

ФОТОДИНАМІЧНА АКТИВНІСТЬ СЕНСИБІЛІЗАТОРА ДРУГОГО ПОКОЛІННЯ ФОТОЛОНУ (ХЛОРИНУ Е6) ТА ЙОГО ЗОЛОТОГО НАНОКОМПОЗИТУ: ДОСЛІДИ IN VITRO ТА IN VIVO

М.Ф. Гамалія, Є.Д. Шишко, І.О. Штонь, В.В. Холін**, О.Б. Щербаков*, О.В. Усатенко*

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
імені Р.Є. Кавецького НАН України
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022, Україна,
тел.: +38(044)258-16-58, e-mail: gamaleia@onconet.kiev.ua
*Інститут нанотехнологічної індустрії, 03055, Україна, м. Київ
** ПМВП «Фотоніка Плюс» 18023, Україна, м. Черкаси

У роботі вперше проведено порівняльне дослідження протипухлинної фотодинамічної активності хлоринового сенсibilізатора Фотолону та його нанокмполізу з колоїдним золотом. На клітинних лініях людини (Т-лімфоцитарного лейкозу МТ-4 та В-лімфоцитарної лімфоми Беркіта Natalwa) встановлена інтенсивна фотодинамічна дія Фотолону і подальше значне посилення її при комплексуванні фотосенсibilізатора з наночастинками золота. Нанокмполізу Фотолону із золотом здатний призводити також до фотодеструкції нормальних лімфоцитів людини, виділених з крові здорових донорів, але в суттєво меншій мірі, ніж у випадку трансформованих лімфоцитарних клітин. Значна протипухлинна фотодинамічна активність Фотолону і можливість додаткового підвищення її шляхом застосування нанокмполізу Фотолон-золото підтверджена у дослідженнях по лікуванню мишей з легеневою карциномою Льюїс, де отримано подовження тривалості життя тварин у порівнянні з контрольною групою в два та чотири з половиною рази, відповідно. Зроблено висновок про перспективність використання Фотолону при фотодинамічній терапії пухлин, особливо в формі композиту з нанорозмірним золотом.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, колоїдне золото, хлорин е6, Фотолон, синглетний кисень, клітинні лінії трансформованих лімфоцитів людини, карцинома мишей Льюїс.

Вступ

Як відомо, фотодинамічна терапія (ФДТ) є відносно новим малотравматичним методом лікування злоякісних новоутворень, що швидко розвивається і з успіхом застосовується в передових країнах світу. Цей метод ґрунтується на введенні в організм з пухлиною нетоксичного фарбника-фотосенсibilізатора (ФС), який досить швидко виводиться із нормальних тканин і вибірково затримується в пухлинній тканині. При наступному опроміненні пухлини лазерним світлом відповідної довжини хвилі в присутності молекулярного кисню утворюються його активні форми, переважно синглетний кисень та вільні радикали, які і пошкоджують пухлинні клітини [2]. Головним недоліком методу є слабе проникнення світла видимого діапазону в біологічні тканини, тому фотодинамічну терапію застосовують головним чином при лікуванні раних форм пухлин, при їх невеликих розмірах.

Для збільшення накопичення ФС у пухлині, що дозволило б зруйнувати пухлину навіть при низькій дозі проникаючого в неї світла і таким чином підвищило ефективність ФДТ, ми застосували нанотехнологічні підходи. Було створено композити ФС хлорину е6 та його фармакологічної форми – препарату Фотолон, який представляє собою комплекс хлорину е6 та полівінілпіролідону, з нанорозмірним колоїдним золотом. Вибір колоїдного золота для транспортування молекул ФС в пухлинну тканину обумовлено відомою вже давно пухлинотропністю золота [4].

Хлорини – це зелені пігменти, широко розповсюджені в природі. Хлорином є, наприклад, хлорофіл, рослинний пігмент, що відіграє основну роль у фотосинтезі. У хімічному відношенні хлорини – це відновлені форми порфіринів. Порфірини є природними метаболітами клітин, але одним з головних обмежень у використанні порфіринів в якості фотосенсibilізаторів є їх по-

вільне виведення з нормальних тканин і тривала шкірна фототоксичність. Крім того, порфірини, як правило, поглинають червоне світло з довжиною хвилі не більше 630 нм, що слабо проникає в біологічні тканини. Відновлення пірольних подвійних зв'язків на периферії порфіринової молекули призводить до утворення хлорину, що має смугу поглинання в області 650-670 нм, де світло проникає в тканини значно глибше, ніж у випадку застосування порфіринів.

Особливий інтерес серед хлоринів представляє хлорин еб, який входить до складу Фотолону. Він має природне походження – його отримують із зелених водоростей. Хлорин еб є дуже активним ФС. Його позитивною рисою є також те, що він швидко виводиться з організму, тому застосування хлорину еб не викликає побічних ефектів, характерних для порфіринів. В складі Фотолону хлорин еб скомплексовано з полівінілпіролідом (ПВП) – біосумісним гідрофільним полімером, який надає водорозчинності гідрофобному хлорину еб. Скомплексований з ПВП хлорин еб накопичується в пухлині завдяки підвищеній проникності дефектних пухлинних судин та послабленому лімфодренажу в ній. У використаному нами офіційному препараті Фотолон («Белмедпрепараты», Беларусь) застосовано ПВП та хлорин еб у масовому співвідношенні 1 : 1.

У представленій роботі протипухлинну фотодинамічну активність Фотолону та його нанокompatитів з колоїдним золотом досліджено в експериментах *in vitro* – на клітинних лініях трансформованих лімфоцитів людини, а також *in vivo* – на мишах з перещепленими пухлинами.

Матеріали і методи

Для отримання нанокompatитного ФС використовували Фотолон (Белмедпрепараты, Беларусь), додаючи колоїдне золото в масовому співвідношенні 1:10. В якості стабілізатора колоїдного стану вихідні розчини нанокompatитів містили 50 мкг/мл полівінілпіролідону. Застосовані в роботі наночастинки золота сферичної форми мали діаметр 15 нм. В якості джерела світла в досліджах використано випромінювання напівпровідникового лазера («Фотоніка Плюс», Черкаси) з довжиною хвилі $\lambda=658$ нм. Щільність потужності опромінення в експериментах *in vitro* варіювала в межах 0,6-1,2 мВт/см², в досліджах *in vivo* вона складала 50 мВт/см². Доза опромінення в клітинних експериментах – 1 Дж/см², при опроміненні пухлин мишей – 150 Дж/см².

Для визначення співвідношення у механізмі фотодинамічної дії між фотоокислювальними про-

цесами I і II типу (утворення вільних радикалів та синглетного кисню, відповідно) застосовували «пастку», що вибірково інгібує реакції за участю синглетного кисню – 1-5 мМ азид натрію. Отримані результати обчислювали, використовуючи методи варіаційної статистики, за допомогою програмного середовища Matlab 7.0 і представляли в графічному вигляді через інтерфейс Excel.

При проведенні експериментів *in vitro* фотодинамічну активність синтезованих нанокompatитів досліджено на суспензійних культурах трансформованих лімфоцитів людини (Т-клітинній лінії МТ-4, отриманій з Т-лімфоцитарного лейкозу, та В-клітинній лінії Namalwa, отриманій з лімфоми Беркіта). Клітини вирощували на живильному середовищі RPMI-1640 з 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби при 37°C в атмосфері з 5% CO₂. Лімфоцити відмивали від живильного середовища, переносили в фізіологічний розчин Хенкса рН=7,4 при щільності суспензії 2 x 10⁶ клітин/мл та інкубували з різними концентраціями Фотолону або його композиту з колоїдним золотом 1,5 год при 37°C. Потім клітини відмивали від непоглинутого ФС і опромінювали в розчині Хенкса без фенолового червоного лазерним світлом. Після цього клітини переносили в живильне середовище та інкубували 18 – 20 год при 37°C для розвитку в них процесів апоптозу чи некрозу. Життєздатність клітин визначали в тесті з трипановим синім.

У досліджах *in vivo* протипухлинна фотодинамічна активність нанокompatитів досліджувалась на мишах з перещепленою в подушечку лапки метастазуючою пухлиною – карциномою легень Льюїс. Ця модель рекомендована для оцінки протипухлинної дії антибластомних препаратів у Методичних рекомендаціях Державного фармакологічного центру МОЗ України [1]. Пухлинні клітини вводили з розрахунку 1 x 10⁶ клітин/мишу. Фотолон та його нанокompatит вводили піддослідним тваринам внутрішньосудинно та внутрішньопухлинно за 1 годину до опромінення. Фотолон застосовували в дозі 0,2 мг на мишу, нанокompatит містив еквівалентну кількість Фотолону та 20 мкг нанорозмірного золота.

Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до прийнятих міжнародних правил проведення робіт з лабораторними тваринами.

Результати та їх обговорення

Дослідження фотодинамічної активності Фотолону та його композитів з колоїдним золотом в експериментах *in vitro*. Фотодинаміч-

ну активність композитів Фотолону із золотими наночастинками у порівнянні з активністю вільного Фотолону досліджено на трансформованих лімфоцитах людини двох клітинних ліній:

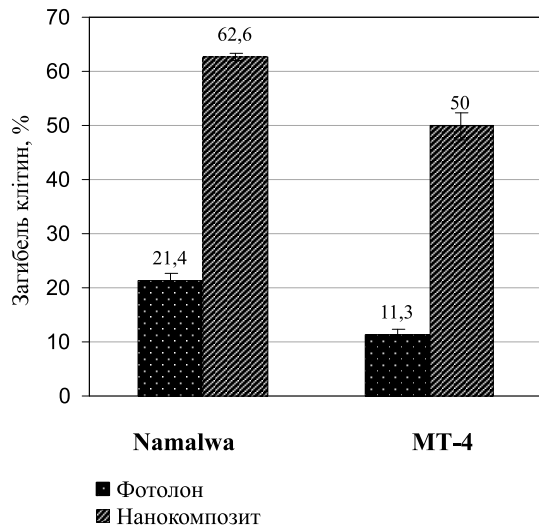


Рис. 1. Фотодинамічна активність Фотолону (0,5 мкг/мл по хлорину е6) та його нанокомпозиту (вміст хлорину е6 0,5 мкг/мл, золота 10 мкг/мл). Опромінення з $\lambda = 658$ нм, дозою 1 Дж/см²

В-клітинної лінії Namalwa та Т-клітинної лінії MT-4.

Створені на основі Фотолону композити, містили різну кількість хлорину е6 (0,1 – 1,0 мкг/мл) та нанозолота (1,0 – 10,0 мкг/мл). Хлорин е6 є набагато більш активним фотосенсибілізатором, ніж досліджений нами раніше гематопорфірин (ГП) [3]. Якщо при роботі з ГП та його нанокомпозитами ми застосовували дозу лазерного світла 50 Дж/см², то в експериментах з Фотолоном та його композитами – лише 1 Дж/см². У досліджах на клітинних лініях трансформованих лімфоцитів людини показано, що комплексування Фотолону з колоїдним золотом закономірно підвищує фотодинамічну активність Фотолону. На рис. 1 наведено результати експерименту, в якому використано Фотолон з вмістом хлорину е6 0,5 мкг/мл та нанокомпозит з такою ж концентрацією хлорину е6 і вмістом золота 10 мкг/мл. Такий композит підвищував загибель клітин лінії Namalwa після їх опромінення червоним лазерним світлом в 3 рази, а клітин лінії MT-4 – в 4,5 рази.

Порівняльні експерименти, проведені на нормальних лімфоцитах людини, виділених з крові здорових донорів, дозволили встановити, що ці клітини також чутливі до фотодинамічного впливу з нанокомпозитами, але в значно меншій мірі, ніж трансформовані клітини (рис. 2).

Таким чином, в експериментах *in vitro* на клітинних лініях трансформованих лімфоцитів людини показано, що комплексування фотосенсибілізатора Фотолону (хлорину е6) із золотими наночастинками суттєво підвищує його фотодинамічну активність.

При фотодинамічній дії розвиваються фотореакції двох типів: реакції з утворенням синглетного кисню, коли збуджена молекула ФС взаємодіє з вільним киснем, та фотореакції з утворенням вільних радикалів. Продукти фотореакцій обох типів пошкоджують опромінені клітини та викликають їх загибель. Нашим наступним завданням було з'ясувати внесок фотореакцій кожного з цих типів у пошкодження клітин при фотодинамічній дії з нанокомпозитом, порівняно з вільним Фотолоном. Для цього ми застосували пастку синглетного кисню – азид натрію. При опроміненні в його присутності загибель клітин лінії MT-4 знижувалась на 85% у випадку вільного Фотолону та на 55% – при використанні нанокомпозиту (рис. 3). Це свідчить на користь того, що у пошкодженні клітин в обох випадках велику роль відіграє генерація синглетного кисню.

Дослідження протипухлинної фотодинамічної активності в досліджах *in vivo*. Досліджено ефективність фотодинамічної терапії із

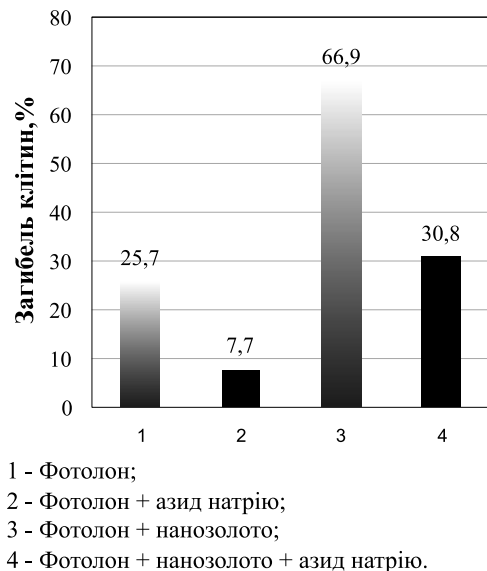


Рис. 2. Фотодинамічне пошкодження нормальних лімфоцитів людини Фотолоном (0,5 мкг/мл по хлорину е6) та його нанокомпозитом (вміст хлорину е6 0,5 мкг/мл, золота 10 мкг/мл). Опромінення з $\lambda = 658$ нм, дозою 1 Дж/см²

застосуванням Фотолону та його композиту з колоїдним золотом. В досліджах використані миші лінії C57Bl/6 з перещепленою в подушечку лапки

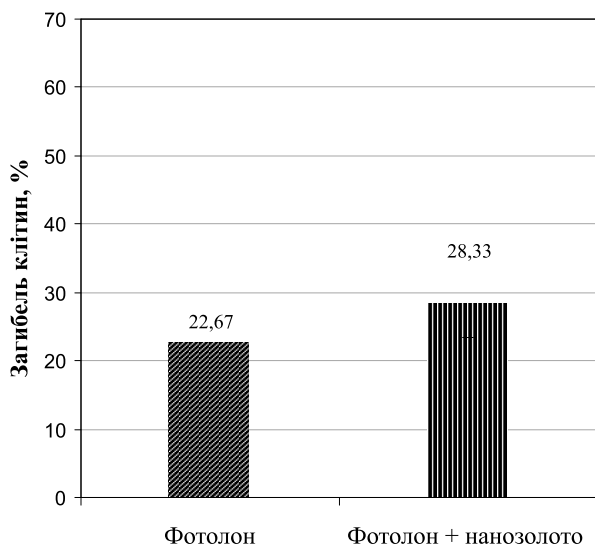


Рис. 3. Вплив азиду натрію (5 мМ) на фотодинамічну активність Фотолону (0,5 мкг/мл по хлорину е6) та його наноконкомпозиту з колоїдним золотом (вміст хлорину е6 0,5 мкг/мл, золота – 10 мкг/мл). Клітинна лінія МТ-4, $\lambda = 658$ нм, доза опромінення 1 Дж/см²

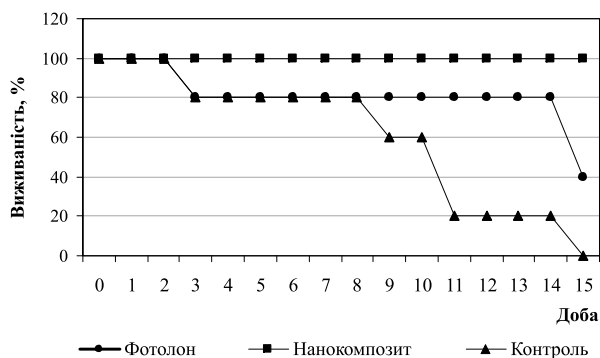


Рис. 4. Динаміка загибелі мишей з перещепленою карциною Льюїс при фотодинамічній терапії з вільним Фотолоном та його наноконкомпозитом ($\lambda=658$ нм, щільність потужності 50 мВт/см², доза опромінення 150 Дж/см²)

карциною Льюїс з наступним опроміненням пухлини лазерним світлом з довжиною хвилі 658 нм. Результати проведеної фотодинамічної терапії представлені на рис. 4 та 5.

З рисунків видно, що на добу, коли загинула остання миша контрольної групи, всі тварини, яких лікували з введенням наноконкомпозиту, були живі. В групі мишей, яким фотодинамічна терапія проводилась з введенням вільного Фотолону,

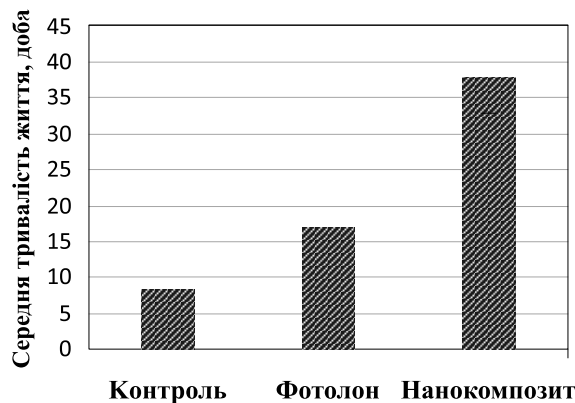


Рис. 5. Середня тривалість життя мишей з карциною Льюїс після фотодинамічної терапії з Фотолоном та наноконкомпозитом

ну, на цю добу живими залишалися 40% тварин. Середня тривалість життя мишей, що отримали ФДТ з наноконкомпозитом, в 4,5 рази перевищила середню тривалість життя тварин контрольної (нелікованої) групи і в 2 рази — середню тривалість життя мишей, яким була проведена фотодинамічна терапія з вільним Фотолоном.

Висновки

Таким чином, у паралельних дослідженнях *in vitro* та *in vivo* продемонстрована можливість підвищення протипухлинної фотодинамічної активності фотосенсибілізатора Фотолону шляхом комплексування його з нанорозмірним золотом. Шляхом застосування колоїдного золота для доставки в пухлину більшої кількості молекул фотосенсибілізатора було досягнуто значне покращення ефективності ФДТ мишей з перещепленою карциною Льюїс.

Література

1. Доклінічне дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. – К.: Авіцена, 2001. – С.361-370.
2. Celli J.P. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring and optimization / Celli J.P., Spring B.Q., Rizvi I. et al. // Chem. Rev. – 2010. – Vol.11, №5. – P.2795-2838.
3. Gamaleia N.F. Activity of hematoporphyrin conjugates with gold nanoparticles: experiments *in vitro* / N.F. Gamaleia, G.A. Dolinsky, E.D. Shishko et al. // Exp. Oncol. — 2010. — Vol.32, №1. — P.44-47.
4. Mukherjee P., Bhattacharya R., Wang P., Wang L., Basu S., Nagy J.A., Atala A., Mukhopadhyay D. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles / Mukherjee P., Bhattacharya R., Wang P. et al. // Clin. Cancer Res. – 2005. – Vol.11, №9. – P.3530-3534.

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЕНСИБИЛИЗАТОРА ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ
ФОТОЛОНА (ХЛОРИНА Е6) И ЕГО ЗОЛОТОГО НАНОКОМПЗИТА:
ИССЛЕДОВАНИЯ IN VITRO И IN VIVO**

*Н.Ф. Гамалея, Е.Д. Шишко, И.А. Штонь, В.В. Холин **, А.Б. Щербаков *, А.В. Усатенко **

*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
имени Р.Е.Кавецкого НАН Украины*

*ул. Васильковская, 45, г. Киев, 03022, Украина,
тел.: +38(044)258-16-58, e-mail: gamaleia@onconet.kiev.ua*

**Институт нанотехнологической индустрии, 03055, Украина, г. Киев*

*** ЧМПП «Фотоника Плюс» 18023, Украина, г. Черкассы*

В работе впервые проведено сравнительное исследование противоопухолевой фотодинамической активности хлоринового сенсibilизатора Фотолон и его нанокмпозита с коллоидным золотом. На клеточных линиях человека (Т-лимфоцитарного лейкоза МТ-4 и В-лимфоцитарной лимфомы Беркитта Natalwa) установлена интенсивная фотодинамическая активность Фотолон и дальнейшее значительное усиление ее при комплексировании фотосенсibilизатора с наночастицами золота. Нанокмпозит Фотолон с золотом способен приводить также к фотодеструкции нормальных лимфоцитов человека, выделенных из крови здоровых доноров, но в существенно меньшей степени, чем в случае трансформированных лимфоцитарных клеток. Значительная противоопухолевая фотодинамическая активность Фотолон и возможность дополнительного повышения ее путем применения нанокмпозита Фотолон-золото подтверждена в исследованиях по лечению мышей с легочной карциномой Льюис, в которых получено увеличение продолжительности жизни животных по сравнению с контрольной группой в два и четыре с половиной раза, соответственно. Сделан вывод о перспективности использования Фотолон при фотодинамической терапии опухолей, особенно в форме кмпозита с наноразмерным золотом.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, коллоидное золото, хлорин е6, Фотолон, синглетный кислород, клеточные линии трансформированных лимфоцитов человека, карцинома мышей Льюис.

**PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF SECOND-GENERATION PHOTOSENSITIZER FOTOLON
(CHLORIN E6) AND ITS GOLDEN NANOCOMPOSITE:
EXPERIMENTS IN VITRO AND IN VIVO**

*N.F. Gamaleia, E.D. Shishko, I. O. Shton, V.V. Kholin**, O.B. Shcherbakov*, O.V. Usatenko**

*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine
45 Vasilkivska str., Kiev, 03022, Ukraine,*

tel: +38(044)258-16-58, e-mail: gamaleia@onconet.kiev.ua

**Research Institute for Nanotechnological Industry, 03055, Ukraine, Kyiv*

*** "Photonika Plus", 18023, Ukraine, Cherkassy*

In the paper, for the first time a comparative study of antitumor photodynamic activity of chlorin sensitizer Fotolon and its nanocomposite with colloid gold is carried out. On the human cell lines (T-lymphocyte leukemia MT-4 and B-lymphocyte Burkitt's lymphoma Natalwa), an intensive photodynamic effect of Fotolon and its further considerable enhancement under a complex-formation of the photosensitizer with golden nanoparticles are demonstrated. Nanocomposite Fotolon-gold induces also the photodestruction of normal lymphocytes, isolated from the blood of healthy donors, but not so pronounce as with transformed lymphocytic cells. The considerable antitumor photodynamic efficiency of Fotolon and a feasibility of its additional augmentation using the nanocomposite Fotolon-gold were confirmed in experiments with a therapy of murine lung Lewis carcinoma in which the prolongation of animals life by 2 and 4.5 times respectively was attained, in comparison with a control group. In conclusion, a promising perspective of Fotolon applications for photodynamic therapy of tumors, especially in a form of its composite with the nanosized gold, is stated.

Keywords: photodynamic therapy, colloidal gold, chlorin e6, Photolon, singlet oxygen, transformed human lymphocyte cell lines, murine lung Lewis carcinoma.