

С.Л. Федорук¹, Т.В. Трухачева¹, К.А. Фроленков¹, В.П. Хейдоров²

**ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМО- И ФОТОДЕСТРУКЦИИ ХЛОРИНА Е6 И
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ФОТОЛОН**

¹РУП «Белмедпрепараты» (Минск, Республика Беларусь)

²Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Проведена работа по изучению процессов фотодеструкции лекарственной фармацевтической субстанции хлорина е6 как в лекарственной форме, так и в свободном виде. Показано, что предложенная хроматографическая методика позволяет не только разделить основные продукты деструкции, но также и идентифицировать их. Установлено, что под воздействием излучения УФ-диапазона процессы деструкции протекают активнее в лекарственном средстве Фотолон, чем в фармацевтической субстанции хлорина е6. Изучено поведение хлорина е6 и лекарственного средства Фотолон под воздействием лазерного излучения красного оптического диапа-

зона. Исследованы процессы деструкции и идентифицированы основные продукты деструкции, которые могут предположительно образовываться в клетках при проведении фотодинамической терапии. Таким образом, результаты проведенных исследований выявляют основные механизмы деструкции хлорина еб как в свободном виде, так и в составе лекарственной формы, что в будущем может быть использовано для определения условий хранения лекарственного средства, а также для разработки новых фотосенсибилизаторов и их лекарственных форм.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, деструкция, хлорин еб.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время фотодинамическая терапия уже зарекомендовала себя как один из перспективных методов лечения онкологических заболеваний. В основе фотодинамической терапии лежит усиление цитотоксичности веществ, известных как фотосенсибилизаторы, под действием излучения оптического диапазона длин волн. К числу перспективных фотосенсибилизаторов относят хлорин еб [1-2]. На основе хлорина еб специалистами РУП «Белмедпрепараты» (Республика Беларусь) разработано лекарственное средство Фотолон, которое представляет собой молекулярный комплекс хлорина еб и поливинилпирролидона (ПВП) [3-7]. При производстве субстанции хлорина еб образуется незначительное количество различных примесей порфириновой природы. Хлорин и его производные неустойчивы при воздействии излучения различных длин волн, а также даже при незначительном повышении температуры и при воздействии кислорода воздуха. Фотодинамическая терапия с помощью лекарственного средства Фотолон проводится при длинах волн 650-670 нм. До настоящего времени изучали только механизм образования синглетного кислорода и возможности фотосенсибилизирующей способности хлорина Еб и его производных. Однако об особенностях образования родственных соединений при различных видах излучений, а также при воздействии температуры известно немного [8-10]. По этой причине большой интерес представляет изучение поведения субстанции хлорина еб и лекарственного средства Фотолон под воздействием излучений ультрафиолетового и красного, а также термического диапазонов длин волн. Большинство примесей хлорина еб имеют максимумы поглощения при 402 ± 2 нм и 662 ± 2 нм. Поэтому спектрофотометрический метод анализа позволяет оценить только сумму примесей, но не со-

держание и изменение концентрации каждой из них. Исходя из этого для исследований процессов деструкции использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на основе оптимизированной методики, предложенной ранее [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В качестве объекта исследования использовали субстанцию хлорина еб и лекарственное средство Фотолон производства РУП «Белмедпрепараты» (Республика Беларусь). Фотолон представляет собой молекулярный комплекс натриевой соли хлорина еб и медицинского поливинилпирролидона с молекулярной массой около 10000 Да в массовом соотношении 1:1. Фотолон производится в виде лиофилизированного порошка для инъекций дозировкой 25, 50 и 100 мг. В работе использована серия лекарственного средства с дозировкой 100 мг производства 2008 г. В качестве стандартного образца использован хлорин еб фирмы Frontier Scientific (США).

Метанол (Merck, Германия), ацетонитрил (Merck, Германия) и трифторуксусная кислота (AppliChem, Германия) были хроматографической степени чистоты.

Подготовка анализируемых образцов. С целью сравнительного исследования стандартного образца хлорина еб (который не растворяется в воде или изотоническом растворе) и лекарственного средства Фотолон образцы растворяли в метаноле с конечной концентрацией 50 мкг/мл и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. При изучении влияния излучений красного диапазона исследуемые образцы лекарственного средства растворяли в изотоническом растворе, затем фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Оборудование. В работе использовали жидкостный хроматограф фирмы Waters (США), включающий насос Waters600 и

фотодиодную матрицу Waters2996. Длина волны детектирования – 407 нм. Для получения более полной информации регистрировали спектр в диапазоне от 350 до 700 нм.

Для разделения использовали хроматографическую колонку XTerra RP-18 150x4.0 mm с размером частиц 3 мкм

(Waters, США). Градиентное элюирование (таблица 1) проводили при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ элюентами, включающими 0,1% раствор трифторуксусной кислоты - подвижная фаза А (ПФ А) и ацетонитрил - подвижная фаза В (ПФ В). Объем петли ручного инжектора 20 мкл [11].

Таблица 1 – Условия градиентного элюирования анализируемых соединений

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0-20	45->100	55->0
20-23	100	0
23-24	100->45	0->55
24-28	45	55

Фотодеструкцию стандартного образца хлорина еб и лекарственного средства Фотолон проводили при длине волны 254 нм и под воздействием красного света при длине волны 660 нм.

Для изучения фотодеструкции при 254 нм использовали универсальный прибор для УФ-Вид. 254/366 облучения (Desaga, Германия).

Для изучения фотодеструкции под воздействием красного света использовали полупроводниковый лазер PLM-660-0.5 с мощностью 130 мВт. Сфокусированное лазерное пятно имело диаметр 1 см.

Расчет содержания примесей производили методом внутренней нормализации. Идентификацию сопутствующих примесей проводили путем сравнения времен удерживания пиков на хроматограммах испытуемых растворов с временами удерживания пиков соответствующих примесей на хроматограммах растворов сравнения, а также сравнением спектров поглощения веществ, экстрагированных из пиков на соответствующих хроматограммах. Анализировали растворы сравнения следующих примесей: примесь 3 – хлорин е4; примесь 4 - 15¹-гидроксифилохлорин; примесь 6 – 15¹-гидроксиметилродохлорин δ-лактон; примесь 7 – родохлорин-15-оксиметил δ-лактон); примесь 9 – 15¹-гидроксиметилродопорфирин δ-лактон.

При фотодеструкции под воздействием УФ-излучения время воздействия составляло 5, 10, 20, 40 и 60 минут, под воздействием красного света – 5, 10, 15 и 20 минут.

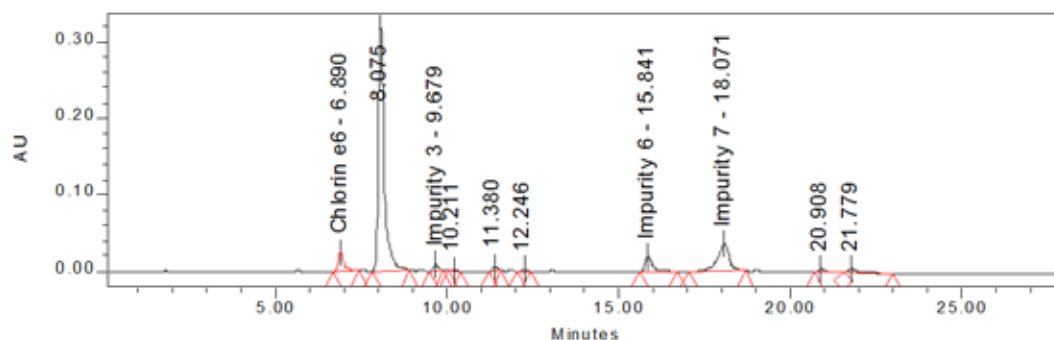
Сравнительное изучение термического воздействия на субстанцию хлорин еб и лекарственное средство Фотолон проводили

в стеклянных флаконах фирмы Stolzle-Oberglas GmbH (Австрия) (II гидролитического класса стекла) на водяной бане при температуре 80°C. Концентрация хлорина еб в исследуемых растворах также составляла 50 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализов были получены хроматограммы (рис. 1-2) и спектры, при интегрировании которых была получена информация о росте идентифицированных и неидентифицированных примесей.

Отмечены заметные изменения устойчивости хлорина еб в стрессовых условиях. Выявлено, что стабильность в данных условиях у лекарственного средства Фотолон ниже, чем у субстанции хлорина еб. При анализе приведенных в таблицах данных о содержании различных примесей в образцах отмечены следующие закономерности (таблицы 2 и 3). Во-первых, как для субстанции хлорин еб, так и для лекарственного средства Фотолон наблюдается рост содержания примеси с временем удерживания 8,3 мин, которую в настоящее время еще не удалось идентифицировать. Для лекарственного средства Фотолон рост содержания данной примеси прекращается после 40 минут воздействия УФ-излучения. После 40 минут воздействия в растворе лекарственного средства Фотолон наблюдается также образование примеси 3, которая, как правило, образуется при термическом воздействии. Также было отмечено образование примесей 6 и 7 как в растворе субстанции хлорина еб, так и в растворе лекарственного средства Фотолон.



По оси абсцисс – время t , мин, по оси ординат – отклик прибора в относительных единицах интегрирования, который прямо пропорционален концентрации хлорина е6 и родственных соединений в анализируемом растворе

Рисунок 1 - Хроматограмма раствора лекарственного средства Фотолон после стрессового воздействия УФ-излучения на протяжении 60 минут.

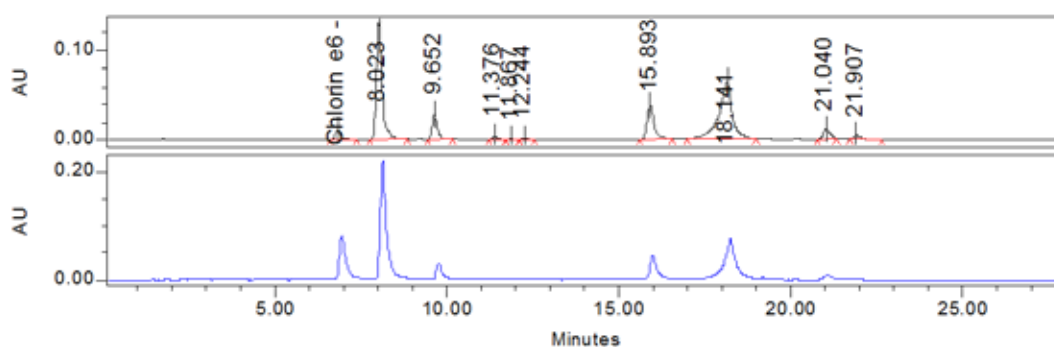


Рисунок 2 – Сравнение хроматограмм лекарственного средства Фотолон (верхняя) и субстанции хлорина е6 (нижняя) после воздействия УФ-излучения на протяжении 120 минут

Таблица 2 – Изменение содержания примесей в ходе деструкции лекарственного средства Фотолон при воздействии УФ-излучения с длиной волны 254 нм.

T_R – время удерживания примеси

Примесь	Содержание примесей, %					
	Продолжительность облучения, мин					
	0	10	20	40	60	120
Неидентифицированная ($T_R=4,4$ мин)	0,25	0	0	0	0	0
Неидентифицированная ($T_R=8,3$ мин)	0,34	12,43	36,08	78,03	67,19	33,35
Примесь 4 ($T_R=9,3$ мин)	0,42	0,36	0	0	0	0
Примесь 3 ($T_R=9,7$ мин)	0	0	0	0,68	1,64	6,67
Неидентифицированная ($T_R=10,0$ мин)	1,06	1,54	1,2	0,31	0,34	0
Неидентифицированная ($T_R=11,4$ мин)	0,58	0,26	0,78	1,42	1,08	1,16
Неидентифицированная ($T_R=11,9$ мин)	0	0	0	0,15	0	0,26
Неидентифицированная ($T_R=12,3$ мин)	0	0,46	0,89	0,42	0,42	0,51
Неидентифицированная ($T_R=13,1$ мин)	0,2	0	0	0,18	0	0
Примесь 6 ($T_R=15,9$ мин)	0,54	0,54	0,87	2,33	5,39	12,49
Примесь 7 ($T_R=18,2$ мин)	0,59	0,96	1,85	7,11	15,67	37,57
Примесь 9 ($T_R=19,1$ мин)	0,21	0	0	0	0	0
Неидентифицированная ($T_R=21,1$ мин)	0,32	0,24	0,3	0,43	1,37	3,3
Неидентифицированная ($T_R=21,9$ мин)	0,6	0,63	0,92	1,13	1,61	1,61

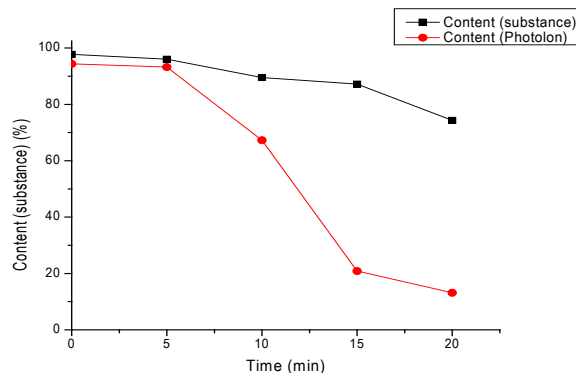
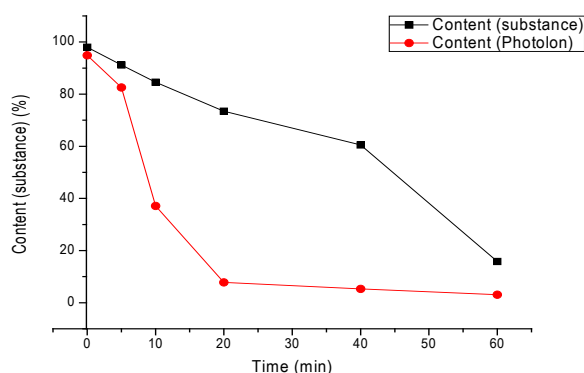
Таблица 3 – Результаты исследования деструкции субстанции хлорина еб при воздействии УФ-излучения с длиной волны 254 нм

Примесь	Содержание примесей, %					
	Продолжительность облучения, мин					
	0	10	20	40	60	120
Неидентифицированная ($T_R=3,3$ мин)	0	0,08	0	0	0	0
Неидентифицированная ($T_R=8,3$ мин)	0,27	6,22	12,48	22,75	29,62	40,83
Примесь 4 ($T_R=9,3$ мин)	0,15	0,18	0,08	0,11	0	0
Неидентифицированная ($T_R=10,0$ мин)	0	0	0	0,1	0,42	4,72
Неидентифицированная ($T_R=12,3$ мин)	0,34	0,41	0,33	0,47	0,38	0,55
Неидентифицированная ($T_R=13,9$ мин)	0	0	0	0	0	0,15
Примесь 6 ($T_R=15,9$ мин)	0,19	0,44	0,55	0,82	2	10,11
Примесь 7 ($T_R=18,2$ мин)	0,96	1,44	1,95	2,24	6,74	26,12
Примесь 9 ($T_R=19,1$ мин)	0,07	0	0	0	0	0
Неидентифицированная ($T_R=21,1$ мин)	0	0	0	0	0,3	1,78

Анализируя зависимости содержания хлорина еб от продолжительности воздействия УФ-излучения (рис. 3), можно сделать следующие выводы. Процесс деструкции в лекарственном средстве Фотолон на начальном этапе протекает значительно быстрее, однако по истечении часа величины относительного содержания хлорина еб остаются примерно на одном уровне.

При изучении фотодеструкции под воздействием красного света было обнаружено, что в целом субстанция хлорина еб является более устойчивой к действию красного света, чем лекарственное средство Фотолон (рис. 4). На начальных этапах растет содержание примеси с относительным временем

удерживания 1,2 по отношению к времени удерживания хлорина еб как в случае стандартного образца, так и в случае лекарственного средства Фотолон, но к 20-ой минуте содержание этой примеси стремительно уменьшается (таблица 4). Был замечен рост примесей 6 и 7 в лекарственном средстве Фотолон (после 15-ой минуты содержание примеси 7 остается постоянным). Также был отмечен рост неидентифицированной примеси с временем удерживания 22,9 минуты. В субстанции хлорина еб отмечен рост содержания только примеси 7. Увеличения содержания примеси 3 не происходит. Исходя из вышеуказанных наблюдений, можно сделать некоторые выводы. Лучшая



«Content (substance)» – относительное содержание субстанции хлорина еб;
 «Content (Photolon)» – относительное содержание лекарственного средства Фотолон.
 Рисунок 3 – Зависимость относительного содержания хлорина еб (%) в субстанции хлорина еб и в лекарственном средстве Фотолон от времени воздействия УФ-излучения

Рисунок 4 – Зависимость содержания хлорина еб в стандартном образце хлорина еб и в лекарственном средстве Фотолон от времени при воздействии красного света мощностью 130 мВт

Таблица 4 – Результаты исследования деструкции лекарственного средства Фотолон при воздействии красного света мощностью 130 мВт

Примесь	Содержание примесей, %				
	Продолжительность облучения, мин				
	0	5	10	15	20
Неидентифицированная ($T_R=5,1$ мин)	0,23	0,25	0,17	0	0
Неидентифицированная ($T_R=9,1$ мин)	0	0,57	15,02	16,1	4,18
Неидентифицированная ($T_R=10,0$ мин)	0,47	0,4	0,5	0,41	0
Примесь 4 ($T_R=10,5$ мин)	1,95	0,85	0,48	1,26	2,45
Неидентифицированная ($T_R=10,9$ мин)	0	0	1,96	0,34	0
Неидентифицированная ($T_R=12,4$ мин)	0	0	0,3	0,44	0,52
Неидентифицированная ($T_R=12,6$ мин)	0	0	0	0,16	0
Неидентифицированная ($T_R=13,1$ мин)	0,49	0,6	0,65	1,41	1,42
Неидентифицированная ($T_R=13,8$ мин)	0	0,14	0,19	0,4	0
Неидентифицированная ($T_R=15,7$ мин)	0	0	0	0,13	0
Неидентифицированная ($T_R=16,4$ мин)	0,29	0	0	0	0
Примесь 6 ($T_R=16,8$ мин)	0,64	1,13	6	32,91	47,75
Примесь 7 ($T_R=19,1$ мин)	0,62	1,81	6,1	20,01	19,88
Примесь 9 ($T_R=20,1$ мин)	0,12	0	0	0,58	0,36
Неидентифицированная ($T_R=20,8$ мин)	0	0	0	0,36	0,69
Неидентифицированная ($T_R=22,0$ мин)	0,16	0	0,35	2,52	4,78
Неидентифицированная ($T_R=22,8$ мин)	0,64	1,00	0,99	2,08	4,8

эффективность лекарственного средства Фотолон может быть основана не только на лучшей солюбилизирующей способности, но и на совместном действии хлорина еб и некоторых его родственных примесей. Поэтому весьма перспективным является синтез идентифицированных примесей 6 и 7 (15¹-гидроксиметилродохлорин δ -лактон и родохлорин-15-оксиметил δ -лактон) в достаточном объёме с последующими испытаниями на эффективность фотодинамической терапии. Также целесообразно провести работу по идентификации примесей с относительными временами удерживания 1,2 и 3,1 по отношению ко времени удерживания хлорина еб с использованием метода хромато-масс-спектрометрии.

При исследовании термической деструкции замечены следующие изменения (рис. 5). В лекарственном средстве Фотолон: наблюдается уменьшение содержания хлорина еб на 5,21%; а в субстанции хлорина еб – на 4,74%. Очевидно, что стабильность хлорина еб в лекарственном средстве Фотолон сопоставима со стабильностью субстанции.

При изучении термостабильности субстанции хлорин еб отмечен рост содержа-

ния примеси 3 (хлорина е4) с 0 до 1,48%. Это подтверждает образование данной примеси через реакцию декарбоксилирования при повышении температуры согласно схеме (рис. 6), предложенной ранее [11].

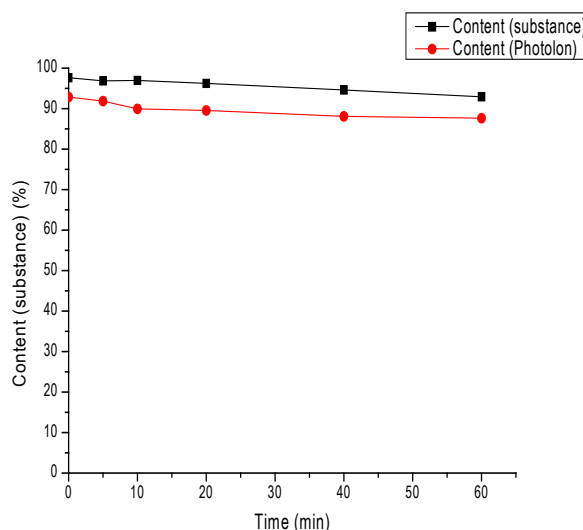


Рисунок 5 – Зависимость содержания хлорина еб в лекарственном средстве Фотолон и в субстанции хлорина еб от времени при стрессовом воздействии температуры 80°C

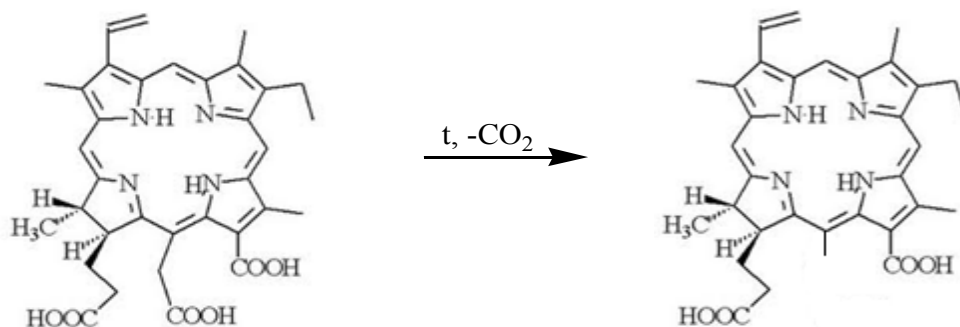


Рисунок 6 – Схема реакции образования хлорина е4 из хлорина е6 при термическом воздействии

В целом в результате исследований подтверждено ускорение процессов деструкции хлорина е6 при увеличении температуры до 80°C.

Признательность. Коллектив авторов выражает благодарность физическому факультету БГУ и лично Зориным Владимиру Петровичу и Татьяне Евгеньевне за любезно предоставленный полупроводниковый лазер ИЛМ-660-0.5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При воздействии излучения света красного и УФ-диапазонов фотодеструкция хлорина е6 в растворе лекарственного средства Фотолон протекает быстрее, чем в растворе чистого хлорина е6. Это может свидетельствовать о механизме действия данной фармацевтической субстанции в раковых клетках при проведении фотодинамической терапии.

2. Идентифицирована часть примесей (15^l-гидроксиметилродохлорин δ-лактон и родохлорин-15-оксиметил δ-лактон), содержание которых при воздействии красного света существенно возрастает. Это может быть использовано для изучения как терапевтических, так и токсических эффектов при фотодинамической терапии лекарственными средствами на основе хлорина е6.

3. Исследования по изучению термического воздействия показали, что при повышении температуры до 80°C активно происходят процессы деструкции хлорина е6. Установлено увеличение содержания примеси 3, идентифицированной как хлорин е4.

SUMMARY

S.L. Fiedaruk, T.V. Trukhacheva,
K.A. Fralengkou, V.P. Kheidorov
INVESTIGATION OF THERMO-
AND PHOTODESTRUCTION OF
CHLORIN E6 AND MEDICINE PHOTOLON

It was carried out the work for studying of processes of photodestruction of pharmaceutical substance chlorin e6 in dosage form and in free state. It was showed, that chromatographic method lets to separate main products of destruction as well to identify them by the method of external standard and by the comparing of absorption spectrums. The process of destruction of chlorin e6 under UV-irradiation was remarked to be more active in dosage form Photolon, than in free state. The investigation of behaviour of chlorin e6 and dosage form Photolon under red range irradiation has revealed not only the kinetics of destruction, but also main products of destruction, that can be formed hypothetically in cancer cells during photodynamic therapy. The addition of ascorbic acid made for clearing up the mechanism of destruction gives also background for development of new dosage forms with durable action. Thus the results of carried out investigations reveal the main mechanisms of destruction of chlorin e6 not only in free state, but also in the composition of dosage form, that in future can be used for determination of storage conditions of medicine, and also for development of new dosage forms with durable action.

Keywords: photosensitiser, destruction, chlorin e6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ragulin, Y.A. Photodynamic therapy with chlorine photosensitizers on the central lung cancer / Y.A. Ragulin, M.A. Kaplan,

V.N. Medvedev // J. Thoracic Oncology – 2007. – Vol. 2 (8) – P. 622-623

2. Spikes, J.D. New trends in photobiology (Invited review) chlorines as photosensitizers in biology and medicine / J.D. Spikes // J. of Photochemistry and Photobiology, B: Biology.- 1990. – Vol. 6. – P.259-274.

3. Immediate and long-term efficacy and safety of photodynamic therapy with Photolon® (Fotolon®) – a seven-year clinical experience / Y.P. Istomin [et al.] // Proc. Of SPIE. – 2009. – Vol. 7380. – P. 6V1-8.

4. Laptsevich, T.P. Photodynamic therapy of women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia using Photolon® / T.P. Laptsevich, V.N. Chalau, T.V. Trukhachova, P.T. Petrov, Y.P. Istomin // J. Photodiagn. Photodyn. Ther. – 2008 – Vol. 5 (suppl. 1). – P. S5-S6.

5. Fedulov, A.S. Photodynamic therapy of high-grade gliomas with Photolon® (Fotolon®). Results of the open-label randomized clinical trial / A.S. Fedulov, I.I. Sakovich, S.V. Sliakhtsin, T.V. Trukhachova // J. Photodiagn. Photodyn. Ther. – 2008. – Vol. 5 (suppl. 1). – P.7.

6. Jeromin, L. Photodynamic therapy of bladder tumors with new photosensitizer Photolon: pilot study / L. Jeromin, C. Peszynski-Drews, M. Lipinski // Acta Bioopt. Inform. Med. – 2004. – Vol. 10. – P. 10-14.

7. Shlyakhtin, S.V. Application of the method of measurement of fluorescence intensity *in vivo* in biological tissues for phar-

macokinetic studies of different chlorin-based photosensitizers / S.V. Shlyakhtin, T.V. Trukhacheva, G.A. Isakov, Yu.P. Istomin // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2010. - Vol.4 (2). – P. 184-190.

8. Yang, H. Photobleaching of chlorins in homogeneous and heterogeneous media / H. Yang, F. Wang, Zh. Zhang // Dyes and Pigments. – 1999. – Vol. 43. – P. 109-117.

9. Yang, Y.T. Photodynamic inactivation of chlorin e6-loaded CTAB-liposomes against *Candida albicans* / Y.T. Yang [et al.] // Lasers Surg Med. – 2013. – Vol.45(3). – P.175-85.

10. Chekulayeva, L.V. Influence of temperature on the efficiency of photodestruction of Ehrlich ascites carcinoma cells sensitized by hematoporphyrin derivative / L.V. Chekulayeva, I.N. Shevchuk, V.A. Chekulayev // Exp. Oncol. – 2004. – Vol. 26(2). – P.125-39.

11. Isakau, H.A. Isolation and identification of impurities in chlorin e6 / H.A. Isakau, T.V. Trukhacheva, P.T. Petrov // J. of Ph. and Biomed. Analysis. – 2007. – V.45. – P.20-29.

Адрес для корреспонденции:

220007, Республика Беларусь,
г.Минск, ул. Фабрициуса, 30,
РУП «Белмедпрепараты»
тел./факс 8 (017) 380 00 36
e-mail: lab659@yandex.ru
or nfc@belmedpreparaty.com
Федорук С.Л.

Поступила 08.04.2014 г.