

ВИВЧЕННЯ РІВНЯ НАКОПИЧЕННЯ ПОРФІРИНІВ ТА ЇХ КОМПЛЕКСІВ З НАНОЧАСТИНКАМИ ЗОЛОТА ПЕВНИХ РОЗМІРНО-ГЕОМЕТРИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ, У НОРМАЛЬНИХ ТА ПУХЛИННИХ ТКАНИНАХ МИШЕЙ

І.В. Прокопенко

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

Методом флуоресцентної спектроскопії показано вибіркоче накопичення фотосенсибілізаторів гематопорфірину і хлорину еб та їх комплексів із наночастинками золота в пухлинах мишей. Виявлена достовірна різниця в акумуляції пухлинами наноконкомплексів різної геометрії – хлорин еб-нанострижні показує вищу селективність та рівень накопичення в пухлині, ніж наносфери.

Ключові слова: гематопорфірин, хлорин еб, фотодинамічна терапія пухлин, флуоресцентна спектроскопія, наночастинки золота.

Вступ

Фотодинамічна терапія пухлин (ФДТ) є новим перспективним підходом до лікування злоякісних новоутворень. Сам термін «фотодинамічна дія» вводиться з метою підкреслити різницю між біологічними фоточутливими реакціями та фізико-хімічними процесами, які відбуваються в емульсіях на фотоплівках [9]. Принцип дії ФДТ ґрунтується на здатності фотосенсибілізаторів (ФС) тією чи іншою мірою селективно накопичуватися в пухлинній тканині. При наступному опроміненні пухлини лазерним світлом з певною довжиною хвилі ФС сприяє утворенню синглетного кисню та вільних радикалів, дія яких веде до руйнування ділянки тканини з підвищеною концентрацією ФС.

Фотодинамічна терапія за своєю суттю є не що інше, як фотохіміотерапія раку. В ряді випадків метод ФДТ вирає в порівнянні з традиційними променевою та хіміотерапією завдяки порівняно високій вибірковості ураження пухлинної тканини, відсутності важких локальних і системних ускладнень та можливості повторення курсу лікувальної процедури. До позитивних факторів слід віднести також можливість поєднання в одній процедурі і лікування, і флуоресцентної діагностики (ФД) [1, 8] позаяк абсолютна більшість ФС є флуоресцентними, їх локалізацію в органах/тканинах нескладно визначати за характерним спектром флуоресценції, індивідуальним для кожного ФС.

Селективність пошкодження пухлин при ФДТ відбувається за рахунок здатності ФС більше аку-

мулюватися та повільніше виводитися з пухлини порівняно з нормальними тканинами. Проте такі процеси забезпечують все ж недостатньо високий рівень вибіркового накопичення фотосенсибілізуючих агентів пухлинними тканинами, оскільки депонування цих сполук відбувається також і в нормальних тканинах, хоча і в меншій мірі. Власне недостатньо висока селективність накопичення спонукала дослідників до пошуку шляхів ефективного цілеспрямованого транспорту ФС до пухлинних тканин.

Ефективність ФДТ значною мірою залежить від концентрації ФС у пухлинних тканинах. З іншого боку, безпечність процедури визначається рівнем ФС у здорових тканинах оточення впродовж опромінення [6]. Таким чином, контроль вибірковості накопичення ФС у тканинах-мішенях, як і характер розподілу в нормальних тканинах, є основними засадами при синтезі нових ФС та оптимізації методик ФДТ.

При всіх перевагах ФДТ має один суттєвий недолік, а саме - слабе проникнення світлового випромінювання вглиб тканини, що обмежує практичне застосування методу ранніми формами раку, пухлинами малого розміру та помірної товщини тощо; в усьому світі найбільш ефективно метод застосовується для лікування поверхневих злоякісних пухлин шкіри та порожнистих органів (легень, стравоходу, сечового міхура), а також доброякісних новоутворень [6, 7, 12]. Відтак всі зусилля дослідників спрямовані на активний пошук шляхів по-

долання або мінімізацію даного недоліку, зокрема синтез і випробування нових ФС та їх комплексів із підвищеним накопиченням у пухлинній тканині, які б забезпечували ефект навіть при низькому рівні світлової енергії, що проникла всередину пухлини. Перспективним напрямом для вирішення проблеми може бути застосування нанотехнологічних підходів, зокрема, створення композитів фотосенсибілізуючих препаратів з наночастинками золота [10, 13]. Конструювання таких комплексів має підвищити гідрофільність порфіринових сенсибілізаторів, які широко застосовуються при ФДТ, а також, беручи до уваги афінність нанорозмірного золота до малігнізованої тканини, полегшити доставку ФС до пухлини. Відомо, що пухлинні клітини акумулюють до 6 разів більше наночастинок золота, ніж нормальні [11]. Таким чином, застосування наночастинок золота в комплексі з ФС виглядає перспективним прийомом для підвищення його накопичення у пухлині, а отже, можна прогнозувати виражений протипухлинний фотодинамічний ефект навіть при невисокому рівні світлової енергії, що досягає злоякісного новоутворення.

Метою даної роботи була порівняльна флуоресцентна оцінка накопичення фотосенсибілізаторів гематопорфірину, хлорину еб та їх комплексів із наночастинками золота різної форми у тканинах мишей.

Матеріали і методи

У представленому дослідженні нами використано ФС порфіринового ряду хлорин еб у вигляді його офіційної форми — препарату фотолон (молекулярний комплекс хлорину еб та полівінілпіролідону (ПВП)), а також його комплекс з нанорозмірним колоїдним золотом. Вибір колоїдного золота для трансферу молекул ФС в пухлинну тканину обумовлено вже згаданою вище пухлінотропністю золота [12]. Для кількісної оцінки ролі нанорозмірного золота в складі комплексів нами було проведено серію експериментів, де аналізувався вплив наночастинок золота на акумуляцію ФС в тканинах мишей. Фотодинамічна активність створених наноконкомпозитів порівнювалась із такою раніше синтезованих нами композитів з нанозолотом іншого фотосенсибілізатора — гематопорфірину.

Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до прийнятих міжнародних правил проведення робіт з лабораторними тваринами. Для експериментів використовували мишей лінії C57BL/6 розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.С.Кавецького НАН України з перещепленою карциномою Льюїс. Перещеплення пухлин тваринам проводили внутрішньом'язево за загально-

прийнятою в експериментальній онкології схемою.

Досліди проводили на стадії добре сформованої пухлини (діаметр ~ 1 см) на чотирьох групах тварин по три миші в кожній (середня вага - 20г). Хлорин еб/або ГП у концентрації 0,05 мг/миша або наноконкомпозит з колоїдним золотом в масовому співвідношенні 1:10 до розчину ФС, вводили тваринам у хвостову вену в об'ємі 0,1 мл. Час максимального накопичення сенсибілізатора в пухлинах, як було встановлено у попередніх роботах [5], становив 1 год.

Для кількісної оцінки накопичення через годину після введення ФС тварин забивали шляхом цервікальної дислокації і видаляли пухлину, печінку, нирки, селезінку, шкіру, а також брали кров. З крові мишей виділяли сироватку. Видалені органи двічі промивали у розчині фосфатного буферу, рН 7,2, висушували на фільтрувальному папері та зважували. Потім їх заморожували, гомогенізували механічним способом у рідкому азоті і переносили в метанольно-водний розчин (3:1), продовжуючи подрібнення тканин. Ступінь гомогенізації контролювали під мікроскопом. Суспендовані тканини центрифугували 10 хв при 1000g (2500 об/хв), отримані супернатанти ретельно відбирали для подальшого використання [4].

Для оцінки накопичення ФС у нормальних та пухлинних тканинах мишей (карцинома Льюїс) було проведено флуоресцентно-спектроскопічні дослідження (використовувався спектрофлуориметр Nanodrop-3300 (США)) акумуляції порфіринових сполук, комплексованих із наночастинками золота певних розмірів та форми, та була дана порівняльна оцінка їх фотодинамічної ефективності. Нанорозмірне золото використовували у наступних конфігураціях – циліндричної форми діаметром 25 нм та довжиною 62 нм, стабілізоване цетилтриметиламоній-бромідом СТАВ (Sigma-Aldrich, США), і сферичної форми діаметром 15-45 нм, стабілізоване полівінілпіролідом (ПВП) [10]. Для аналізу використовували пік флуоресценції хлорину еб (довжина хвилі 660-670 нм). Вміст гематопорфірину визначали за його специфічною емісією на хвилі 595 нм, ініційованою хвилею збудження 550 нм. Результати досліджень піддавались статистичній обробці з використанням загальноприйнятих критеріїв різниці між дослідними групами.

Результати та їх обговорення

Одним із ряду ФС, що широко використовуються в практиці ФДТ, є гематопорфірин (ГП). Відомо, що модифікації ГП у вигляді різноманітних сполук - кон'югатів [3], комплексів різної природи - накопичуються в пухлинах у значно більшій кіль-

кості порівняно з вихідним фотосенсибілізатором. Використання наночастинок золота в колоїдній формі у складі комплексу із ГП показало свою високу протипухлинну ефективність на ряді культур трансформованих клітин [2]. В даному дослідженні проводилась оцінка накопичення комплексу ГП з колоїдним нанорозмірним золотом сферичної форми (діаметр наносфер 15-45 нм) у тканинах мишей. Для порівняння брали чистий препарат ГП.

На рис. 1 представлено відносний розподіл фотосенсибілізаторів у тканинах; за 100% прийма-

високий рівень депонування комплексу в печінці (113%), що вказує напевне на дію ретикуло-ендотеліального комплексу.

В наступних дослідженнях фотодинамічна дія комплексу Au з гематопорфірином порівнювалась із впливом іншого розповсюдженого фотосенсибілізатору – хлорину еб та його комплексу із наночастинами золота. Хлорин еб є дуже активним фотосенсибілізатором, і його перевагою є те, що він досить швидко, порівняно з ГП, виводиться із організму, тому застосування хлорину еб не викликає побічних ефектів, характерних для порфіринів. В комплексах із хлорином використовувались наночастинок двох геометричних форм – сферичної (діаметр наносфер 15-45 нм) та циліндричної (25-60 нм), так як відомо, що біологічна активність препаратів на основі наночастинок значною мірою залежить від кількості розташованих на поверхні атомів, а отже, і від розміру та форми самих частинок [2].

Відразу слід зазначити, що накопичення хлорина еб у шкірі не детектувалось. Акумуляція фотосенсибілізатору залежить від форми наночастинок, які входять до комплексу. Комплекс хлорина еб з наноциліндрами накопичується переважно в пухлині та в селезінці. У випадку з наносферами найбільше фотосенсибілізатору міститься в печінці, в пухлині ж його достовірно менше. Одним із вірогідних пояснень можуть бути особливості приготування розчинів наночастинок, а саме: наноциліндри стабілізовано у водному розчині катіонним детергентом ЦТАБ (цетилтриметиламоній бромід)

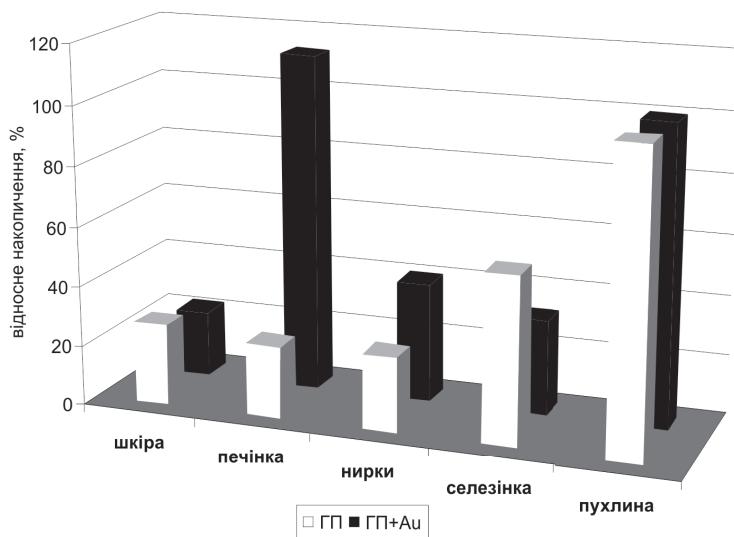


Рис. 1. Порівняння рівнів накопичення гематопорфірину та його комплексу із нанорозмірним золотом

ли накопичення в пухлинній тканині. Комплекс ГП-Au демонструє дещо вищу селективність в деяких органах - накопичення у шкірі, нирках та селезінці складає 22, 40 та 32% відповідно, при тому що акумуляція чистого ГП в тих самих органах становить 27, 25 та 56%. Слід зазначити

високий рівень депонування комплексу в печінці (113%), що вказує напевне на дію ретикуло-ендотеліального комплексу.

Табл. 1

Накопичення комплексу хлорина еб з наночастинками золота циліндричної форми у тканинах мишей з карциномою Льюїс

Тканина	Маса тканини (г)	Інтенсивність флуоресценції (у.о.)	Питома І.Ф. (у.о./г.)	Середня питома І.Ф.(у.о./г.)	Відносне накопичення (пухл./тк.)
Печінка	0,68	352	517	657	3,6
	0,59	311	527		
	0,72	668	928		
Нирки	0,22	167	759	619	3,8
	0,18	64	356		
	0,28	208	743		
Селезінка	0,17	389	2288	2193	1,1
	0,12	223	1858		
	0,18	438	2433		
Пухлина	0,65	1386	2132	2379	-
	0,8	1847	2309		
	1,33	3586	2696		

Табл.2

Накопичення комплексу хлорина еб з наночастинками золота сферичної форми у тканинах мишей з карциномою Льюїс

Тканина	Маса (г)	Інтенсивність флуоресценції (у.о.)	Питома І.Ф. (у.о./г.)	Середня питома І.Ф. (у.о./г.)
Печінка	0,94	479	510	507
	0,73	364	499	
	0,75	384	512	
Нирки	0,24	49	204	212
	0,17	38	224	
	0,2	42	210	
Селезінка	0,22	61	277	291
	0,17	48	282	
	0,14	44	314	
Пухлина	0,97	193	199	197
	0,58	119	205	
	0,68	127	188	

незначної концентрації, тоді як наночастинки сферичної форми стабілізуються ПВП (полівінілпіролідон) – полімером, який розташовується на

80%. Максимальною є акумуляція препаратів в пухлині. З рисунку видно, що вміст вільного хлорину еб і особливо наноконцентрату в пухлині достовірно переважає їх вміст в нормальних тканинах мишей.

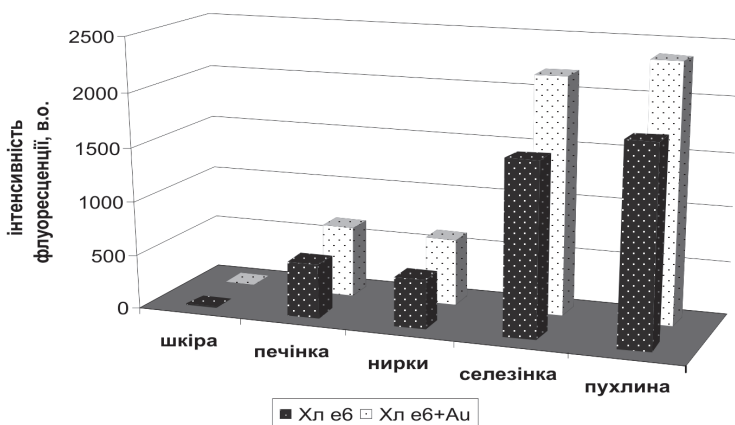


Рис. 2. Порівняння рівнів накопичення в тканинах хлорину еб та його комплексу із золотими наночастинками

поверхні частинки. В силу цього при попаданні до кров'яного руслу комплекс ПВП-Аu відразу піддається атакам макрофагів та накопичується великою мірою в печінці.

Наступним етапом експерименту було порівняння рівнів накопичення чистого хлорину еб із його наноконцентратом.

На рис. 2 відображено розподіл хлорину еб та його комплексу з золотими наночастинками у тканинах. Накопичення відсутнє у шкірі, поступово зростає в селезінці, нирках і печінці, де досягає

високу селективність щодо пухлинної тканини та набагато вищий рівень накопичення в них ФС.

Таким чином, показано високий рівень накопичення композитів ФС з колоїдним золотом в пухлинах та печінці мишей. Високий рівень накопичення наноконцентратів в печінці пояснюється, очевидно, недостатнім захистом їх від поглинання елементами ретикуло-ендотеліальної системи організму.

Висновки

За результатами досліджень встановлено наступне:

- різниці в рівні накопичення ГП і ГП-нанозолото в пухлинній тканині не виявлено;
- на відміну від ГП, в шкірі хлорин еб не накопичується і фототоксичність не демонструє;
- рівні накопичення та біорозподіл комплексів хлорину еб із нанорозмірним золотом різної форми у тканинах відрізняються : наночастинки циліндричної форми демонструють високу селективність щодо пухлинної тканини та набагато вищий рівень накопичення в них ФС.

Література

1. Гамалія М.Ф. Створення та експериментальна апробація нового антитіло-кон'югованого сенсibiliзатора для фотодинамічної терапії пухлин/ М.Ф.Гамалія, І.О.Лісняк, Н.Л.Новиченко та ін.// Фотобіологія та фотомедицина.-2007.- Т.V, №1.- С.76-82.
2. Гамалія М.Ф.Підвищення ефективності фото-

динамічної терапії пухлин шляхом застосування колоїдного золота/ Гамалія М.Ф., Лісняк І.О., Прокопенко І.В. та ін.// Фотобіологія та фотомедицина.-2010.-Т. VII.-№1-2.-С.67-75.

3. Гамалія М.Ф.Визначення розподілу імунокон'югату гематопорфірину в тканинах мишей та аналіз добових коливань його накопичення пухлинами/ Гамалія М.Ф., Прокопенко І.В., Лісняк І.О. та ін.// Фотобіологія та фотомедицина.-2010.-Т.VII.-№1-2.-С.76-79.

4. Куценко В.В. Флуоресцентний аналіз накопичення 5- АЛК – індукованого протопорфірину ІХ у пухлинній та нормальній тканинах мишей/ Куценко В.В., Прокопенко І.В., Артеменко О.Ю. та ін. // Укр. радіол. журнал. - 2006.-№1.- С.38-41.

5. Прокопенко І.В. Розподіл фотосенсибілізатора хлорина еб в нормальних і пухлинних тканинах мишей та вплив на цей процес наночастинок золота/ Прокопенко І.В., Мамчур А.А., Шишко Є.Д. та ін.// Фотобіологія та фотомедицина.-2010.-Т.VII.-№3-4.-С.46-51.

6. Русаков И.Г. Хирургическое лечение, химио- и иммунотерапия больных поверхностным раком мочевого пузыря/ Русаков И.Г., Быстров А.А.// Практическая онкология.- 2003.- Т.4.- № 4.- С.214—224.

7. Соколов В.В. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей основных локализаций с препаратами Фотогем и Фотосенс (результаты 3-х летних

наблюдений)/ Соколов В.В., Странадко Е.Ф., Жаркова Н.Н., Якубовская Р.И. // Вопросы онкологии.-1995.-Т.41.- № 2.-С.134-138.

8. Cheung R. Correlation of in vivo photosensitizer fluorescence and photodynamic therapy-induced depth of necrosis in a murine tumor model / Cheung R., Solonenko M., Busch T.M.// J Biomed Optic- 2005.-Vol. 8.-P. 248-252.

9. Dougherty T.J. Photodynamic therapy/ T.J. Dougherty, C.J.Gomer, B.W. Henderson// J.Natl.Cancer. Inst-1998.-Vol.90.-P.889-905.

10. 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.

11. 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.

12. Mukherjee P. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles / P. Mukherjee, R. Bhattacharya, P. Wang// Clin. Cancer Res. – 2005. – 11, No.9. –P.3530 - 3534.

13. Ortel B. Advances in photodynamic therapy. A review/ B. Ortel, P. Calzavara- Pinton// J Ital Dermatol Venereol-2010.-Vol.145.-№4.- P.461-475.

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ НАКОПЛЕНИЯ ПОРФИРИНОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА ОПРЕДЕЛЕННЫХ РАЗМЕРНО-ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НОРМАЛЬНЫМИ И ОПУХОЛЕВЫМИ ТКАНЯМИ МЫШЕЙ

И.В.Прокопенко

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е.Кавецкого НАН Украины, ул. Васильковская, 45, г. Киев, 03022, Украина, тел.: +38(044)259-01-67;

Методом флуоресцентной спектроскопии зарегистрировано избирательное накопление фотосенсибилизаторов гематопорфирина и хлорина еб, а также их комплексов с наночастицами золота, в опухолях мышцей. Выявлена достоверная разница в аккумуляции опухолями наноконплексов различной геометрии – хлорин еб с наностержнями показывает селективность и уровень накопления в опухоли выше, нежели с наносферами.

Ключевые слова: гематопорфирин, хлорин еб, фотодинамическая терапия опухолей, флуоресцентная спектроскопия, наночастицы золота.

THE STUDY OF THE LEVEL OF ACCUMULATION OF PORPHYRINES AND THEIR COMPLEXES WITH GOLD NANOPARTICLES, DEFINING THE DIMENSION OF GEOMETRICAL PARAMETERS OF NORMAL AND TUMOR MURINE TISSUES

I.V. Prokopenko

The R.E. Kavetsky Institute for Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Vasilkovskaya Str., 4, Kyiv, 03022, Ukraine

By fluorecence spectroscopy reported selective accumulation of photosensitizers hematoporphyrin and chlorine e6, and their complexes with gold nanoparticles in murine tumors. It was shown a significant difference in tumor accumulation nanocomplexes various geometry - chlorine e6 with nanorods shows selectivity and level of accumulation in the tumor is higher than with the nanospheres.

Keywords: hematoporphyrine, chlorine e6, photodynamic therapy of tumors, fluorecence spectroscopy, gold nanoparticle.