

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО ТЕТРААЗАХЛОРИНА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

В.И. Иванова-Радкевич, Е.А. Мачинская

ФГУП «ГНЦ «Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей», г. Москва

Резюме

В работе приведены результаты исследования фотодинамической активности нового производного класса тетраазахлоринов – тетраметилтрибензотетраазахлорина, синтезированного во ФГУП «ГНЦ «НИОПИК». Исследование проводили на мышах-самках линии СВА. В качестве опухолевой модели использовали перевиваемую солидную форму асцитной саркомы S-37. Анализируемые образцы фотосенсибилизатора, предварительно солиubilизированные в 10%-ном растворе водного Кремофора EL, вводили мышам внутривенно на 7-е сутки роста опухоли в дозе 1–2 мг/кг массы тела животного. Через 2 ч после введения образцов проводили облучение сенсибилизированной опухоли на светодиодной установке в длинноволновой области с максимумом 755 нм (плотность мощности облучения – 50 мВт/см², максимальная суммарная доза облучения – 300 Дж/см²). Эффективность фотодинамической терапии оценивали по значениям торможения роста опухоли в опытных группах по сравнению с нелеченным контролем. Проведенное исследование показало, что применение режима фотодинамической терапии с введением исследуемого образца в дозе 2 мг/кг и облучением в дозе 300 Дж/см² позволяет значительно замедлить рост опухоли (ТРО 70-80% на протяжении 20 дней наблюдения), что говорит о перспективности дальнейшего изучения исследуемого тетраазахлорина в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотодинамическая активность, тетраазахлорин, фотосенсибилизатор, саркома S-37.

Введение

В настоящее время ведется активный поиск новых фотосенсибилизаторов с поглощением в области так называемого «терапевтического окна» – длинноволновой области видимого спектра (700–800 нм), где поглощение биологической ткани минимально и, следовательно, облучение в этой области обеспечивает более глубокое проникновение излучения в ткань. Проведенные экспериментальные и клинические исследования соединений, поглощающих в указанной области, в том числе производных тексаферина, бензопорфирина, нафталоцианина, бактериохлорина и др. показали значительное увеличение глубины поражения опухоли [1–3].

Во ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» синтезирован ряд фотосенсибилизаторов, характеризующихся удовлетворительными фотофизическими параметрами и поглощающих в указанной длинноволновой области. Оценка цитотоксических и фотодинамических свойств этих соединений *in vivo* для отбора наиболее перспективных претендентов для последующих доклинических и клинических исследований является весьма актуальной задачей.

Одним из таких соединений является производное тетраазахлорина – 2,3,3а,21а-тетрагидро-2-метил-3а,8,13,18-тетрафенил-5,10,15,20-тетрааза-1Н,22Н,24Н-пирроло[3,4-*b*]порфин. Ранее в экспериментальных исследованиях было

показано, что указанное производное тетраазахлорина обладает высокой фотодинамической активностью. Для предшествующих исследований на животных использовали растворы препарата в 4%-ом кремофоре EL и 4%-ом проксаноле 268 [4–6].

Позже специалистами ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» и Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН был проведен сравнительный анализ ряда эмульгаторов по способности обеспечивать доставку фотосенсибилизатора в клетки аденокарциномы легкого человека A549 *in vitro*. Было обнаружено, что количество флуоресцирующего мономера, накапливающегося в клетках, соответствует степени мономерности препарата в растворах. Также было установлено, что кремофор EL обеспечивает наибольшую мономерность исследуемого фотосенсибилизатора в растворе и наилучшую стабильность композиции при хранении [А.П. Ластовой, А.А. Игнатова, А.В. Феофанов, Е.А. Мачинская, В.И. Иванова-Радкевич / Исследование свойств нового фотосенсибилизатора β,β,β',β'-тетраметилтрибензотетраазахлорина // Принята к печати в имико-фармацевтический журнал].

На основании полученных результатов было решено продолжить исследования фотодинамической активности производного тетраазахлорина

с целью повысить его фотодинамическую активность и установить оптимальные режимы проведения фотодинамической терапии (ФДТ) с ним.

Материалы и методы

Объектом исследования являлось производное тетраазахлорина, предназначенное для фотодинамической терапии злокачественных новообразований, синтезированное во ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»: 2,3,3а,21а-тетрагидро-2-метил-3а,8,13,18-тетрафенил-5,10,15,20-тетрааза-1Н,22Н,24Н-пирроло[3,4-*b*]порфин. Структурная формула изученного соединения представлена на рис. 1.

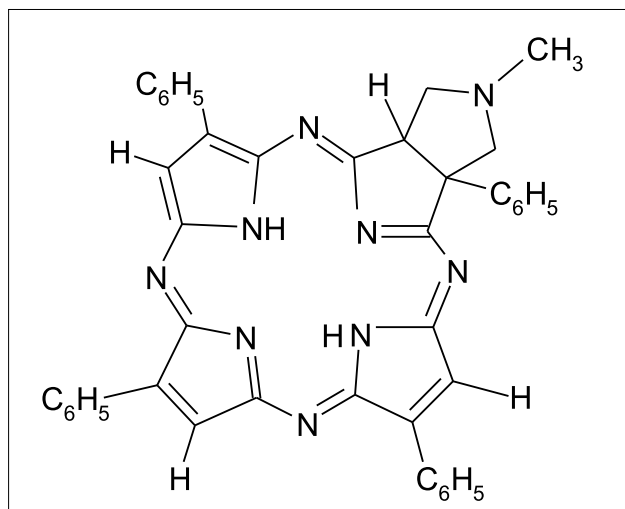


Рис. 1. Структурная формула 2,3,3а,21а-тетрагидро-2-метил-3а,8,13,18-тетрафенил-5,10,15,20-тетрааза-1Н,22Н,24Н-пирроло[3,4-*b*]порфина

Исследуемый фотосенсибилизатор представлял собой липофильное, а следовательно, нерастворимое в воде вещество. В связи с этим для проведения экспериментальных исследований были использованы его солюбилизаты в 10%-ном водном мицеллярном растворе (эмульсии) неионогенного поверхностно-активного вещества – кремифора EL, который представляет собой полиоксиэтилированное касторовое масло.

Были исследованы следующие режимы воздействия на опухоль:

1. Введение фотосенсибилизатора в дозе 2,0 мг/кг без последующего облучения;
2. Введение фотосенсибилизатора в дозе 1,0 мг/кг с облучением через 2 ч;
3. Введение фотосенсибилизатора в дозе 2,0 мг/кг с облучением через 2 ч;

Экспериментальные исследования проводили на мышах-самках линии СВА массой 18–22 г. Животные содержались в стандартных условиях. При работе с животными руководствовались Феде-

ральным законом «О защите животных от жестокого обращения» и «Международными рекомендациями (этическим кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных».

В качестве экспериментальной опухолевой модели использовали перевиваемые солидные формы саркомы S-37. Асцитный штамм саркомы S-37 поддерживали на беспородных мышах путем еженедельной внутривентриальной перевивки асцитной жидкости в объеме 0,5 мл от мыши-донора мышши-реципиенту.

Для прививки солидной опухоли из брюшной полости мышши-донора на 7-е сутки роста асцитной опухоли отбирали в шприц 2 мл асцитной жидкости. Подсчет опухолевых клеток в асцитной жидкости проводили с помощью камеры Горяева после разведения асцита в 40 раз стерильным физиологическим раствором. Количество опухолевых клеток в 1 мл асцитной жидкости рассчитывали по формуле (2):

$$N = \frac{n \cdot 40}{(10 \cdot 4,0 \cdot 10^{-6})} = n \cdot 10^6 \quad (2)$$

где N – число клеток в 1 мл асцитной жидкости; n – число клеток в 10 больших квадратах; 10 – число больших квадратов, по которым производился подсчет; 225 – общее число больших квадратов в одной камере; $4,0 \times 10^{-6}$ – объем одного квадрата камеры (мл); 40 – разведение асцитной жидкости.

Для прививки солидной опухоли использовали разведенную асцитную жидкость, содержащую ~100 млн. опухолевых клеток в 1 мл. Асцит, содержащий менее 100 млн. опухолевых клеток в 1 мл, не использовали. Асцит, содержащий более 100 млн. опухолевых клеток в 1 мл, разводили до необходимой концентрации стерильным физиологическим раствором комнатной температуры.

Необходимый объем физиологического раствора рассчитывали по формуле (3):

$$V_{\text{физ. раствора}} = \frac{V_a \cdot (N - 100 \cdot 10^6)}{100 \cdot 10^6} \quad (3)$$

где $V_{\text{физ. раствора}}$ – объем физиологического раствора, который необходимо добавить к асцитной жидкости (мл), V_a – объем асцитной жидкости в шприце (мл), N – число опухолевых клеток в 1 мл неразведенной асцитной жидкости (из формулы (1)), 100×10^6 – необходимое содержание опухолевых клеток в 1 мл разведенного асцита.

После разбавления асцитной жидкости необходимым объемом физиологического раствора,

перемешивали содержимое шприца, вращая шприц между ладоней вдоль его оси в наклонном положении. Разведенную асцитную жидкость в объеме 0,05 мл имплантировали подкожно на предварительно депилированную наружную поверхность бедра нижней правой конечности мыши-реципиента линии СВА. Таким образом, опухолевая нагрузка составляла $\sim 5 \times 10^6$ опухолевых клеток на мышшь, что обеспечивало оптимальные для проводимых исследований темпы роста экспериментальной опухоли.

На 7-е сутки роста солидной опухоли отбирались мыши с поверхностными (плоскими) опухолями с диаметром 0,5–0,8 см. Отобранных мышей sensibilizировали, то есть вводили им внутривенно исследуемые мицеллярные растворы в объеме, содержащем заданную дозу фотосенсибилизатора и рассчитанном по формуле (4) с учетом массы мыши:

$$V_{\text{солюбилизатора}} = \frac{m_{\text{мышь}} \cdot D}{C \cdot 1000} \quad (4),$$

где $V_{\text{солюбилизатора}}$ – объем мицеллярного раствора фотосенсибилизатора, который необходимо ввести мыши (мл), $m_{\text{мышь}}$ – масса мыши (г), определенная на электронных весах, D – заданная доза фотосенсибилизатора (мг/кг массы тела мыши), C – концентрация вводимого мыши мицеллярного раствора фотосенсибилизатора (мг/мл).

С момента введения фотосенсибилизатора до проведения сеанса облучения sensibilizированных животных содержали в клетках, защищенных от прямого попадания солнечного или электрического света. Необходимость подобных предосторожностей связана с тем, что попадание света определенной длины волны на sensibilizированную опухоль может привести к неконтролируемому развитию фотодинамической реакции.

Для проведения сеанса облучения мышшь фиксировали на планшетке в положении на животе с помощью растяжек и изолировали поверхность тела мыши от излучения с помощью специальной светонепроницаемой ткани, оставляя открытым для облучения участок в 1,5 раза перекрывающий максимальный диаметр опухоли.

Облучение опухоли проводили на светодиодной установке в длинноволновой области с максимумом 755 нм (плотность мощности облучения – 50 мВт/см², максимальная суммарная доза облучения – 300 Дж/см²). Наружное дистанционное облучение sensibilizированной опухоли проводили через 2 ч после введения фотосенсибилизаторов. Плотность мощности облучения контролировали с помощью измерителя плотности мощности ИПМО (НПО «Полус»).

Контролем эффективности каждого режима ФДТ служили мыши-опухоленосители, не подвергавшиеся какому-либо воздействию.

Количество животных в опытной группе составляло 8–12, в контрольной – 12–18 особей. Продолжительность наблюдения за животными составляла 20 сут. после лечения. День проведения ФДТ считали нулевым днем фотодинамического воздействия.

Объем опухолей (в см³) в опытных и контрольных группах в контрольные сроки наблюдения рассчитывали по формуле (5).

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot D_1 \cdot D_2 \cdot D_3 \quad (5),$$

где D_1 , D_2 и D_3 – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли (см), измеренных при помощи циркуля и линейки. Каждый диаметр измеряли трижды, и для дальнейших расчетов использовали среднее значение.

Противоопухолевый эффект оценивали в динамике на протяжении всего срока наблюдения по значениям торможения роста опухоли (ТРО) в опытной группе. ТРО рассчитывали по формуле (6):

$$\text{ТРО (\%)} = \left(1 - \frac{V_i}{V_k} \right) \cdot 100\% \quad (6),$$

где V_i – значение объема опухоли (см³) у мыши в опытной группе, – среднее значение объемов опухоли (см³) в контрольной группе.

Подавление роста опухоли считали биологически значимым при ТРО $\geq 50\%$.

Процентную долю от исходного объема опухоли в опытных и контрольных группах в контрольные сроки наблюдения вычисляли по формуле (7):

$$\alpha_T (\%) = \frac{V_i}{V_0} \cdot 100\% \quad (7),$$

где V_i – объем опухоли в контрольный срок наблюдения, V_0 – объем опухоли на нулевые сутки (до воздействия).

Для построения кинетических кривых использовали средние значения в группах.

Также определяли параметр излеченности в опытных группах животных, как процентную долю животных с полной регрессией опухоли к концу срока наблюдения. Полной регрессией опухоли считали отсутствие признаков новообразования при пальпации.

Задачей работы являлось изучение возможности повышения эффективности фотодинамической терапии с производным тетраазахлорина при повышении его дозы.

Результаты и обсуждение

Исследуемый образец не вызывал подавления роста опухоли в дозе 2,0 мг/кг в отсутствие облучения.

При проведении облучения через 2 ч после введения образца фотосенсибилизатора в дозе 1,0 мг/кг на протяжении 20 дней после лечения наблюда-

лось значительное торможение роста опухоли у экспериментальных животных: значения ТРО достигали 57–67%, коэффициент излеченности составил 20% (рис. 2, 3).

При повышении дозы вводимого за 2 ч до облучения фотосенсибилизатора до 2,0 мг/кг отмечено повышение эффективности фотодинамической терапии: значения ТРО выросли более чем на 10% и составили 72–80% на протяжении всего срока наблюдения, коэффициент излеченности также увеличился практически в 2 раза и составил 37,5% (рис. 2, 4)

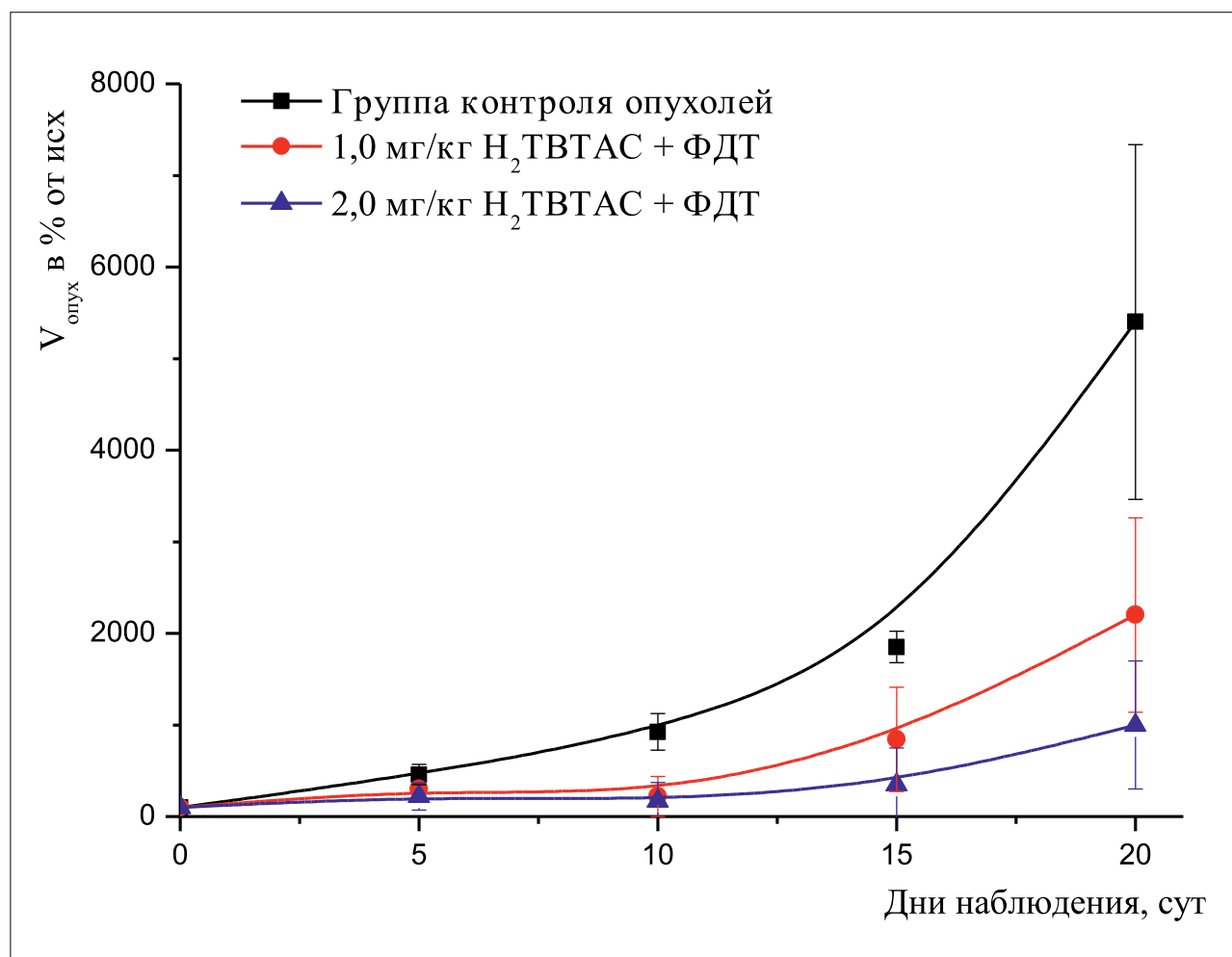


Рис. 2. Кинетика роста опухоли при проведении ФДТ (300 Дж/см²) через 2 ч после в/в введения образцов производного тетраазахлорина в 10%-ом кремофоре EL

Заключение

Результаты исследования показали возможность дальнейшего повышения фотодинамической эффективности производного тетраазахлорина за счет повышения дозы фотосенсибилизатора. К настоящему моменту оптимальные режимы воздействия не подобраны и планируется дальнейшее

повышение дозы препарата с оценкой эффективности и токсичности воздействия.

Сделан вывод, что исследования разрабатываемого соединения следует продолжать, подбирая оптимальные режимы фотодинамической терапии.

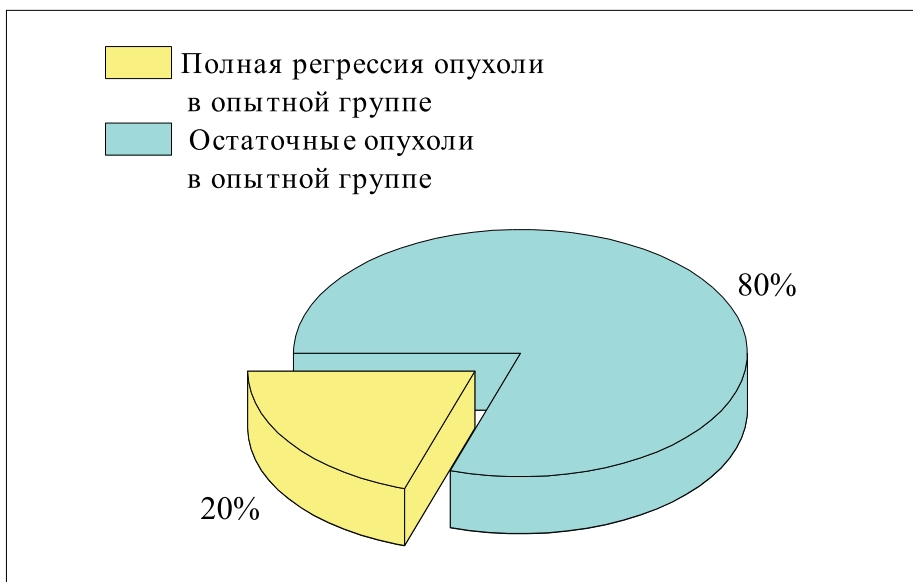


Рис. 3. Излеченность животных к концу срока наблюдения после проведения ФДТ с производным тетраазахлорина в дозе 1,0 мг/кг

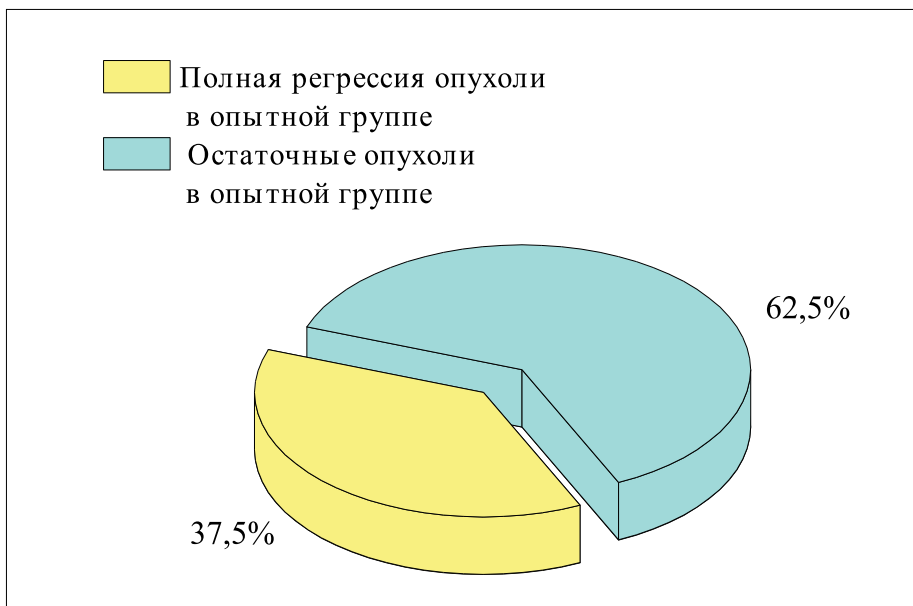


Рис. 4. Излеченность животных к концу срока наблюдения после проведения ФДТ с производным тетраазахлорина в дозе 2,0 мг/кг

ЛИТЕРАТУРА

1. Странадко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии: Обзор // *Лазерная медицина*. – 2002. – Т. 6., № 1. – С. 4–8.
2. Castano A.P. et al. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2004. – № 1. – Р. 279–93.
3. Xu D.Y. Research and development of photodynamic therapy photosensitizers in China // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2007. – № 4. – Р. 13–25.
4. Иванова-Радкевич В.И., Негримовский В.М., Барканова С.В., Макарова Е.А., Донягина В.Ф., Плетенева Т.В. Биоконические исследования фотодинамической активности новых фотосенсибилизаторов // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2009. – Т. 43, № 5. – С. 7–10.
5. Иванова-Радкевич В.И., Умнова Л.В., Барканова С.В., Макарова Е.А., Лукьянец Е.А. Фотодинамическая активность производного тетраазахлорина // *Рос. биотерапевтический журн.* – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 39–41.
6. Барканова С.В., Быстрицкий Г.И., Ворожцов Г.Н. и др. Тетраазахлорины как фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии. Патент РФ 2 278 119 (2006) // *Бюлл. Изобр.* – 2006. – № 17.

PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF TETRAAZACHLORIN DERIVATE STUDIED IN VIVO

V.I. Ivanova-Radkevich, E.A. Machinskaya

Research Institute of Organic Intermediates and Dyes, Moscow

The results of investigation for photodynamic activity of new tetraazachlorin derivate – tetramethyltribenzotetraazachlorin, synthesized in Research Institute of Organic Intermediates and Dyes. The study was performed on female mice of CBA line. The tumor model was transferred solid ascetic sarcoma S-37. The samples of photosensitizer, previously solubilized in 10% aqueous solution of Cremophor EL, injected to mice intravenously on the 7th day of tumor growth in dose of 1–2 mg/kg. Two hours later the irradiation of sensitized tumor using light emitting diode device in a maximal wavelength of 755 nm (light power density – 50 mW/cm², maximal total light dose – 300 J/cm²) was performed. The efficacy of photodynamic therapy was assessed by growth inhibition rates in the study group comparing with control group. The study showed that photodynamic therapy with investigated sample in dose of 2 mg/kg and light dose of 300 J/cm² significantly inhibited the tumor growth (inhibition rate of 70–80% within 20 days), indicating prospectivity of subsequent investigations of tetraazachlorin as photosensitizer for photodynamic therapy of malignant tumors.

Keywords: photodynamic therapy, photodynamic activity, tetraazachlorin, photosensitizer, sarcoma S-37.

Контакты: Мачинская Е.А. E-mail: machinskaya@niopik.ru