

ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ ПУХЛИН ШЛЯХОМ ЗАСТОСУВАННЯ КОЛОЇДНОГО ЗОЛОТА

М.Ф. Гамалія, І.О. Лісняк, І.В. Прокопенко, Є.Д. Шишко, Г.А. Долинський,
А.А. Мамчур, О.В. Усатенко*, О.Б. Щербаков*, В.В. Холін**, А.В. Корунець**

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького
НАН України, лабораторія квантової нанобіології,
03022 Україна, м. Київ, вул. Васильковська, 45,
тел.: (044) 259-0167;

*НДІ нанотехнологічної індустрії, м. Київ;
**ПМВП «Фотоніка Плюс», м. Черкаси

УДК 616-006.04:577.344.3:57.086.83

Синтезовані комплекси гематопорфірину з нанорозмірними частками золота (колоїдним золотом) діаметром 15 нм та 45 нм і охарактеризовані їх спектральні особливості. Методом хемілюмінесценції з використанням фосфоліпідної модельної системи показана підвищена фотооксидативна здатність нанокompatитних фотосенсибілізаторів у порівнянні з вихідним гематопорфірином. В досліджах in vitro на трансформованих лімфоцитах клітинних ліній встановлена суттєво більша фотодинамічна активність нанокompatитів, ніж некомплексаного фотосенсибілізатора, при чому кращі результати отримані з наночастками розміром 45 нм. Експериментальна фотодинамічна терапія мишей з трансплантованою карциномою Льюїс підтвердила високу протипухлинну ефективність дослідженого нанокompatитного фотосенсибілізатора «гематопорфірин – колоїдне золото».

Ключові слова: фотодинамічна терапія пухлин, фотосенсибілізатори, гематопорфірин, колоїдне золото, нанокompatити, експериментальні пухлини.

Вступ

Метод фотодинамічної терапії є єдиним за останні півстоліття принципово новим підходом до лікування злоякісних новоутворень, що увійшов в онкологічну практику і може застосовуватись самостійно. Завдяки таким достоїнствам, як вибірковість ушкодження пухлини, мала травматичність, відсутність серйозних побічних ефектів, він активно запроваджується в передових країнах світу. При всіх достоїнствах фотодинамічна терапія має один суттєвий недолік – слабе проникнення світлового випромінювання в глибину тканини, що обмежує практичне застосування методу ранніми формами раку, пухлинами малого розміру та помірної товщини тощо. Тому ведеться активний пошук шляхів подолання цього недоліку, зокрема, випробування нових фотосенсибілізаторів із підвищеним накопиченням у пухлинній тканині, які б спричиняли ефект навіть при низькому рівні проникаючої світлової енергії.

Одним із шляхів посилення чутливості пухлинної тканини до світлового випромінювання за рахунок підвищеного накопичення в ній фотосенсибілізаторів може бути застосування нанотехнологічних підходів,

зокрема, комплексування фотосенсибілізуючих препаратів з наночастками золота. При цьому гідрофобні порфірини набувають водорозчинності, посилюється їх пухлинотропність, а також підвищується ефективність використання світлового опромінення за рахунок можливості енергопереносу між компонентами комплексу [1, 2]. Отже, такий підхід дає підстави розраховувати на протипухлинний фотодинамічний ефект навіть при низькому рівні проникнення світлової енергії в злоякісні тканини. Крім того, для нанозолота була встановлена судинотропність, причому його приєднання до гепарин-зв'язуючого домену молекули VEGF165 у судинних ендотеліальних клітинах пригнічує їх проліферацію через блокування відповідного сигнального каскаду [3]. Таким чином, враховуючи характерну для пухлин наявність зон активного судинотворення, можна очікувати додаткового підвищення терапевтичної ефективності комплексу «гематопорфірин – колоїдне золото», оскільки його дія буде спрямована одразу на дві різні ланки пухлинного процесу: безпосередньо на злоякісні клітини і на судини, що живлять пухлину.

Важливим аспектом застосування нанокompatитних матеріалів є залежність їх властивостей від кількості розташованих на поверхні кластеру атомів, що суттєво відбивається і на біологічній активності препаратів, зроблених на основі наночастинок [4, 5, 6]. Щодо препаратів колоїдного золота, то велике значення мають також їх унікальні оптичні характеристики, які визначаються спроможністю при взаємодії з когерентним світлом індукувати резонансні коливання вільних електронів, узгоджені за фазою [7]. Завдяки цьому явищу, так званому плазмонному резонансу, ефективність передачі енергії опромінення молекулам субстрату може багаторазово підвищуватися, при чому характер процесу залежить від розміру, форми наночастинок та від діелектричного оточення [8]. Якщо золоті наносфери мають єдиний пік поглинання близько 520 нм, у анізотропних частинок колоїдного золота в спектрі поглинання виявляються два піки, котрі відповідають поперечному та повздовжньому плазмонам. Перший плазмон дає пік при 520 нм, а другий може проявлятися в діапазоні від 600 нм до 1000 нм [7]. Біологічні тканини найбільш проникні для світла саме в ближній інфрачервоній області, тому синтез золотих наночастинок відповідної форми та розміру відкриває принадні додаткові перспективи для розробки на їх основі нових високоефективних варіантів фотодинамічної терапії.

Виходячи з вищевикладеного, *метою роботи* було створення нанокompatиту з колоїдного золота і такого відомого фотосенсибілізатора як гематопорфірин, визначення деяких фізико-хімічних характеристик отриманого комплексу та попередня оцінка його фотодинамічної активності на культурах трансформованих клітин та на експериментальних пухлинах лабораторних тварин.

Матеріали та методи

Для синтезу наночастинок золота нами використано цитратний метод відновлення золота із золотохлористоводневої кислоти, характерною особливістю якого є те, що цитрат-аніон одночасно виступає в ролі стабілізатора і відновлювача, тому зміна концентрації цього іону одночасно впливає на швидкість відновлення і на процеси росту наночастинок. Під час синтезу колір реакційної суміші змінюється, віддзеркалюючи перебіг

структурних перетворень, що відбуваються в системі, як то було продемонстровано за допомогою електронно-мікроскопічних досліджень [9].

За використаною нами методикою 0,001 М розчин HAuCl_4 нагрівали до кипіння при інтенсивному перемішуванні на магнітній мішалці, після чого додавали 0,039 М розчин $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ до отримання об'ємного співвідношення 50 : 1. Суміш продовжували кип'ятити при безперервному інтенсивному перемішуванні до появи рубіново-червоного забарвлення, додаючи при необхідності невеликі порції дистильованої води, охолоджували розчин та витримували його при кімнатній температурі ще 10-15 хвилин для остаточного дозрівання золю. Змінюючи співвідношення реагентів, одержували сферичні нанорозмірні частинки золота діаметром від 15 до 45 нм.

У дослідах з нанокompatитом «гематопорфірин – колоїдне золото» використовували 15 нм та 45 нм наночастки золота при постійній концентрації 2×10^{-4} М, стабілізовані додаванням 50 мкг/мл полівінілпіролідону, та (для порівняння) вихідний розчин гематопорфірину дигідрохлориду (Fluka, USA), $1,5 \times 10^{-3}$ М, який за необхідності розбавляли до потрібної концентрації. Для визначення характеру взаємодії молекул гематопорфірину з наночастками золота в синтезованих комплексах їх аналізували, отримуючи УФ-видимі спектри поглинання (спектрофотометр Specord UV-VIS Carl Zeiss, Germany).

При вивченні методом хемілюмінесценції здатності досліджуваного комплексу гематопорфірину з колоїдним золотом фотоіндукувати активні форми кисню використовували модельне середовище на основі очищеної фракції лецитину з офіційного препарату Ліпін® («Біолек», Харків, Україна). Суспензію з концентрацією фосфоліпідів 0,2 мг/мл готували на 20 мМ трис-буфері з 100 мМ KCl, pH 7,4 та тримали протягом всіх спостережень при 37°C. В модельне середовище вносили 5 мкг/мл гематопорфірину або стабілізований полівінілпіролідон комплекс гематопорфірину з колоїдним золотом до кінцевої концентрації 5 мкг/мл і 0,5 мкг/мл, відповідно. Як підсилювач інтенсивності світіння застосовували кумарин C-334 (Sigma-Aldrich, USA), додаючи його безпосередньо перед реєстрацією хемілюмінесценції по 10 мкл

0,05% спиртового розчину до 2 мл модельного середовища, у відповідності з методикою хемілюмінесцентного дослідження оксидативної активності фармакопрепаратів в суспензії фосфоліпідних ліпосом [10]. Хемілюмінесценцію реєстрували за допомогою приладу з фотоелектронним помножувачем, устаткованого цифровим лічильником імпульсів (НДПКІ «ІСКРА», Луганськ, Україна) та скомутованого з персональним комп'ютером. Інтенсивність світіння виражали числом імпульсів, що генеруються впродовж 1 с (I, c^{-1}) та обчислювали інтегральний показник – світлосуму за період спостереження ($\sum I_T$, де $T=500$ с). Для обчислення результатів використовували пакет програм MatLab 7.0.

Для дослідження фотодинамічної активності одержаних комплексів *in vitro* використані клітинні лінії трансформованих лімфоцитів людини: Т-клітинна лінія МТ-4 та В-клітинна лінія Namalwa. Клітини культивували у живильному середовищі RPMI-1640 («Фармбіотек», Україна) з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби («Sigma», США). Для дослідження фотодинамічної активності наноконкомплексів клітини інкубували при 37°C протягом 1,5 год в розчині Хенкса, що містив певні концентрації комплексу, відмивали від надлишкової кількості комплексу та опромінювали червоним світлом напівпровідникового лазера (довжина хвилі 635 нм) в дозі 50 Дж/см². Життєздатність лімфоцитів визначали за допомогою тесту з виключенням трипанового синього [11].

Досліди по визначенню ефективності фотодинамічної терапії пухлин із застосуванням наноконкомпозиту гематопорфірину з колоїдним золотом проводили на моделі епідермоїдної карциноми Льюїс, перещепленої в стегна мишам лінії C57Bl/6 (n = 20), яких брали в експеримент, коли діаметр пухлини перевищував 5 мм (згідно з

Методичними рекомендаціями Державного фармакологічного центру МОЗ України [12]). Препарати вводили в хвостову вену піддослідних тварин в об'ємі 0,4 мл із розрахунку 3 мг гематопорфірину та 0,3 мг колоїдного золота на мишу і через 1 добу здійснювали світлове опромінення пухлин. На 7-му і 14-ту добу після опромінення визначали площину пухлин, що добре корелює з їх масою при малих розмірах пухлин [13]. Для цього пухлини вимірювали в поперечному та повздовжньому (відносно осі стегна) напрямках і обчислювали показник гальмування їх росту у мишей дослідної групи в порівнянні з контролем (неліковані тварини з перещепленою карциномою Льюїс) за формулою:

$$\frac{S_K - S_O}{S_O} \cdot 100\%,$$

де S_K і S_O – середня площа пухлин у мишей контрольної і дослідної груп відповідно.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою параметричного критерію t Стьюдента – Фішера.

В усіх дослідах використовували червоне (635 нм) випромінювання напівпровідникового лазера виробництва ПМВП «Фотоніка Плюс» (м. Черкаси, Україна) при вихідній потужності 28 мВт та щільності потужності 35 мВт/см². Доза опромінення дорівнювала 50 Дж/см² в експериментах *in vitro* і 30 Дж/см² в експериментах *in vivo*.

Результати та їх обговорення

Спектральні характеристики отриманого наноконкомпозиту (рис. 1) вказують на суперпозицію спектрів абсорбції гематопорфірину і наночасток золота, тоді як полівінілпіролідон на них практично не впливає: йому властиве світлопоглинання в більш короткохвильовому діапазоні – до 220 нм.

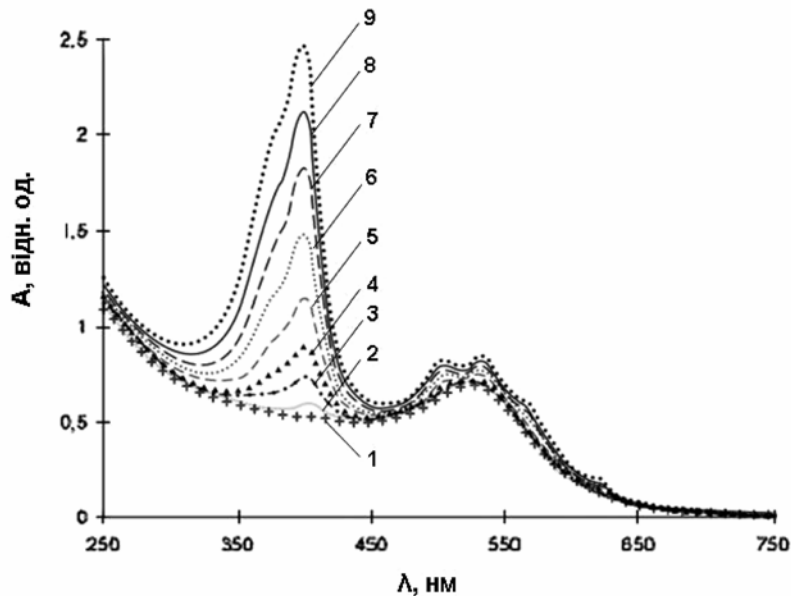


Рис. 1. Спектри абсорбції водного розчину наночастинок золота без гематопорфірину та після додавання його в різних концентраціях: 1 – Au; 2 – Au+ГП 0,2 мкМ; 3 – Au+ГП 1 мкМ; 4 – Au+ГП 2 мкМ; 5 – Au+ГП 3,5 мкМ; 6 – Au+ГП 5,5 мкМ; 7 – Au+ГП 14 мкМ; 8 – Au+ГП 16 мкМ; 9 – Au+ГП 25 мкМ

В області плазмонного резонансу наночастинок золота (близько 520 нм) спектр абсорбції залишається після внесення гематопорфірину практично незмінним. Це свідчить про відсутність безпосереднього контакту молекул гематопорфірину з поверхнею наночастинок золота. Проте, в порівнянні із самим гематопорфірином, в спектрі комплексу «гематопорфірин – нанозолото» спостерігається батохромний зсув смуги S_{ore} приблизно на 25 нм та розщеплення її на дві, котрі відповідають водному й етанольному розчинам гематопорфірину. Відомо, що сольватохромний зсув смуги S_{ore} в спектрі абсорбції гематопорфірину обумовлений насамперед утворенням димерів його молекул. Якщо в спиртових розчинах гематопорфірин перебуває переважно в молекулярному стані, то при переході у водні розчини спостерігається гіпсохромний зсув та розширення смуги S_{ore} , що свідчить про утворення Н-агрегатів молекул гематопорфірину (площина до площини). Батохромне зміщення смуги S_{ore} може також пояснюватись утворенням ком-

плексу з переносом заряду або твердотільного оточення молекули порфірину (наприклад, при переході молекул з розчину у плівку на його поверхні). Але в кожному з цих випадків суттєвих змін зазнавали би також Q-смуги $\pi \rightarrow \pi^*$ переходів в області 500-630 нм, проте у досліджуваного наноконструкту вони тільки дещо зміщуються: QI – 623,5→620 нм, QII – 568,5→568 нм, QIII – 536,5→533,5 нм, QIV – 504→498,5 нм. Отже, після додавання колоїдного золота до водного розчину гематопорфірину в спектрі абсорбції відбувається зсув, характерний для етанольних розчинів (рис. 2), який дає підстави стверджувати, що присутність золотих наночастинок в розчині підвищує долю неасоційованих молекул гематопорфірину. При цьому електронна цілісність наночастки золота не порушується і прямого контакту наночастки з молекулою гематопорфірину не відбувається. За очевидну перевагу наноконструкту можна вважати більш виражений, в порівнянні з водним розчином вихідного фотосенсибілізатору, пік в довгохвильовому діапазоні (620 нм).

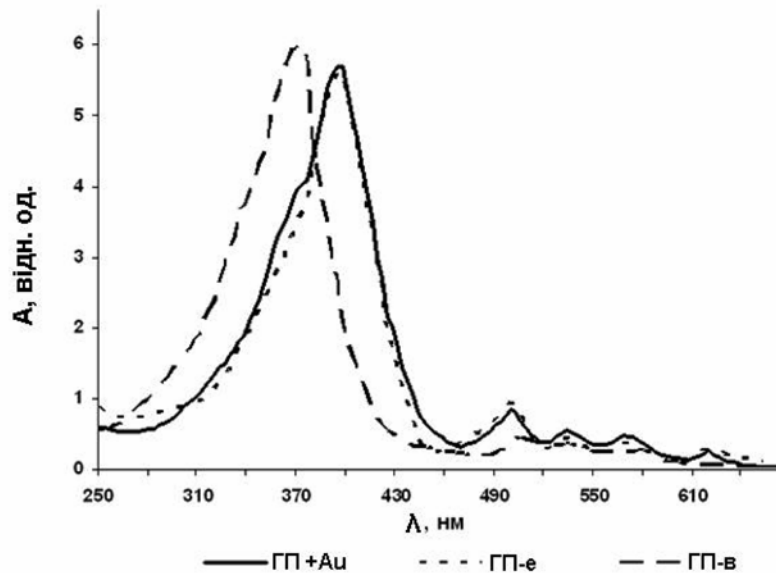


Рис. 2. Диференціальні спектри абсорбції наноконкомпексу колоїдного золота з гематопорфірином (ГП+Au) та розчину гематопорфірину в етанолі (ГП-е) і у воді (ГП-в)

Фотодинамічна активність комплексу гематопорфірину з колоїдним золотом в фосфоліпідній модельній системі відзначалася досить високою його спроможністю підтримувати вільнорадикальне окислення (рис. 3).

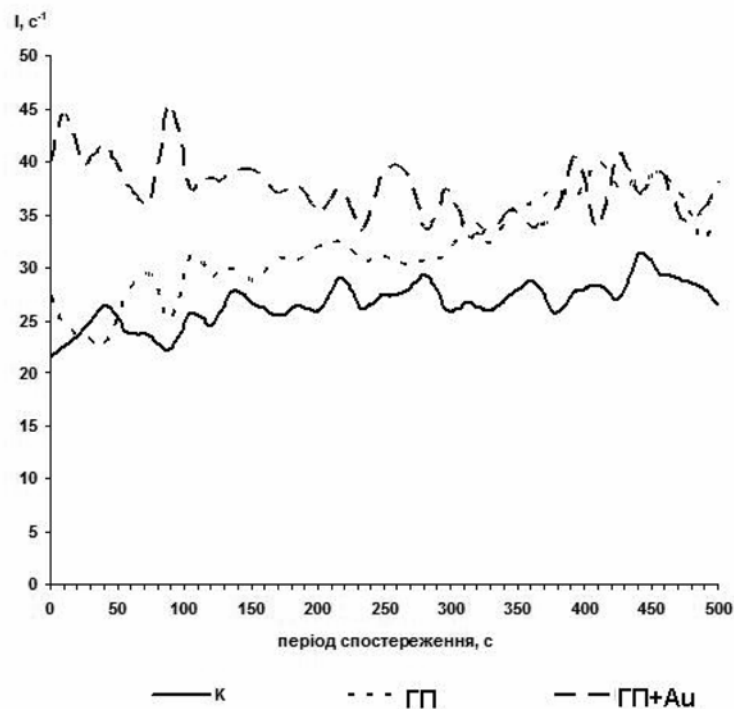


Рис. 3. Хемілюмінесценція фосфоліпідної модельної системи при опроміненні напівпровідниковим лазером ($\lambda = 635$ нм, 50 Дж/см²): К – без фотосенсибілізатору; ГП – з гематопорфірином; ГП+Au – з наноконкомпексу «гематопорфірин – колоїдне золото»

Інтенсивність хемілюмінесценції суспензії ліпосом за дії наноконкомпозиту виявилася більшою, ніж під впливом самого гематопорфірину (світлосума $\sum I_{500}$ перевищувала фоновий рівень на 39,0% і 17,6%,

відповідно, $P < 0,05$), очевидно за рахунок властивостей наночастинок золота, які здатні каталізувати реакції утворення перекисів із розчиненого кисню та подальше окислення ними субстрату [14, 15]. Звідси, слід

очікувати більш вираженої мембранотоксичної дії комплексу в порівнянні з вихідним сенсibilізатором, а також зміни співвідношення фотореакцій II і I типу (тобто таких, котрі супроводжуються утворенням синглетного кисню або інших активних форм кисню і вільнорадикальних похідних [16]).

У дослідях на трансформованих клітинах культуральних ліній використовували комплекси колоїдного золота з гематопорфірином, які містили різні співвідношення сенсibilізатора та золота, причому вміст гематопорфірину в них був постійним – 5 мкг/мл, а вміст наночастинок золота змінювався і складав у різних

варіантах комплексів 5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 1 мкг/мл та 0,5 мкг/мл. Вихідний гематопорфірин у концентрації 5 мкг/мл в дослідях на трансформованих лімфоцитах людини не проявляє темної (тобто чисто хімічної, не пов'язаної з впливом світлового опромінення) цитотоксичності, тоді як його фотодинамічна активність характеризується загибеллю 60-70% опромінених клітин. Зовсім інша картина спостерігається з комплексами «гематопорфірин – нанорозмірне золото». У таблиці 1 наведена темнова цитотоксичність та фотодинамічна активність комплексів гематопорфірину із золотими частками діаметром 15 нм.

Таблиця 1

Темнова цитотоксичність та фотодинамічна активність комплексів «гематопорфірин – нанозолото» (діаметр наночастинок 15 нм) в дослідях на клітинах лінії МТ-4 (загибель клітин, %)

№	Варіант дослідження (ГП мкг/мл : золото мкг/мл)	Темнова цитотоксичність	Фотодинамічна активність
1	5 : 5	90,1 ± 0,5	100,0 ± 0,0
2	5 : 2,5	69,3 ± 2,7	100,0 ± 0,0
3	5 : 1	86,2 ± 4,0	100,0 ± 0,0
4	5 : 0,5	81,9 ± 3,6	94,1 ± 2,8
5	0,5 : 0,1	0,0 ± 0,0	77,5 ± 3,8
6	0,5 : 0,05	5,2 ± 0,4	88,5 ± 0,4
7	0,1 : 0,01	1,9 ± 0,4	67,5 ± 1,0
8	0,05 : 0,005	0,7 ± 0,01	12,5 ± 1,3

З таблиці видно, що такі комплекси при концентрації гематопорфірину 5 мкг/мл (№ 1-4) мають певну темнову цитотоксичність – після 1,5-годинної інкубації з ними гинули 70-90% клітин. Тому на наступному етапі роботи застосували 10-кратне розбавлення вихідних розчинів наноконкомплексів (№ 5,6), тобто кожен досліджуваний варіант містив 0,5 мкг/мл гематопорфірину і відповідно в 10 разів меншу, порівняно з вихідною, кількість наночастинок золота (таблиця 1). Такі наноконкомплекси вже не проявляли темної цитотоксичності, а фотодинамічна активність їх залишалась високою – після світлового впливу гинули 77-88% опромінених клітин. При подальшому 5-кратному розбавленні розчинів наноконкомплексів (№ 7) фотодинамічна активність зберігалась на рівні 68% загинувих клітин. І лише після наступного 2-

кратного розбавлення наноконкомплексів вже майже не проявляли фотодинамічної активності (№ 8).

В таблиці 2 наведені дані, одержані в дослідях з комплексами гематопорфірину, що містять більш крупні наночастки золота – діаметром 45 нм. З таблиці видно, що такі наноконкомплекси (№ 1-4) також проявляють темнову цитотоксичність, але дещо нижчу, ніж попередні. При розбавленні в 10 разів (№ 5-8) вони вже не мають суттєвої темної цитотоксичності, а їх фотодинамічна активність зберігається на більш високому рівні, ніж у наноконкомплексів з дрібними частками золота. Фотодинамічна активність комплексів спостерігається і при подальшому їх розбавленні (у 50 разів, № 9), і лише після 100-кратного розбавлення наноконкомплексів практично втрачають фотодинамічну активність (№ 10).

Таблиця 2

Темнова цитотоксичність та фотодинамічна активність комплексів «гематопорфірин – нанозолото» (діаметр наночастинок 45 нм) в досліджах на клітинах лінії МТ-4 (загибель клітин, %)

№	Варіант досліджу (ГП мкг/мл : золото мкг/мл)	Темнова цитотоксичність	Фотодинамічна активність
1	5 : 5	41,3 ± 0,9	100,0 ± 0,0
2	5 : 2,5	22,2 ± 1,2	100,0 ± 0,0
3	5 : 1	81,7 ± 4,0	100,0 ± 0,0
4	5 : 0,5	79,5 ± 2,8	100,0 ± 0,0
5	0,5 : 0,5	10,7 ± 0,2	76,9 ± 2,3
6	0,5 : 0,25	10,9 ± 0,2	100,0 ± 0,0
7	0,5 : 0,1	5,9 ± 0,1	100,0 ± 0,0
8	0,5 : 0,05	3,7 ± 0,4	100,0 ± 0,0
9	0,1 : 0,01	1,1 ± 0,2	69,1 ± 2,3
10	0,05 : 0,005	0,7 ± 0,01	15,4 ± 1,3

На рис. 4 наведена в порівняльному аспекті фотодинамічна активність вихідного гематопорфірину в концентрації 0,5 мкг/мл та комплексів наночастинок золота обох діаметрів з гематопорфірином у тій же концентрації

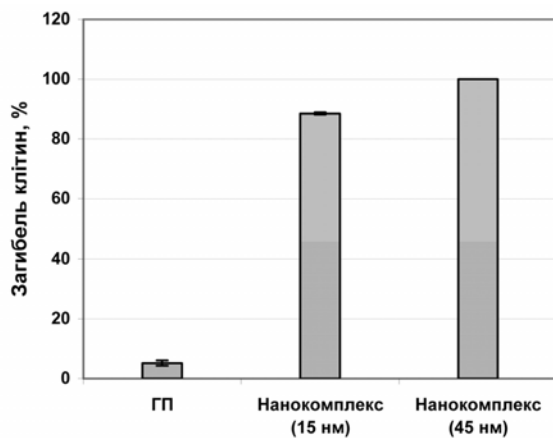


Рис.4. Фотодинамічна активність гематопорфірину та його комплексів з нанорозмірним золотом (клітинна лінія МТ-4, 50 Дж/см²)

Більш висока фотодинамічна активність комплексів з крупнішими наночастинами золота, яка спостерігалась в наших досліджах, пояснюється, очевидно, тим, що такі наноконплекси можуть транспортувати в пухлинні клітини більше молекул гематопорфірину порівняно з комплексами, що містять наночастилки меншого діаметру.

Таким чином, створені комплекси гематопорфірину з наночастинами золота обох розмірів у досліджах на трансформованих лімфоцитах клітинних ліній проявляють високу фотодинамічну активність, яка

зберігається до вмісту в них гематопорфірину 0,1 мкг/мл та наночастинок золота 0,01 мкг/мл.

Поряд з вивченням фотосенсибілізуючої активності синтезованого наноконплексу на культурах трансформованих клітин *in vitro*, була проведена попередня оцінка його ефективності в експериментах з фотодинамічної терапії мишей, котрим була перещеплена карцинома Льюїс. В досліджах використовували комплекс гематопорфірину з наночастинами золота розміром 45 нм, які виявились активнішими за частки 15 нм у дослідженнях *in vitro*. Отримані результати представлені в діаграмі на рис. 5.

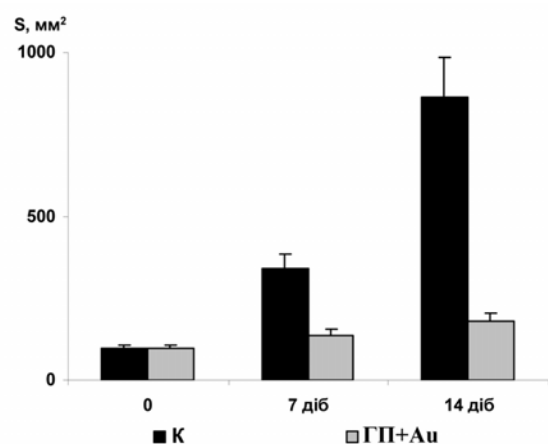


Рис. 5. Динаміка росту карциноми Льюїс під впливом фотодинамічної терапії з комплексом «гематопорфірин – колоїдне золото»: К – неліковані тварини, ГП+Au – тварини, яких лікували з використанням наноконпозитного фотосенсибілізатора

Як видно з цієї діаграми, одноразовий сеанс фотодинамічної терапії призводив до значного гальмування росту пухлин у порівнянні з контрольними тваринами. Це гальмування складало на 7-му добу після лікування 59,7 % ($p < 0,05$), а на 14-ту добу – 79,4% ($p < 0,05$).

Висновки

Синтезовано комплекси гематопорфірину з нанорозмірними частками золота і досліджено їх спектральні характеристики та фотодинамічну ефективність. Визначення хемілюмінесценції у модельній фосфоліпідній системі показало підвищену здатність наноконструкції активувати окислювальні процеси у порівнянні з вихідним гематопорфірином. В експериментах з культурами двох ліній трансформованих клітин встановлено, що фотосенсибілізуюча дія наноконструкції набагато перевищує таку вільного гематопорфірину. Досліди з експериментальної фотодинамічної терапії мишей з перещепленою карциномою Льюїс підтвердили значну протипухлинну фотодинамічну активність отриманого наноконструкції.

Література

1. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина / Г.И. Клебанов, О.Б. Любичкий, О.В. Васильева и др. // Вопросы мед. химии. – 2001. – № 3. – С. 76-81.
2. Владимиров Ю.А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко. – М., 1989. – 199 с.
3. Доклінічне вивчення специфічної активності протипухлинних засобів // Доклінічне дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації. – К.: Авіцена, 2001. – С. 361-370.
4. Створення та експериментальна апробація нового антитіло-кон'югованого сенсibilізатора для фотодинамічної терапії пухлин / М.Ф. Гамалія, І.О. Лісняк, Н.Л. Новіченко та ін. // Фотобіологія та фотомедицина. – 2007. – Т. 5, №1-2. – С. 76-82.
5. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles / P. Mukherjee, R. Bhattacharya, P. Wang et al. // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 3530-3534.
6. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-soluble photosensitizing anticancer drugs a

novel drug-carrier system for photodynamic therapy / I. Roy, T.Y. Ohulchansky, H.E. Pudavar et al. // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 124. – P. 7860-7865.

7. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a «Trojan horse» / M.E. Wieder, D.C. Hone, M.J. Cook et al. // Photochem. Photobiol. Sci. – 2006. – Vol. 5. – P. 727-734.

8. Jain P.K. Au nanoparticles target cancer / P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed // Nanotoday. – 2007. – Vol.2, №1. – P. 18-29.

9. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters / M. Gaumet, A. Vargas, R. Gurny, F. Delie // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2008. – Vol. 69. – P. 1-9.

10. Nanoshell-mediated near infrared thermal therapy of tumors under MR guidance / L.R. Hirsch, R.J. Stafford, J.A. Bankson et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2003. – Vol.100, №23. – P. 13549-13554.

11. New insights on the nanoparticle growth mechanism in the citrate reduction of gold (III) salt: formation of the Au nanowire intermediate and nonlinear optical properties / B.K. Pong, H.I. Elim, J-X. Chong et al. // J. Phys. Chem. – 2007. – Vol. 111, №17. – P. 6281-6289.

12. Popov A.P. Optimal sizes of gold nanoparticles for laser treatment of tumors / A.P. Popov, A.V. Priezhev, R. Myllylä // Fifth International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine, 2007 – P. 65343K-1-65343K-5.

13. Safavi A., Absalan G., Bamdad F. Effect of gold nanoparticle as a novel nanocatalyst on luminol-hydrazine chemiluminescence system and its analytical application / A. Safavi, G. Absalan, F. Bamdad // Analytica Chimica Acta. – 2008. – Vol. 610. – P. 243-248.

14. Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models / L. Balogh, S.S. Nigavekar, B.M. Nair et al. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2007. – Vol. 3. – P. 281-296.

15. Tomayko M.M. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice / M.M. Tomayko, C.P. Reynolds // Cancer Chemother Pharmacol. – 1989. – Vol. 24. – P. 148-154.

16. Wang C.M. Electrogenerated chemiluminescence of luminol in neutral and alkaline aqueous solutions on a silver nanoparticle self-assembled gold electrode / C.M. Wang, H. Cui // Luminescence. – 2007. – Vol. 22, №1. – P. 35-45.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ПУТЕМ
ПРИМЕНЕНИЯ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА

Н.Ф. Гамалея, И.А. Лисняк, И.В. Прокопенко, Е.Д. Шишко,
Г.А. Долинский, А.А. Мамчур, О.В. Усатенко*, О.Б. Щербаков*, В.В. Холин**, А.В. Корунец**
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,
лаборатория квантовой нанобиологии,
03022 Украина, г. Киев, ул. Васильковская, 45,
тел.: (044) 259-0167;

*НИИ нанотехнологической индустрии, г. Киев;

**ЧМПП «Фотоника Плюс», г. Черкассы

Синтезированы комплексы гематопорфирина с наноразмерными частицами золота (коллоидным золотом) диаметром 15 нм и 45 нм и охарактеризованы их спектральные особенности. Методом хемилюминесценции с использованием фосфолипидной модельной системы показана повышенная фотоокислительная способность наноконъюгированных фотосенсибилизаторов по сравнению с исходным гематопорфирином. В опытах *in vitro* на трансформированных лимфоцитах клеточных линий установлена существенно большая фотодинамическая активность наноконъюгатов, чем неконъюгированного фотосенсибилизатора, при этом лучшие результаты получены с наночастицами размером 45 нм. Экспериментальная фотодинамическая терапия мышей с трансплантированной карциномой Льюис подтвердила высокую противоопухолевую эффективность исследованного наноконъюгированного фотосенсибилизатора «гематопорфирин – коллоидное золото».

Ключевые слова: фотодинамическая терапия опухолей, фотосенсибилизаторы, гематопорфирин, коллоидное золото, наноконъюгаты, экспериментальные опухоли.

ENHANCEMENT OF PDT EFFICIENCY BY APPLICATION OF THE COLLOID GOLD

N.F. Gamaley, I.A. Lisnyak, I.V. Prokopenko, E.D. Shishko,
G.A. Dolinskiy, A.A. Mamchur, O.V. Usatenko*, O.B. Scherbakov*, V.V. Kholin**, A.V. Korunets**
Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology by R.E. Kavetskiy, of NAS of Ukraine, Laboratory
of Quantum Nanobiology,
03022 Ukraine, Kiev, Vasilkovskaya Str., 45,
tel.: (044) 259-0167;

*Scientific Research Institute of Nanotechnological Industry, Kiev;

**PSPE «Fotonika Plus», Cherkassy

The conjugates of hematoporphyrin with gold nanoparticles (colloid gold), having a diameter of 15 nm and 45 nm, were synthesized, and their spectral parameters were characterized. By chemiluminescence method with the utilization of phospholipid model system, the enhanced photooxidative ability of the nanocomposite photosensitizers in comparison with the original hematoporphyrin was shown. In studies *in vitro* on transformed lymphocytes of cell lines, the substantially higher photodynamic activity of the nanocomposites versus unconjugated photosensitizer was established, and the better results were obtained with particles of 45 nm. By the experimental photodynamic therapy (PDT) of mice with transplanted Lewis carcinoma, high antitumor efficiency of the nanocomposite photosensitizer «hematoporphyrin – colloid gold» was confirmed.

Key words: photodynamic therapy of tumours, nanocomposite photosensitizer, gematoporfirin, colloid gold, experimental tumors.