

РОЗПОДІЛ ФОТОСЕНСИБІЛІЗАТОРА ХЛОРИНА Е6 В НОРМАЛЬНИХ І ПУХЛИННИХ ТКАНИНАХ МИШЕЙ ТА ВПЛИВ НА ЦЕЙ ПРОЦЕС НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА

Прокопенко І. В., Мамчур А. А., Шишко Є. Д.,
Щербаков О. Б.*, Усатенко О. В.*, Гамалія М. Ф.

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 Україна, тел.: +38 (044)259-01-67;

*Науково-дослідний інститут нанотехнологічної індустрії, м. Київ

За допомогою флуоресцентної спектроскопії показано, що фотосенсибілізатор хлорин еб і його комплекс з наночастинками золота максимально накопичується у внутрішніх органах і карциномі Льюїс мишей через 1 годину після введення препарату. Найбільш інтенсивно фотосенсибілізатор накопичується в пухлинній тканині. Комплексування хлорина еб із наночастинками золота сприяє підвищенню акумуляції фотосенсибілізатору в пухлині та внутрішніх органах.

Ключові слова: флуоресцентна спектроскопія, фотосенсибілізатор хлорин еб, наночастинки золота, карцинома Льюїс.

Вступ

Фотодинамічна терапія (ФДТ) пухлин є сучасним малотравматичним методом вибіркового руйнування злоякісних новоутворень. Метод ФДТ заснований на концепції, згідно з якою деякі хімічні агенти — фотосенсибілізатори (ФС) — можуть із високою специфічністю накопичуватися в тканинах-мішенях. При світловому опроміненні з певною довжиною хвилі ФС активується, генеруючи молекули синглетного кисню та вільні радикали, токсичні для клітин і тканин, в яких ФС депонувався. Докладне визначення цитотоксичної дії ФДТ, спрямованої на тканини-мішені, було зроблене у роботі [7].

ФДТ дозволяє вибірково впливати на патологічні (неопластичні) тканини. Як було показано в численних експериментальних і клінічних дослідженнях, після введення ФС до організму він накопичується переважно в тканинах із високою мітотичною активністю, зокрема в ендотелії неогенних судин, у тканинах із високими рівнями проліферації та васкуляризації, а також у клітинах паренхіми пухлин [2, 4, 11]. Властивість ФС накопичуватися переважно в пухлинній тканині та місцеве опромінення тканини-мішені лазерним світлом дозволяє з високою селективністю руйнувати малігнізовані та інші атипівні клітини й мінімізувати ушкодження навколишніх здорових тканин.

Ефективність ФДТ великою мірою залежить від концентрації ФС у тканині-мішені. В той же час, безпечність процедури визначається рівнем ФС у здорових тканинах, що оточують пухлину, впродовж опромінення [5, 12]. Тому оцінка селективності накопичення ФС у тканинах-мішенях, як і біорозподіл його по нормальних тканинах, є найважливішими показниками під час конструювання нових ФС та оптимізації протоколів ФДТ.

При всіх перевагах ФДТ має один суттєвий недолік — слабе проникнення світлового випромінювання вглиб тканини, що обмежує практичне застосування цього методу ранніми формами раку, пухлинами малого розміру та помірної товщини, тощо. Тому ведеться активний пошук шляхів подолання цього недоліку — зокрема, нових ФС та їх комплексів із підвищеним накопиченням у пухлинній тканині, які спричиняли б лікувальний ефект навіть при низькому рівні енергії випромінювання, що проникло у глибину пухлини.

Одним з шляхів посилення чутливості пухлинної тканини до ФДТ може бути створення композитів фотосенсибілізуючих препаратів з наночастинками золота (НЧЗ) [6]. Такі композити можуть підвищити водорозчинність гідрофобних порфіринових ФС, які традиційно застосовуються при ФДТ, а також, враховуючи тропність нанозолота до пухлинної тканини, спрямувати до пухлини більшу кількість фотосенсибілізуючих молекул.

Відомо, що пухлинні клітини акумулюють в 6 разів більше НЧЗ, ніж нормальні [9]. Роботу

та [10] дає ключ до розуміння того, чим обумовлена така тропність нанорозмірного золота до пухлинної тканини. Було показано, що наночастинкам колоїдного золота притаманна антиангіогенна дія — вони пригнічують індуквану VEGF₁₆₅ (одним із ангіогенних ростових факторів — Vascular Endothelial Growth Factor) проліферацію ендотеліальних клітин. VEGF₁₆₅ є мітогеном для клітин ендотелію та первинним медіатором ангіогенезу, який відіграє головну роль у патологічній неоваскуляризації при ревматоїдному артриті, хронічному запаленні та злоякісних новоутвореннях. Молекула VEGF₁₆₅ має гепарин-зв'язуючий домен. Було встановлено, що нанорозмірне золото приєднується безпосередньо до гепарин-зв'язуючого домену молекули VEGF₁₆₅, таким чином, блокує взаємодію VEGF₁₆₅ з його рецептором та запуск сигнального каскаду VEGF₁₆₅-опосередкованого ангіогенезу.

Таким чином, тропність НЧЗ до пухлинної тканини може бути пов'язана з добре відомою для пухлин наявністю зон активного неоангіогенезу, а, отже, з підвищеним рівнем в них VEGF. Отже, застосування НЧЗ виглядає перспективним прийомом для підвищення накопичення ФС в пухлині. Як наслідок, можна розраховувати на більш значний протипухлинний фотодинамічний ефект навіть при низькому рівні енергії світлового випромінювання, що проникло в пухлину.

Для кількісної оцінки ролі нанорозмірного золота у накопиченні різних фотосенсибілізуючих препаратів нами було проведено серію експериментів, де аналізувався вплив НЧЗ на акумуляцію ФС в тканинах тварин. В представленій роботі використовувався ФС порфіринового ряду — хлорин еб, розчинений в полівінілпіролідоні (хлорин еб - ПВП). У ході дослідів було проведене флуоресцентне визначення накопичення даного ФС та його композиту із нанорозмірним золотом в пухлинах та нормальних тканинах мишей.

Матеріали та методи

Експерименти проводили на мишах із перещепленою карциномою Льюїс розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до прийнятих міжнародних правил проведення робіт з лабораторними тваринами. Досліди проводили на стадії добре сформованої пухлини

(діаметр ~ 1 см) на чотирьох групах тварин по 3 миші в кожній (середня вага 20 г). Хлорин еб у концентрації 2,5 мг/кг маси тварин, або його композит з наночастинками колоїдного золота (діаметр 15–45 нм), що містив еквівалентну кількість ФС, вводили тваринам у хвостову вену.

Для визначення часу максимального накопичення реєстрували інтенсивність флуоресценції хлорину еб, виділеного з нормальних тканин та пухлини, через 0,5; 1,0; 1,5 та 3 години після його введення. Інтенсивність флуоресценції посередньо відбиває концентрацію фотодинамічного агента у зразку.

Через визначені інтервали часу тварин забивали шляхом цервікальної дислокації і видаляли пухлину, печінку, нирки, селезінку, шкіру, а також брали кров. З крові мишей отримували сироватку. Видалені органи двічі промивали у розчині фосфатного буферу (рН 7,2), висушували на фільтрувальному папері та зважували. Потім їх заморожували, механічно гомогенізували і переносили в метанольно-водний розчин (3: 1), продовжуючи подрібнення тканин. Ступінь гомогенізації контролювали під мікроскопом. Суспензії центрифугували 10 хвилин при 1000 g (2500 об./хв.) та відбирали супернатанти [1].

Для оцінки накопичення хлорину еб та комплексу хлорин еб-золото у тканинах мишей із карциномою Льюїс проводились спектральні вимірювання супернатантів та сироваток із використанням спектрофлуориметра Nanodrop-3300 (США). Ступінь накопичення фотосенсибілізуючих агентів визначали за специфічною флуоресценцією при хвилі збуджуючого випромінювання близько 638 нм. Для аналізу використовували пік флуоресценції хлорину еб (довжина хвилі 660–670 нм). Результати досліджень піддавались статистичній обробці з використанням загальноприйнятих критеріїв різниці між дослідними групами.

Результати та їх обговорення

Проведені флуоресцентно-спектроскопічні дослідження накопичення в нормальних тканинах та пухлинах мишей фотосенсибілізуючого комплексу хлорин еб-колоїдне золото у порівнянні з вільним ФС. Показано, що після введення фотосенсибілізатор по-різному розподіляється у внутрішніх органах та тканинах. На представлених нижче графіках дається залежність відносних показників накопичення ФС від часу після його введення.

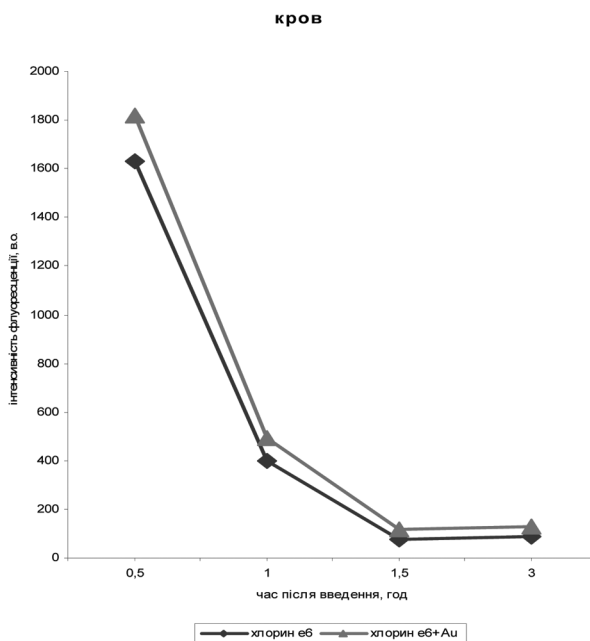


Рис. 1. Динаміка накопичення хлорину е6 та його комплексу з колоїдним золотом (хлорин е6+ Au) в крові мишей

У крові максимум інтенсивності флуоресценції і, відповідно, вмісту ФС спостерігався, як і слід очікувати, безпосередньо після введення (рис. 1). Деяка, хоч і незначна різниця вмісту між ФС і комплексом з НЧЗ зберігалась протягом усього терміну спостереження. Поясненням цього факту може бути відмінність в розмірах гідратованих форм ФС і ФС-наноконкомпозиту, завдяки якій міграція через ендотелій відбувається з різною швидкістю (повільніше — з наноконкомпозитом). Мінімального рівня концентрації в крові ФС досягає вже через 1,5–2 години.

Рис. 2. ілюструє особливості біорозподілу ФС у внутрішніх органах тварин. Печінка, нирки та селезінка характеризуються максимумом накопичення через 1 годину після введення. Акумуляція у шкірі відбувається дещо повільніше та досягає найбільших значень через 1,5–2 години після введення ФС, що пов'язано з особливостями тканини, зокрема додатковим часом транспортування капілярною системою.

На рис. 3 відображено кінетику накопичення ФС карциномою Льюїс, профіль якої подібний до профілів тканин внутрішніх органів. Подібно до печінки, нирок та селезінки, максимальне накопичення ФС в пухлині відбувається протягом 1 години, а потім вже через 30 хви-

лин знижується на 25%. При цьому слід зазначити — результати інших досліджень свідчать, що в абсолютних значеннях вміст ФС в пухлині є більшим за всі органи, що пояснюється, в першу чергу, так званим EPR-ефектом (Enhanced Permeation and Retention): судинна система пухлини є дефектною і характеризується підвищеною проникністю капілярів, а дефіцит лімфатичного дренажу призводить до затримки речовин, які проникли в пухлинну паренхіму [3]. Крім того, добре відома унікальна тропність порфіринових сполук до пухлинної тканини.

Одержані у даному дослідженні результати підсумовуються на рис. 4. Можна констатувати, що максимум накопичення як хлорину е6, так і його комплексу з НЧЗ спостерігається через одну годину після введення препаратів в кров. Це близько корелює з даними інших авторів відносно препаратів хлорину е6 [13] і свідчить про те, що даний ФС швидко накопичується в пухлині і тканинах, однак швидко й виводиться з організму, що слід враховувати при виборі режимів опромінення пухлин. Інтенсивність флуоресценції комплексу ФС з НЧЗ, яка відбиває ступінь його накопичення тканинами організму, достовірно вища порівняно з вільним хлорином е6. Для фармакокінетики обох препаратів характерне швидке падіння інтенсивності флуоресценції у крові, що свідчить про їх активне накопичення тканинами організму. З графіків видно, що вміст вільного хлорину і особливо наноконкомпозиту в пухлині переважає їх вміст в нормальних тканинах мишей.

Висновки

1. Фотосенсибілізатор хлорин е6 та його комплекс із наночастинками золота максимально накопичуються у внутрішніх органах і карциномі Льюїс мишей через 1 годину після введення.
2. Найбільш висока концентрація фотосенсибілізатора зареєстрована в пухлинній тканині.
3. Комплексація хлорину е6 з наночастинками золота сприяє підвищенню акумуляції фотосенсибілізатора у пухлині та внутрішніх органах тварин.

Робота виконана за фінансової підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень, грант №Ф29.4/010.

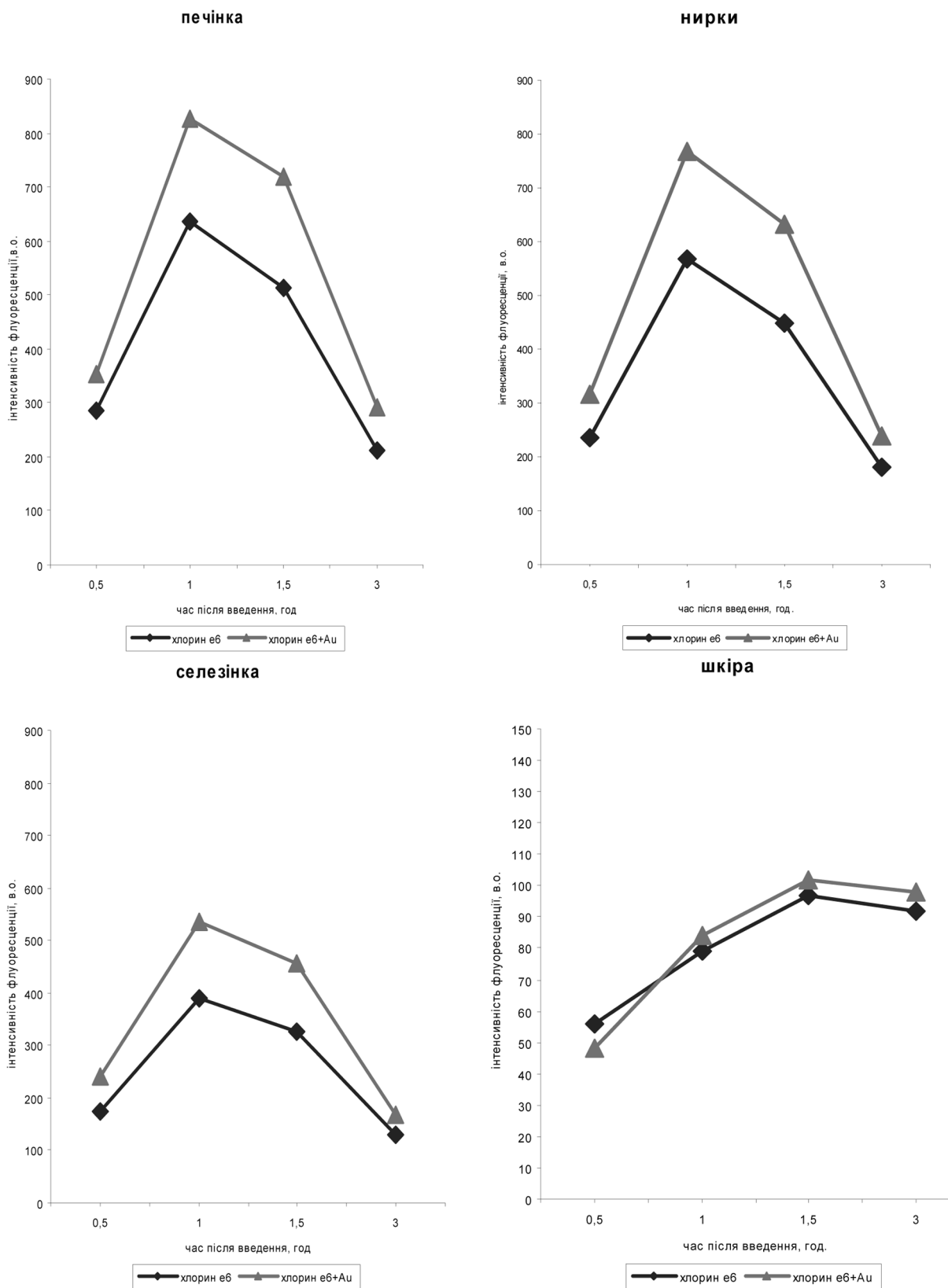


Рис. 2. Динаміка накопичення хлорину еб та його композиту з колоїдним золотом (хлорин еб + Au) у тканинах внутрішніх органів мишей

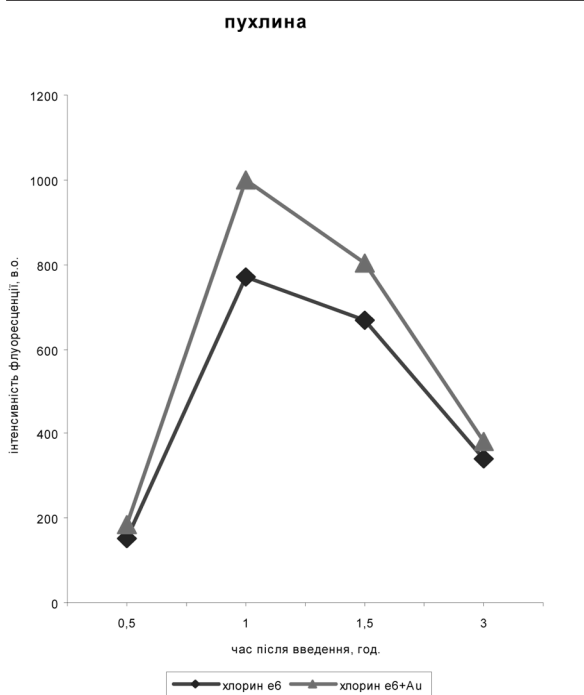


Рис. 3. Динаміка накопичення хлорину е6 та його композиту з колоїдним золотом (хлорин е6 + Au) в пухлині мишей

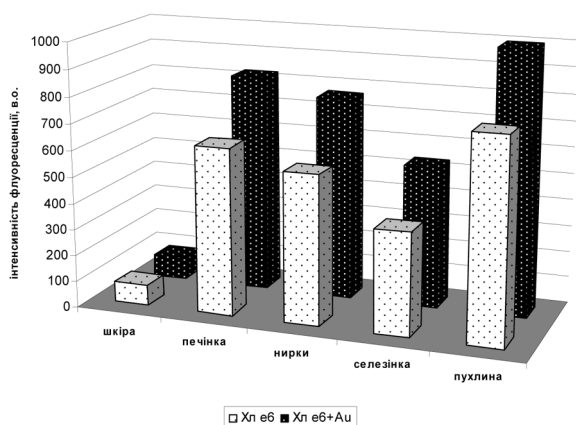


Рис. 4. Порівняння рівнів накопичення ФС внутрішніми органами і пухлиною через 1 год. після введення

Література

1. Куценко В.В. Флуоресцентний аналіз накопичення 5-АЛК — індукованого протопорфірину ІХ у пухлинній та нормальній тканинах мишей / В.В. Куценко, І.В. Прокопенко, О.Ю. Артеменко О.Ю. // Укр. радіол. журнал. — 2006. — №1. — С.38–41.
2. Andrejevic B. S. Time-dependent biodistribution of tetra (m-hydroxyphenyl) chlorine and benzoporphyrin derivative monoacid ring A in the hamster model: comparative fluorescence microscopy study / B. S. Andrejevic, J. P. Ballini, H. van der Bergh // J. Photochem. Photobiol. B. — 2000. — Vol.71. — P. 333–340.

3. Byrne J. D. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics / J. D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas // Adv. Drug Deliv. Rev.— 2008.— Vol.60.— P.1615–1626.
4. Castano A. P. Mechanisms in photodynamic therapy: Part III — photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction / A. P. Castano, T. N. Demidova, M. R. Hamblin // Photodiag. Photodynam. Ther.—2005.—Vol.2.—P.91–106.
5. Cheung R. Correlation of in vivo photosensitizer fluorescence and photodynamic therapy-induced depth of necrosis in a murine tumor model / R. Cheung, M. Solonenko, T. M. Busch // J. Biomed. Optic. — 2005. — Vol.8. — P.248–252.
6. Gamaleia N. F. Photodynamic activity of hematoporphyrin conjugates with gold nanoparticles: experiments in vitro / N. F. Gamaleia, E. D. Shishko, G. A. Dolinsky // Exp. Oncol. — 2010. — Vol.32, №1. — P.44–47.
7. Henderson B. W. How does photodynamic therapy work? / B. W. Henderson, T. J. Dougherty // J. Photochem. Photobiol. B. — 1992. — Vol.55. — P.145–157.
8. Juzeniene A. Biophysical aspects of photodynamic therapy / A. Juzeniene, K. P. Nielsen, J. Moan // J. Envir. Pathol. Toxicol. Oncol. — 2006. — Vol.25, №1–2. — P.7–28.
9. Maldonado-Alvorado E. Efficiency of the photodynamic therapy using gold nanoparticles (np-Au) and PpIX induced and not induced / E. Maldonado-Alvorado, E. Ramon-Gallegos, J. Tanori-Cordova // AIP Conf. Proc. — August 11, 2008. — Vol.1032. — P.295–298.
10. Mukherjee P. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles / P. Mukherjee, R. Bhattacharya, P. Wang // Clin. Cancer Res.— 2005.— Vol.11, №9.— P.3530–3534.
11. O'Connor A. E. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy / A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, A. T. Byrne // Photochem. Photobiol. — 2009. — Vol.85, №5. — P.1053–1074.
12. Ortel B. Advances in photodynamic therapy. A review / B. Ortel, P. Calzavara-Pinton // J. Ital. Dermatol. Venerol. — 2010. — Vol.145, №4. — P.461–475.
13. Shliakhtsin S. V. Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon® (Fotolon®) in intact and tumor-bearing rats / S. V. Shliakhtsin, T. V. Trukhachova, H. A. Isakau, Y. P. Istomin // Photodiag. Photodynam. Ther. — 2009. — Vol.6 (2). — P.97–104.

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ХЛОРИНА Е6
В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ МЫШЕЙ
И ВЛИЯНИЕ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА**

*Прокопенко И. В., Мамчур А. А., Шишко Е. Д., Щербаков А. Б. *, Усатенко А. В. *, Гамалея Н. Ф.
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины;*

**НИИ нанотехнологической индустрии, г. Киев*

С использованием флуоресцентной спектроскопии показано, что фотосенсибилизатор хлорин е6 и его комплекс с наночастицами золота максимально накапливаются во внутренних органах и карциноме Льюис мышей спустя 1 час после введения препарата. Наиболее интенсивно фотосенсибилизатор накапливается в опухолевой ткани. Комплексообразование хлорина е6 с наночастицами золота способствует повышению аккумуляции фотосенсибилизатора в опухоли и внутренних органах.

Ключевые слова: *флуоресцентная спектроскопия, фотосенсибилизатор хлорин е6, наночастицы золота, карцинома Льюис.*

**PHOTOSENSITIZER CHLORINE E6 DISTRIBUTION IN NORMAL AND MALIGNANT
MURINE TISSUES AND ALTERATION OF THE PROCESS WITH GOLD NANOPARTICLES**

*Prokopenko I. V., Mamchur A. A., Shishko E. D., Scherbakov A. B. *, Usatenko A. V. *, Gamaleia N. F.
The R. E. Kavetsky Institute for Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology
of NAS of Ukraine,*

**Scientific and Research Institute of Nanotechnological Industry, Kyiv*

By fluorescence spectroscopy, it was shown that accumulation of the photosensitizer chlorine e6 and its complex with gold nanoparticles in internal organs and Lewis carcinoma of mice reached a maximum one hour after injection of the preparations into animals. The highest levels of photosensitizers content were characteristic for tumor tissues. The chlorine e6 complexation with gold nanoparticles enhanced the photosensitizer accumulation in the tumor and internal organs of mice.

Keywords: *fluorescence spectroscopy, photosensitizer chlorine e6, gold nanoparticles, Lewis carcinoma.*