

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТООКИСЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА ФОТОЛОН В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ IN VITRO

Долинский Г. А.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, лаборатория квантовой нанобиологии;
ул. Васильковская, 45, г. Киев, 03022 Украина,
тел.: +38 (044)258-16-58

Методами флуоресцентной спектроскопии и люминол-зависимой хемилюминесценции в модельной системе, содержащей фосфолипиды и альбумин, исследовано фотодинамическое действие препарата фотолон (комплекс хлорина еб с поливинилпирролидоном). При облучении 10 мкМ раствора фотолон лазером (длина волны излучения 660 нм) наблюдалась интенсивная продукция синглетного кислорода, причем увеличение плотности дозы облучения с 0,5 до 5 Дж/см² сопровождалось деградацией фотосенсибилизатора. Показана существенная роль процессов свободнорадикального окисления в суммарном фотодинамическом эффекте фотолон. Сделан вывод о возможности использования предложенного теста при разработке протоколов фотодинамической терапии.

Ключевые слова: фотоокислительные процессы, фотолон, синглетный кислород, свободные радикалы, хемилюминесценция.

Введение и постановка задачи

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — одно из наиболее перспективных направлений в лечении злокачественных новообразований, а также ряда заболеваний неопухолевой природы, патогенез которых связан с проявлением клеточных аномалий либо нарушением клеточного обновления. Лечебное воздействие при этом включает два этапа: 1) местное или системное введение исходно нецитотоксичного фармакоагента — фотосенсибилизатора (ФС); 2) последующее воздействие видимым излучением на патологический очаг, индуцирующее в нем цепь физико-химических и молекулярно-биологических процессов, которые приводят в итоге к элиминации атипичных клеток [6]. На масштабы и цитотоксичность фотодинамического воздействия влияют характер накопления в тканях и клетках фотосенсибилизирующего вещества, временной интервал между его введением и облучением, суммарная доза и мощность светового потока, уровень оксигенации ткани и др. Все эти факторы обуславливают эффективность ФДТ, модулируя течение трех основных процессов — непосредственную гибель клеток, разрушение сосудистой сети, активацию иммунного ответа [13].

В последние годы идет интенсивная разработка ФС третьего поколения, отличающихся

от предыдущих целенаправленной модификацией свойств для достижения желаемого терапевтического действия [7]. Поэтому весьма актуальны задачи тестирования и отбора новых ФС на доклиническом этапе, для чего необходима система предварительной количественной оценки зависимости фотодинамического эффекта от дозы препарата и параметров облучения.

В соответствии с современными представлениями о фотофизических и фотохимических процессах, молекулы ФС, активированные при поглощении фотона, переходят из синглетного состояния в триплетное, с относительно большим периодом существования. Находясь в возбужденном состоянии, эти молекулы могут химически взаимодействовать с биологическими субстратами в реакциях переноса атома водорода или электрона, в аэробных условиях сопровождающихся генерацией активных форм кислорода (фотоокислительные реакции I типа). Другой путь — не прямой, когда энергия триплетного состояния молекул ФС переносится на растворенный в жидкой фазе кислород с образованием синглетного кислорода, окислительная активность которого приблизительно в 100 раз выше (реакции II типа) [2].

Именно последнему пути отводится главенствующая роль в молекулярных механизмах ФДТ — как исходя из косвенных экспериментальных доказательств, так и по результатам непосредственных наблюдений [11, 12].

Но фактически оба пути передачи энергии возбужденного состояния молекул реализуются одновременно, причем соотношение между ними зависит от физико-химических свойств ФС, а также от природы субстрата окисления, что и должна учитывать адекватная система оценки фотодинамического эффекта [14].

Целью настоящей работы была разработка комплекса для тестирования ФС *in vitro*, позволяющего на основании изучения фотоокислительных процессов прогнозировать эффективность новых фармакологических агентов для ФДТ.

Материалы и методы

Для исследования фотодинамической активности нами был выбран фотосенсибилизирующий препарат фотолон (производство РУП «Белмедпрепараты», г. Минск, Беларусь; препарат зарегистрирован в Беларуси и России), представляющий собой комплекс хлорина еб с поливинилпирролидоном.

Продукцию синглетного кислорода оценивали по интенсивности флуоресценции специфического реагента Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, Molecular Probes, USA), используя в соответствии с рекомендациями производителя 1 мкМ раствор SOSG и 10 мкМ раствор ФС в 100 мМ трис-буфере, pH=7,5. Регистрацию флуоресценции проводили при помощи флуороспектрометра NanoDrop ND-3300 (USA) в режиме «Fluorescence Profiler», отбирая пробы до и после облучения раствора полупроводниковым лазером (ООО «Фотоника Плюс», г. Черкассы, Украина) с длиной волны излучения 660 нм и выходной мощностью 25 мВт. Плотность дозы облучения варьировали при исследовании в пределах 0,5–5,0 Дж/см².

Фотоокислительные процессы инициировали в модельной системе, содержащей фосфолипиды и альбумин в концентрациях, близких к таковым в плазме крови. Суспензию 0,75 мг/мл лецитина («Биолек», г. Харьков, Украина) и 40 мг/мл альбумина (Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, USA) готовили на 20 мМ трис-буфере, pH=7,4 с 100 мМ KCl. Методом люминол-зависимой хемилюминесценции выявляли накопление метастабильных продуктов свободнорадикальных реакций после добавления фотолона (10 мкМ в перерасчете на концентрацию хлорина еб) без экспонирования и после облучения с плотностью дозы 5 Дж/см². Свечение регистрировали с помощью хемилюминометра LB 953 AutoLumat

(Berthold, Germany), измеряя фоновый уровень и светосумму за 30 секунд (S₃₀) после инъекции 10 мкМ раствора люминола (Fluka, USA), приготовленного *ex tempore* разведением 10 мМ стокового раствора в 60 мМ карбонатном буфере, pH=10,5 с добавлением 5 мкМ CoCl₂.

Обработку данных проводили методами параметрической статистики (n=5 для всех контрольных и опытных проб) с использованием программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

Флуоресцентный профиль раствора фотолон в трис-буфере, зарегистрированный при длине волны возбуждающего излучения λ_{ex}=500÷650 нм, имел выраженный пик в области 663 нм, амплитуда которого снижалась по мере увеличения дозы красного лазерного излучения (рис. 1). Когда плотность дозы облучения достигла 5 Дж/см², интенсивность флуоресценции фотолон уменьшилась в 3,6 раза по сравнению с исходным уровнем (P < 0,001). Очевидно, это было связано с фотодеградацией ФС, характерной для хлоринов [10].

При добавлении индикатора синглетного кислорода SOSG к раствору фотолон фоновая флуоресценция при длине волны возбуждения λ_{ex}=470±10 нм была незначительной, но уже после облучения с плотностью дозы 0,5 Дж/см² наблюдался пик в области 527 нм, амплитуда которого превышала исходный уровень более чем в 5 раз (P < 0,001). Дальнейшее увеличение дозы практически не влияло на интенсивность флуоресценции, а приводило лишь к некоторо-

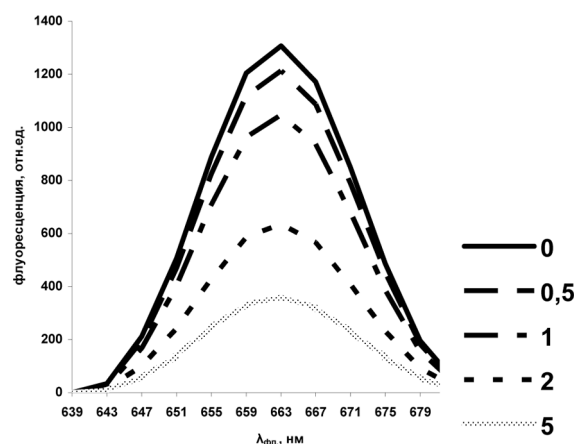


Рис. 1. Изменение флуоресценции раствора фотолон после воздействия лазерным излучением с длиной волны 660 нм и мощностью 25 мВт: 0 — исходный уровень, 0,5–5 — плотность дозы облучения в Дж/см².

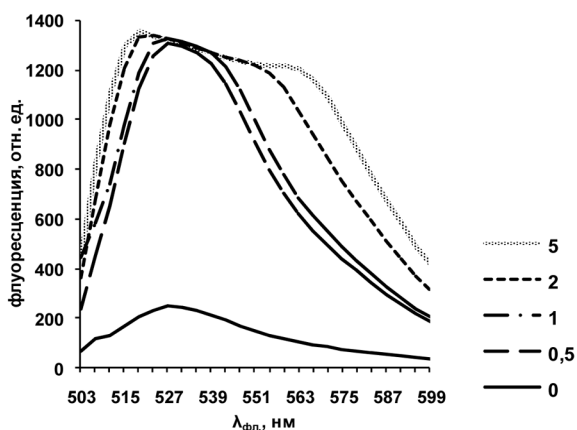


Рис. 2. Изменение флуоресценции индикатора синглетного кислорода SOSG в растворе фотолонна после воздействия лазерным излучением с длиной волны 660 нм и мощностью 25 мВт: 0 — исходный уровень, 0,5–5 — плотность дозы облучения в Дж/см².

му смещению максимума кривой и его «размыванию» (рис. 2).

По-видимому, даже при небольшой плотности дозы красного лазерного излучения вырабатывалось достаточное количество синглетного кислорода, чтобы перевести весь присутствующий в растворе индикатор SOSG в флуоресцентный продукт. Эти данные согласуются с результатами исследований, продемонстрировавших высокую фотодинамическую активность фотолонна [4, 5, 8, 9].

Фоновый уровень хемилюминесценции в фосфолипидной модельной системе с альбумином не изменялся при ее облучении без ФС, а также при внесении фотолонна без последующего облучения (рис. 3А), тогда как фотоэкспозиция сопровождалась пятикратным усилением интенсивности свечения (рис. 3Б). Очевидно, в этих условиях инициировались цепные реакции перекисного окисления липидов, имеющие достаточно высокий квантовый выход люминесценции [1].

После инъекции люминола в суспензии фосфолипидов с альбумином наблюдалась хемилюминесценция, интенсивность которой почти в 1,5 раза превышала фоновую ($P < 0,05$), но была фотонезависимой (рис. 4). Следовательно, исходное содержание гидроперекисей липидов в модельной системе без ФС не изменялось под действием красного лазерного излучения.

Фотолон существенно (на 65,8%, $P < 0,05$) усиливал люминол-зависимую хемилюминесценцию даже в «темновой» пробе (рис. 4А).

Возможно, ФС вызывал аутоокисление люминола, но нельзя исключать также инициацию процессов свободнорадикального окисления, которые при отсутствии специфического облучения ингибируются вследствие антиоксидантных свойств фосфолипидов и альбумина [3]. Однако накапливающиеся при этом метастабильные продукты образуют пул прооксидантов, способных поддерживать и усиливать свободнорадикальные реакции, в том числе фотоиндуцированные. В пользу такого объяснения свидетельствует повышение интенсивности свечения люминола в модельной системе после фотоэкспозиции (рис. 4Б). Хемилюминесценция

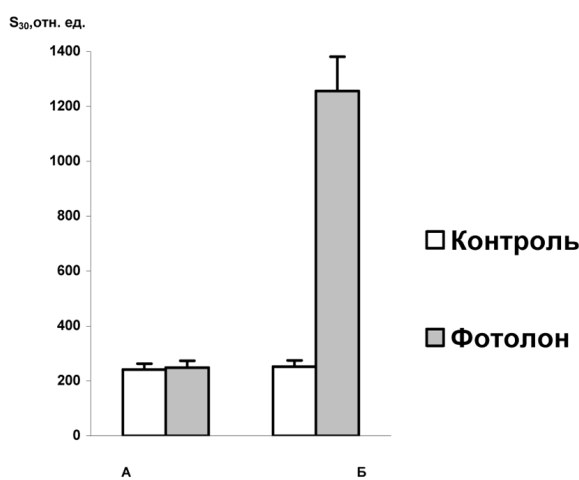


Рис. 3. Фоновая хемилюминесценция модельной системы с фосфолипидами и альбумином после добавления 10 мкМ фотолонна: А — «темновая» проба; Б — облучение с плотностью дозы 5 Дж/см².

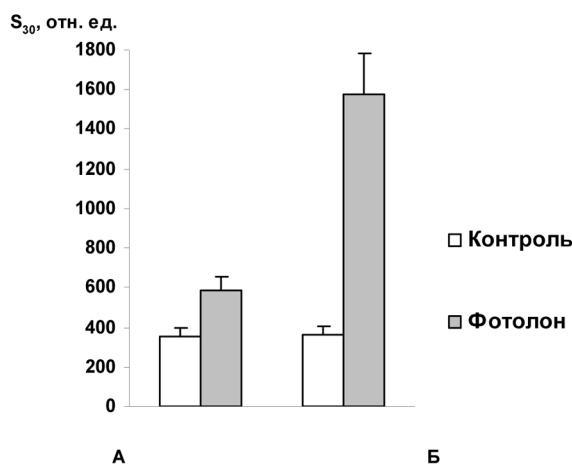


Рис. 4. Люминол-зависимая хемилюминесценция модельной системы с фосфолипидами и альбумином после добавления 10 мкМ фотолонна: А — «темновая» проба; Б — облучение с плотностью дозы 5 Дж/см².

ция облученных образцов после инъекции люминола превысила фоновый уровень на 25,7% ($P < 0,05$), а по сравнению с «темновой» пробой выросла в 2,7 раза ($P < 0,001$).

Выводы

Фотодинамический эффект фотолон связан как с высокоинтенсивной продукцией синглетного кислорода, так и с инициацией под действием ФС процессов свободнорадикального окисления, в том числе в «темновой» фазе.

Предложенный нами комплекс тестов с использованием флуоресцентного индикатора синглетного кислорода Singlet Oxygen Sensor Green и люминол-зависимой хемилюминесценции в модельной системе с фосфолипидами и альбумином позволяет выявить специфические закономерности течения фотоокислительных процессов, которые необходимо учитывать при разработке протоколов ФДТ с новыми ФС.

Литература

1. Владимиров Ю. А. Активированная хемилюминесценция // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — Т.7, № 1. — С.16–23.
2. Владимиров Ю. А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю. А. Владимиров, А. Я. Потапенко. — М.: Высш. шк., 1989. — 199 с.
3. Клебанов Г. И. Антиоксидантная активность сыворотки крови / Г. И. Клебанов, Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова и др. // Вестник РАМН. — 1999. — № 2. — С.15–22.
4. Петров П. Т. Фотосенсибилизатор фотолон — от научной идеи до практической реализации // Экспериментальная и клиническая фармакология: Материалы 3-й международной научной конференции. — Минск, 2009. — С.9–13.
5. Церковский Д. А. Использование лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии *in vivo* для изучения динамики накопления фотосенсибилизатора фотолон в тканях головного мозга крыс / Д. А. Церковский, В. Н. Чалов, Ю. П. Истомина // Экспериментальная и клиническая фармакология: Материалы 3-й международной научной конференции. — Минск, 2009. — С.122–124.
6. Castano A.P. Mechanisms in photodynamic therapy: Part II — cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death / A. P. Castano, T. N. Demidova, M. R. Hamblin // Photodiag. and Photodyn. Therapy. — 2005. — Vol.2. — P.1–23.
7. Huang Z A Review of progress in clinical photodynamic therapy // Technol. Cancer Res. Treat. — 2005. — Vol.4, №3. — P.283–293.
8. Isakau H.A. HPLC study of chlorin e6 and its molecular complex with polyvinylpyrrolidone / H.A. Isakau, T. V. Trukhachova, A. I. Zhebentyaev, P. T. Petrov // Biomed. Chromatogr. — 2007. — Vol.21. — P.318–325.
9. Isakau H.A. Toward understanding the high PDT efficacy of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone formulations: Photophysical and molecular aspects of photosensitizer-polymer interaction *in vitro* / H.A. Isakau, M. V. Parkhats, V. N. Knyuksho et al. // J Photochem. and Photobiol. B: Biology. — 2008. — Vol.92. — P.165–174.
10. Lassalle H. — P. Photodegradation and phototransformation of 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (m-THPBC) in solution / H. — P. Lassalle, L. Bezdetnaya, V. Iani et al. // Photochem. Photobiol. Sci. — 2004. — Vol.3. — P. 99–1005.
11. Niedre M. J. *In vitro* test of the validity of singlet luminescence measurement as a dose metric in photodynamic therapy / M. J. Niedre, A. J. Secord, M. S. Patterson, B. C. Wilson // Cancer Res. — 2003. — Vol.63. — P.7986–7994.
12. Niedre M. J. Singlet oxygen luminescence as an *in vivo* photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid / M. J. Niedre, C. S. Yu, M. S. Patterson, B. C. Wilson // British J. of Cancer. — 2005. — Vol.92. — P.298–304.
13. Plaetzer K. The modes of cell death induced by PDT: An overview / K. Plaetzer, T. Kiesslich, T. Verwanger, B. Krammer // Med. Laser Appl. — 2003. — Vol.18. — P.7–19.
14. Price M. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy / M. Price, J. J. Reiners, A. M. Santiago, D. Kessel // Photochem. Photobiol. — 2009. — Vol.85, № 5. — P.1177–1181.

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФОТООКСИДОВАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТУ ФОТОЛОН
В МОДЕЛЬНІЙ СИСТЕМІ IN VITRO**

Долінський Г. А.

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, лабораторія квантової нанобіології*

Методами флуоресцентної спектроскопії й люмінол-залежної хемілюмінесценції в модельній системі, що містить фосфоліпиди та альбумін, була досліджена фотодинамічна дія препарату фотолон (комплекс хлорину е6 з полівінілпіролідом). При опроміненні 10 мкМ розчину фотолону лазером (довжина хвилі 660 нм) спостерігалася інтенсивна продукція синглетного кисню, натомість підвищення експозиційної дози з 0,5 до 5 Дж/см² супроводжувалося деградацією фотосенсибілізатора. Показана суттєва роль процесів вільнорадикального окислення в сумарному фотодинамічному ефекті фотолону. Зроблено висновок про доцільність використання запропонованого теста при розробці протоколів фотодинамічної терапії.

Ключові слова: *фотooksидовальні процеси, фотолон, синглетний кисень, вільні радикали, хемілюмінесценція.*

**THE ASSAY OF PHOTOLON PHOTOOXIDATIVE PROPERTIES USING
IN VITRO MODEL SYSTEM**

Dolynskiy G. A.

*R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
NAS of Ukraine, the Laboratory of Quantum Nanobiology*

The photodynamic activity of photolon (chlorin e6 - polyvinylpyrrolidone complex) was studied using fluorescence spectroscopy and lumimol-dependent chemiluminescence in model system with phospholipids and albumin. The 660 nm diode laser irradiation of 10 μM photolon solution resulted in high-level singlet oxygen production, while the 0.5 to 5 J/cm² exposure dose enhancing was followed by the photosensitizer degradation. The significant contribution of free radicals oxidation processes to the total photolon photodynamic effect was demonstrated. The applicability of the proposed tests for photodynamic therapy protocols development was concluded.

Keywords: *photooxidative processes, photolon, singlet oxygen, free radicals, chemiluminescence.*