, хемолиза*

Въведение:

Взаимодействията на лекарства и биологично активни вещества с биомембраните са сложни явления от химична или физикохимична гледна точка. Те могат да представляват крайния етап, в случай че биомембраната е мястото на действие на лекарството. В много случаи, обаче, взаимодействието лекарство-мембрана представлява само предварителна стъпка за биологичната (или токсична) активност, тъй като мембраната може да повлияе на степента на проникване и разпределяне на биомолекулата в цитоплазмата, преди достигане на определена целева (таргетна) клетъчна органела или система. С други думи, свързването, както и разпределянето на лекарствените вещества в клетъчните мембрани, заслужават да бъдат проучвани и точно характеризирани, както за известни, така и за нови биологично активни съединения.

Най-широко използваната количествена характеристика на лекарствено-мембранното взаимодействие е коефициентът на разпределение (partition coefficient), който е отношението на концентрациите на лекарственото вещество в мембраната и в оръжаващата я водната среда.

Фенотиазините са група лекарствени вещества, класифицирани като антипсихотици и невролептици. Използвани са за лечение на шизофрения и психоза. Най-добре изследваното от тази група лекарства е хлорпромазина (CPZ). Освен че блокира специфични клетъчни рецептори, част от разнообразните ефекти на CPZ могат да бъдат приписани и на амфифилната природа на лекарството. Трицикленната група на CPZ е хидрофобна и с относителна лекота може да взаимодейства с въглеродородната фаза на липидния бислой на мембраната, докато пропиламиновата въглеродородна опашката на лекарството е хидрофилна, съответно взаимодейства добре с полярните глави на мембранни липиди (Kuroda and Kitamura 1984). Освен това, при физиологично рН, пропиламиновата веригата на лекарството се зарежда положително, което улеснява взаимодействието и с хидрофилната част на липидния бислой. Тъй като вътрешната страна на мембраната на човешките червени кръвни клетки (RBC) съдържа почти всички анионни фосфолипиди (Bretscher 1972), електростатични сили на привличане може да улавят CPZ във вътрешната страна на

мембрана (Sheetz and Singer 1974). Теоретично, достъпността на CPZ на интрацелуларната повърхност на клетъчната мембрана ще позволи на лекарството да упражни фармакологични ефекти чрез директно въздействие върху вътреклетъчни процеси, като сигнална трансдукция или вътреклетъчен транспорт. В нормални дискоцитни RBC, преференциално натрупване на CPZ разширява вътрешната страна на мембраната принуждавайки я да се деформира навътре, за да се произведе стоматоцитна форма (Sheetz and Singer 1974). Други изследвания показват, че CPZ също взаимодейства с протеиновите компоненти в мембраната (Elferink 1977), и по конкретно със спектрина (Minetti and Di Stasi 1987)(Enomoto et al. 2001), което може да обясни стабилизиращия ефект на CPZ върху механичните свойства на еритроцитните мембрани.

Тиоридазин (TDZ) е другото лекарствено вещество, което е избрано за проучванията в настоящата работа. С него има провеждани по-малко изследвания във връзка с взаимодействията му с мембраните. Ефектите му са сходни с тези на хлорпромазина (Hendrich et al. 2002), като се проявяват при по-ниски концентрации, което е свързано с по-голямата му хидрофобност и по-малката СМС (критична концентрация на мицелообразуване) (Binford and Palm 1994).

Сред новите насоки в търсенето на подходящи системи за доставяне на лекарства е получаването и изследването на албуминови наночастици като носители на лекарствени вещества. Тези частици обединяват отличната биосъвместимост на албумина и преимуществата на големия капацитет на включване на вещества в наночастиците. Известно е, че албуминът по принцип е преносител на хидрофобни молекули в плазмата, както и че се натрупва в туморите (Desai 2015). Така, технологията за развитие на албуминови системи за доставяне на лекарства, се основава на уникалните свързващи и транспортни характеристики на албумина. Очевидната цел е подобро проникване в туморните тъкани и натрупване на хидрофобното лекарство, като се спестява необходимостта от наличието на токсичните разтворители или сърфактанти, съпътстващи обикновено слабо разтворимите във вода лекарства.

Основна цел на настоящата работа е да се изследва обмена на лекарствени вещества между протеинови наночастици и еритроцитни мембрани, като се проучат ефектите на тези взаимодействия върху структурата и свойствата на биомембраните.

Материали и методи:

Лекарствени вещества:

В изследванията са използвани разтвори на фенотиазиновите лекарствени вещества хлорпромазин и тиоридазин. 2-хлоро-10- [3- (диметиламинопропил)] фенотиазин хидрохлорид (Chlorpromazine) и (±) -2-метилтио-10- [2- (1-метил-2-пиперидил) етил] - фенотиазин хидрохлорид (Thioridazine hydrochloride) са търговски продукти на фирмата Sigma-Aldrich, USA. Приготвяни са разтвори от 10 mM и 100 mM фенотиазин (хлорпромазин или тиоридазин) в 0.1 M KCl или във физиологичен разтвор (150 mM) NaCl. Малки обеми от тези разтвори бяха добявани към експерименталните системи за посигане на желаните концентрации.

Наночастици:

Говеждият серумен албумин (BSA) (Sigma-Aldrich, USA), е глобулин, съдържащ 607 аминокиселинни остатъци, с молекулно тегло от 66.446 kDa и изоелектрична точка 4.7. Получаването на BSA-наночастиците е по метода, описан по-рано в (Xie et al. 2012). Наночастиците BSA (НЧ) се получават чрез техниката на десолватация. 200 mg BSA се разтварят в 2,0 мл дейонизирана вода и рН на разтвора се регулира до 7.4 с 0.01 M NaOH.

При постоянно разбъркване с 500 оборота в минута, към първоначалния разтвор на албумин с помощта на перисталтична помпа се добавят 8,0 ml етанол със скорост 0,5 ml/min. Вследствие на това албуминовите молекули агрегират до мултимолекулни комплекси с размери с размери в нанодиапазона. След това се прибавя постепенно 0.2 ml 8% разтвор на глутаралдехид с цел омрежаване на образуваните BSA частиците по време на десолватиране. След 24 часа инкубация на 20 °C при постоянно разбъркване, НЧ-те се пречистват чрез многократно центрофугиране при 10 000 оборота в минута и редиспергират в бидестилирана и дейонизирана вода под действието на ултразвук. BSA-НЧ-те могат да се лиофилизират и да се съхраняват при 4 °C преди употреба.

Биологични мембрани:

За проучване на взаимодействието на лекарствените вещества и наночастиците с биологични мембрани са използвани човешки еритроцити. Венозна цитратна кръв е вземана от клинични лаборатории в деня на провежданите изследвания, с информираното съгласие от пациенти с нормална кръвна картина, и предавана на изследователския екип без данните на конкретните пациенти. Кръвта е центрофугирана при 5000 rpm за 4 min за отделяне на плазмата. Еритроцитите са промивани трикратно с физиологичен разтвор (150 mM NaCl) при десетократно обемно разреждане (1:10 / v:v). От промитите еритроцити е приготвяна изходна клетъчни суспензия с краен хематокрит 20 %.

Осмотична резистентност на еритроцити:

Методът, който използвахме за изследване на взаимодействията на лекарствените вещества с биологични мембрани, е хемолитичен тест на еритроцити в хипотонични условия (или изследване на промени в осмотичната резистентност на еритроцити).

Определен обем от клетъчната суспензия с хематокрит 20 % се поставя в хипотоничен разтвор. Концентрацията на хипотоничния разтвор се избира да бъде такава, при която осмотичното раздуване на еритроцитите да води до лизиране на 50 % от тях. Използва се 1,5 ml разтвор на NaCl (с приблизителна концентрация 66mM, при която се получава 50 % хемолиза на еритроцитите), към който се добавят 75µl от изходната клетъчна суспензия и разтвор на лекарственото вещество (с нарастваща концентрация във всяка епруветка). Подготвените епруветки се инкубират за 30 min на стайна температура, след което се центрофугират за 2 мин. на 5000 rpm.

Отчита се екстинкцията на супернатанта при разреждане супернатант: dH₂O = 1:1. Спектрофотометричното измерване се извършва при λ=555nm. Резултатите се представят, като зависимост на екстинкцията от концентрацията на съответното лекарствено вещество. Апаратурата използвана за измерване осмотичната резистентност на еритроцити е Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena).

Резултати и дискусия

Въздействието на лекарствените вещества върху еритроцитните мембрани се регистрира по предизвиканата промяна на осмотичната резистентност на еритроцитите. Тестът се състои в суспендиране на еритроцитите в хипотонична среда с осмоларитет, предизвикващ хемолиза на 50% от еритроцитите. Когато лекарствените вещества стабилизират мембраната, след поставянето на еритроцитите в хипотоничните условия хемолизата е по-слаба в сравнение с тази на контролните еритроцити. Обратно, когато лекарствените вещества водят до дестабилизиране на мембраната, след поставянето на еритроцитите в хипотонични условия хемолизата се засилва спрямо тази на нетретирани еритроцити. Степента на хемолизата се определя след отстраняване на нехемолизираните

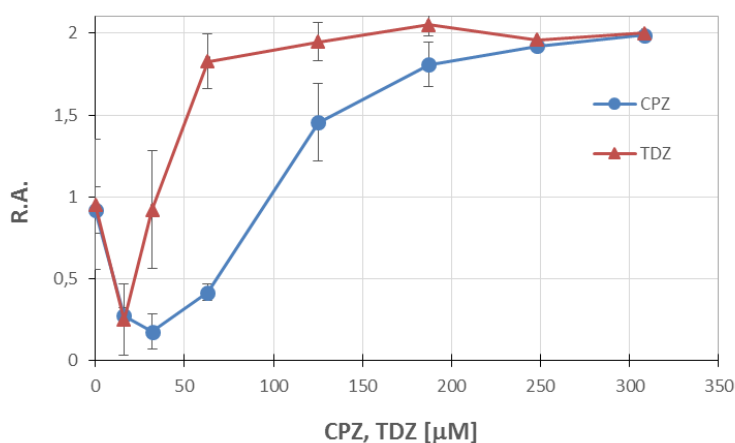
еритроцити и измерване на оптичната адсорбция, дължаща се на отделения в супернатанта хемоглобин.

Количественото характеризирание на лекарственото въздействие се изразява чрез относителната хемолиза R.A. (Malheiros, de Paula, and Meirelles 1998).

$$R.A. = \frac{A_S}{A_{50}}$$

Тук A_S и A_{50} са абсорбциите съответно на пробата с третираните с лекарствените вещества еритроцити и на контролни еритроцити в хипотонични условия за 50 % хемолиза. Изчислената по този начин величина ще приема стойности $0 < R.A. < 1$, когато хемолізата е намалена от въздействието на лекарството, и стойности $1 < R.A. < 2$, когато хемолізата е нарастнала спрямо тази на контролата.

Резултатите за фенотиазините CPZ и TDZ са показани на Фиг. 1.

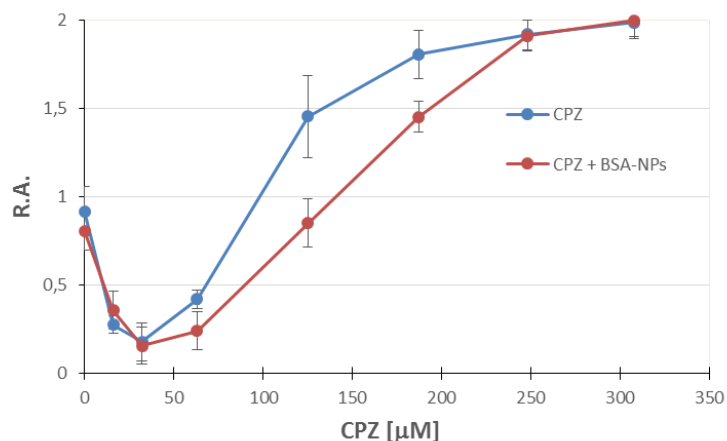


Фиг. 1. Влияние на CPZ и TDZ върху хемолізата на еритроцити в хипотонични условия. Хематокрит 1%, среда 66 mM NaCl фосфатен буфер, pH 7.4. Инкубационно време 30 мин. Резултатите са усреднени от три измервания за всяка концентрация на съответното лекарство вещество.

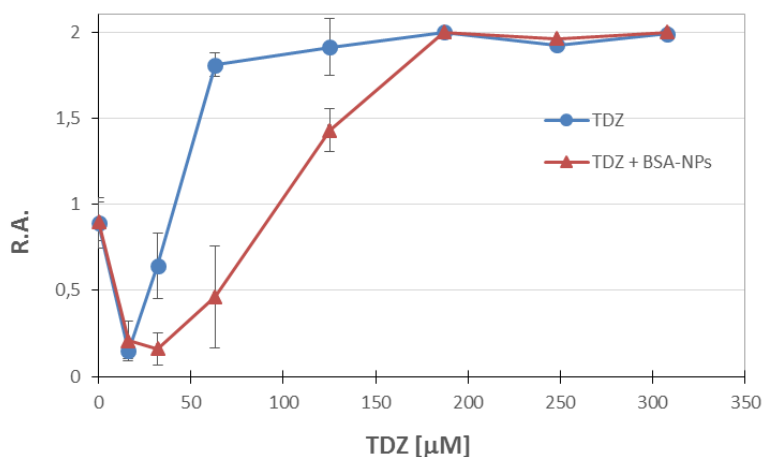
И двете фенотиазинови производни показват двуфазово въздействие върху мембраните. При ниски концентрации както CPZ, така и TDZ, стабилизират еритроцитите мембрани и увеличават осмотичната резистентост срещу хипотоничното лизиране. И двете криви на Фиг.1 показват намалена хемолиза при началните ниски концентрации. С нарастването на концентрацията се достига до определени концентрации на CPZ и TDZ, при които ефектът се променя и еритроцитите мембрани се дестабилизират – кривите тръгват нагоре към нарастване на относителната хемолиза R.A. В крайна сметка, при достигане до определени концентрации на CPZ и TDZ, еритроцитите лизират напълно ($R.A.=2$, което съответства на 100 % хемолиза). Максималният протектиращ ефект е в областта на 16 µM за TDZ и 32 µM за CPZ, което показва двойно по-силен ефект на TDZ. Сравнявайки стойностите, при които относителната хемолиза става отново единица, виждаме че този ефект се проявява при 35 µM за TDZ и при 100 µM за CPZ (с уговорката, че тук неопределеността е по-голяма, както се вижда от маркерите за грешките на фигурата). Очевидно ефектите се проявяват около 2-3 пъти по силно за TDZ, сравнен с CPZ (т.е. при 2-3 пъти по-ниски концентрации). Интересно е да се отбележи, че този резултат корелира с отношението на коефициентите на разпределение на тези две лекарствени вещества в липозоми $K_p^{TDZ} / K_p^{CPZ} = 2.22$, изчислено по данните за K_p^{TDZ} и K_p^{CPZ} , докладвани в (Binford and Palm 1994).

В предишни работи беше показано, че BSA-наночастиците могат да инкорпорират

ефективно лекарствени вещества и в частност CPZ и TDZ (Tacheva et al. 2014). В настоящата работа разглеждаме по какъв начин BSA-наночастиците, натоварени с лекарствени вещества, въздействат върху мембраните. За тази цел е изследвано въздействието на BSA-наночастиците върху осмотичната резистентност на еритроцити. Наред с дискутираните по-горе изследвания за въздействието на CPZ и TDZ върху еритроцитните мембрани бяха проведени и паралелни измервания на въздействията на същите количества лекарствени вещества, но при наличие и на BSA-наночастици в разтвора. Резултатите за двете вещества CPZ и TDZ са представени съответно на Фиг.2. и Фиг.3 .



Фиг. 2. Влияние на CPZ и BSA-CPZ-наночастици върху хемолизата на еритроцити в хипотонични условия. Хематокрит = 1%, в хипотонична среда (66 mM NaCl) фосфатен буфер, pH=7.4. Инкубационно време 30 мин. Резултатите са усреднени от три измервания за всяка концентрация.



Фиг. 3. Влияние на TDZ и BSA-TDZ-наночастици върху хемолизата на еритроцити в хипотонични условия. Хематокрит = 1% в хипотонична среда 66 mM NaCl фосфатен буфер, pH 7.4. Инкубационно време 30 мин. Резултатите са усреднени от три измервания за всяка концентрация.

И за двете изследвани вещества, CPZ и TDZ, ефектите са качествено същите, както при

наличие само на лекарствените вещества в еритроцитната суспензия, така и когато в суспензията наред с лекарствата присъстват и BSA-наночастици. И за двете вещества CPZ и TDZ обаче, има изместване на ефектите на лекарствените вещества към по-големи техни концентрации, когато в суспензията присъстват BSA-наночастици. Имайки предвид, че BSA-наночастиците могат да инкорпорират ефективно лекарствени вещества CPZ и TDZ (Tacheva et al. 2014), можем да дадем следното обяснение за представените на Фиг.2 и Фиг.3 резултати:

BSA-наночастиците могат да пренасят лекарствените вещества до мембраните на еритроцитите, а лекарствените вещества да се разпределят между мембраните и BSA-наночастиците. Тъй като лекарствата са амфифилни те имат склоност да се разтварят както в частиците, така и в мембраната. По този начин те се разпределят между частиците и мембраните на еритроцитите в разтвора. Съответно, ефективната лекарствена концентрация, действаща на еритроцитите, е намалена поради факта, че част от лекарственото вещество остава „разтворено“ в BSA-наночастиците, като тази ефективна концентрация би трябвало да зависи от коефициентите на разпределение между съответните фази. Резултатите на Фиг.2 и Фиг.3 са в съгласие с данните за инкорпориращата способност на BSA-наночастиците за CPZ и TDZ (Tacheva et al. 2014), според които TDZ се инкорпорира от BSA-наночастиците 1.75 пъти повече в сравнение с CPZ. От фиг.2 може да се установи, че концентрацията на CPZ, при която е ефектът се обръща от стабилизиращ към дестабилизиращ (т.е. концентрацията, при която относителната хемолиза е отново единица, $R.A.=1$), нараства от 95 μM на 140 μM , което е нарастване 1,47 пъти на необходимата концентрация. По същия начин от Фиг.3 се установява, че за TDZ на необходимата концентрация за $R.A.=1$ нараства от 35 μM на 95 μM , или 2.71 пъти. От тези данни се вижда, че BSA-наночастиците имат 1.84 пъти по-силен ефект върху TDZ, отколкото върху CPZ (получено от отношението 2.71/1.47). Стойността 1.84, получена тук, е много близка до стойността 1.75 за отношението на степените на инкорпориране на TDZ и CPZ от BSA-наночастиците, получена посредством електрохимичния метод циклична волтаперометрия (Tacheva et al. 2014). Получените по два независими метода близки стойности 1.84 и 1.75 допълнително потвърждават направения извод, че влиянието на BSA-наночастиците върху концентрациите на TDZ и CPZ, необходими за хипотонична хемолиза, се дължи на инкорпорирането в BSA-наночастиците на част от наличните количества TDZ и CPZ, т.е. на разпределение на молекулите TDZ и CPZ между мембраните на еритроцитите и BSA-наночастиците.

Заклучение

Наличието на наночастици от говежди серумен албумин (BSA) в разтвор със суспендирани еритроцити води до нарастване критичните концентрации на въздействие на лекарствените вещества върху еритроцитите. Това нарастване се дължи на инкорпориране на част от лекарствените вещества в наночастиците, и оттам на намаляване на свободната концентрация на веществата в разтвора. Използването на наночастици от BSA като лекарствен преносител би позволило прилагането венозно на по-високи дози от лекарствените вещества без риск от хемолиза на еритроцитите

Използваният метод позволява и относително сравнение на коефициентите на разпределение на вещества между еритроцитните мембрани, електролитния разтвор и наночастиците.

Благодарности

Изследванията по темата са финансирани от Фонд „Научни изследвания“ – проект №

ДНТС/Китай/01/11/ от 04.12.2014.

Литература

- Binford, J S, and W H Palm. 1994. "Absorption of Surfactants by Membranes: Erythrocytes versus Synthetic Vesicles." *Biophysical Journal* 66 (6): 2024–28. doi:10.1016/S0006-3495(94)80995-6.
- Bretscher, Mark S. 1972. "Asymmetrical Lipid Bilayer Structure for Biological Membranes." *Nature* 236 (61). Nature Publishing Group: 11–12. doi:10.1038/10.1038/newbio236011a0.
- Desai, Neil. 2015. "Nanoparticle Albumin-Bound Anticancer Agents." In *Non-Biological Complex Drugs*, edited by Daan J.A. Crommelin and Jon S. B. de Vlieger, 20:335–54. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-16241-6.
- Elferink, Jan G.R. 1977. "Fluorescence Studies of Membrane Interactions of Chlorpromazine and Chlorimipramine." *Biochemical Pharmacology* 26 (6): 511–15. doi:10.1016/0006-2952(77)90326-4.
- Enomoto, A., Y. Takakuwa, S. Manno, A. Tanaka, and N. Mohandas. 2001. "Regulation of Erythrocyte Ghost Membrane Mechanical Stability by Chlorpromazine." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1512 (2): 285–90. doi:10.1016/S0005-2736(01)00329-7.
- Hendrich, Andrzej B, Katarzyna Lichacz, Anna Burek, and Krystyna Michalak. 2002. "Thioridazine Induces Erythrocyte Stomatocytosis due to Interactions with Negatively Charged Lipids." *Cellular & Molecular Biology Letters* 7 (4): 1081–86.
- Kuroda, Yoshihiro, and Keisuke Kitamura. 1984. "Intra- and Intermolecular Proton-Proton Nuclear Overhauser Effect Studies on the Interactions of Chlorpromazine with Lecithin Vesicles." *Journal of the American Chemical Society* 106 (1). American Chemical Society: 1–6. doi:10.1021/ja00313a001.
- Malheiros, S V, E de Paula, and N C Meirelles. 1998. "Contribution of Trifluoperazine/lipid Ratio and Drug Ionization to Hemolysis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1373 (2): 332–40.
- Minetti, Maurizio, and Anna Maria Michela Di Stasi. 1987. "Involvement of Erythrocyte Skeletal Proteins in the Modulation of Membrane Fluidity by Phenothiazines." *Biochemistry* 26 (25). American Chemical Society: 8133–37. doi:10.1021/bi00399a017.
- Sheetz, M. P., and S. J. Singer. 1974. "Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71 (11): 4457–61. doi:10.1073/pnas.71.11.4457.
- Tacheva, B, A Zheleva, R Georgieva, W Tong, Ch Gao, and M Karabaliev. 2014. "Interactions of BSA-Nanoparticles with Some Electroactive Drugs." *Trakia Journal of Sciences* 12 (Suppl. 1): 84–88.
- Xie, Lili, Weijun Tong, Dahai Yu, Jianquan Xu, Jun Li, and Changyou Gao. 2012. "Bovine Serum Albumin Nanoparticles Modified with Multilayers and Aptamers for pH-Responsive and Targeted Anti-Cancer Drug Delivery." *Journal of Materials Chemistry* 22 (13). The Royal Society of Chemistry: 6053. doi:10.1039/c2jm16831f.