

Флуоресценция индотрикарбоцианиновых красителей в процессе их накопления в тканях животных *in vivo*

М. П. Самцов¹, Д. С. Тарасов^{1,2}, А. П. Луговский¹, Е. С. Воропай²

¹Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета, Минск; e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru

²Белорусский государственный университет, Минск

В работе приведены результаты исследований влияния функциональных групп в структуре индотрикарбоцианинового фотосенсибилизатора на его фармакокинетику и биораспределение в тканях экспериментальных животных. С помощью лазерной флуоресцентной спектроскопии получены спектры флуоресценции *in vivo* локализованных в тканях индотрикарбоцианиновых красителей для разных временных отсчетов после внутривенного введения. По изменению интенсивности их флуоресценции в опухолевой и здоровой мышечной тканях определен профиль фармакокинетики. Показано, что наличие хлорзамещенного ортофениленового мостика и полиэтиленгликолей в структуре красителя обеспечивает высокую избирательность накопления в опухолевых тканях и эффективное выведение из организма экспериментального животного в течение суток.

Ключевые слова: трикарбоцианиновые красители, лазерная флуоресцентная спектроскопия, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, фармакокинетика.

В результате обширных исследований соединений различных классов, которые используются в качестве основы фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии, выкристаллизовались требования к идеальному фотосенсибилизатору. Так по современным представлениям он должен проявлять выраженный фотодинамический эффект при активации излучением в окне прозрачности биологических тканей, обладать высокой избирательностью накопления в тканях-мишенях, биосовместимостью, эффективным профилем фармакокинетики, относительно быстро выводиться из организма и флуоресцировать с достаточным для диагностических целей квантовым выходом. По результатам комплексных исследований фотофизических свойств ряда индотрикарбоцианиновых красителей в модельных средах и опухолевых моделях на экспериментальных животных *in vivo* выбран краситель в значительной степени удовлетворяющий этим требованиям [1]. В его основе индотрикарбоцианиновый краситель с хлорзамещенным ортофениленовым мостиком в полиметиновой цепи. Полиэтиленгликоли с молекулярной массой 300 Да (ПЭГ300), ковалентно связанные по концевым группам, обеспечили новому фотосенсибилизатору высокие водорастворимость и биосовместимость. Наличие указанных функциональных групп способно существенно изменить характер взаимодействия с транспортными белками крови [2]. Важно понимать, как это сказывается на фармакокинетики и биораспределении фотосенсибилизатора в тканях *in vivo*.

Данная работа посвящена исследованию фармакокинетики накопления и спектрально-люминесцентных свойств индотрикарбоцианиновых красителей в тканях экспериментальных животных *in vivo*.

На рис. 1 приведены структурные формулы исследованных красителей. Основной объект исследования – индотрикарбоцианиновый фотосенсибилизатор ПК1, разработка лаборатории спектроскопии НИИПФП им. А.Н. Севченко БГУ [1]. Красители ПК2 и ПК3 отличаются от ПК1 на одну функциональную группу: у ПК2 отсутствуют полиэтиленгликоли на концевых группах, а у ПК3 – хлорзамещенный ортофениленовый мостик.

Закономерности накопления и выведения индотрикарбоцианиновых красителей проводились на мышах линии C57Bl/6 с перевитой опухолью асцитной карциномой Эрлиха. Опухоль перевивали на наружную поверхность бедра взвесью опухолевых

клеток ($1 \cdot 10^6$) в 0,1 мл стерильной питательной среды. Испытуемая группа укомплектовывалась животными, опухоли которых достигли размеров 5–6 мм. Исследования проводились при идентичной молярной дозе введения красителей. Данные по фармакокинетики накапливались на протяжении 4–5 часов после внутривенного введения препарата с шагом сканирования по времени 5–30 минут. Для оценки эффективности выведения фотосенсибилизатора дополнительно измерялась точка через сутки после введения. Статистическая достоверность результатов обеспечивалась измерениями для групп подопытных животных не менее 6.

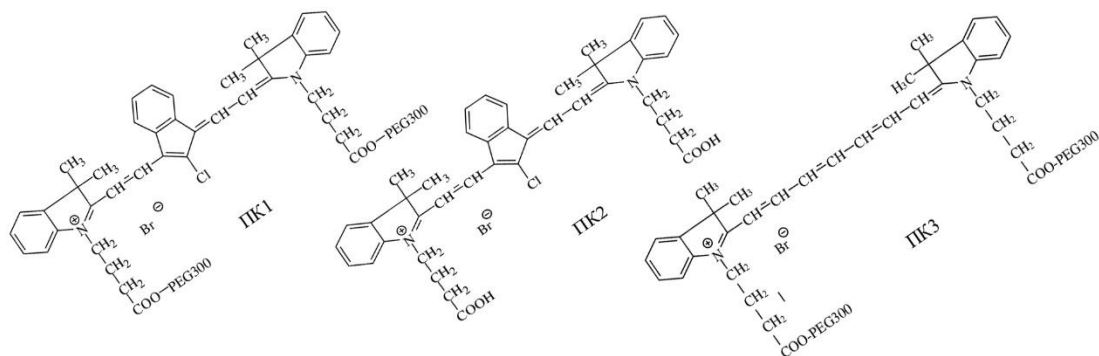


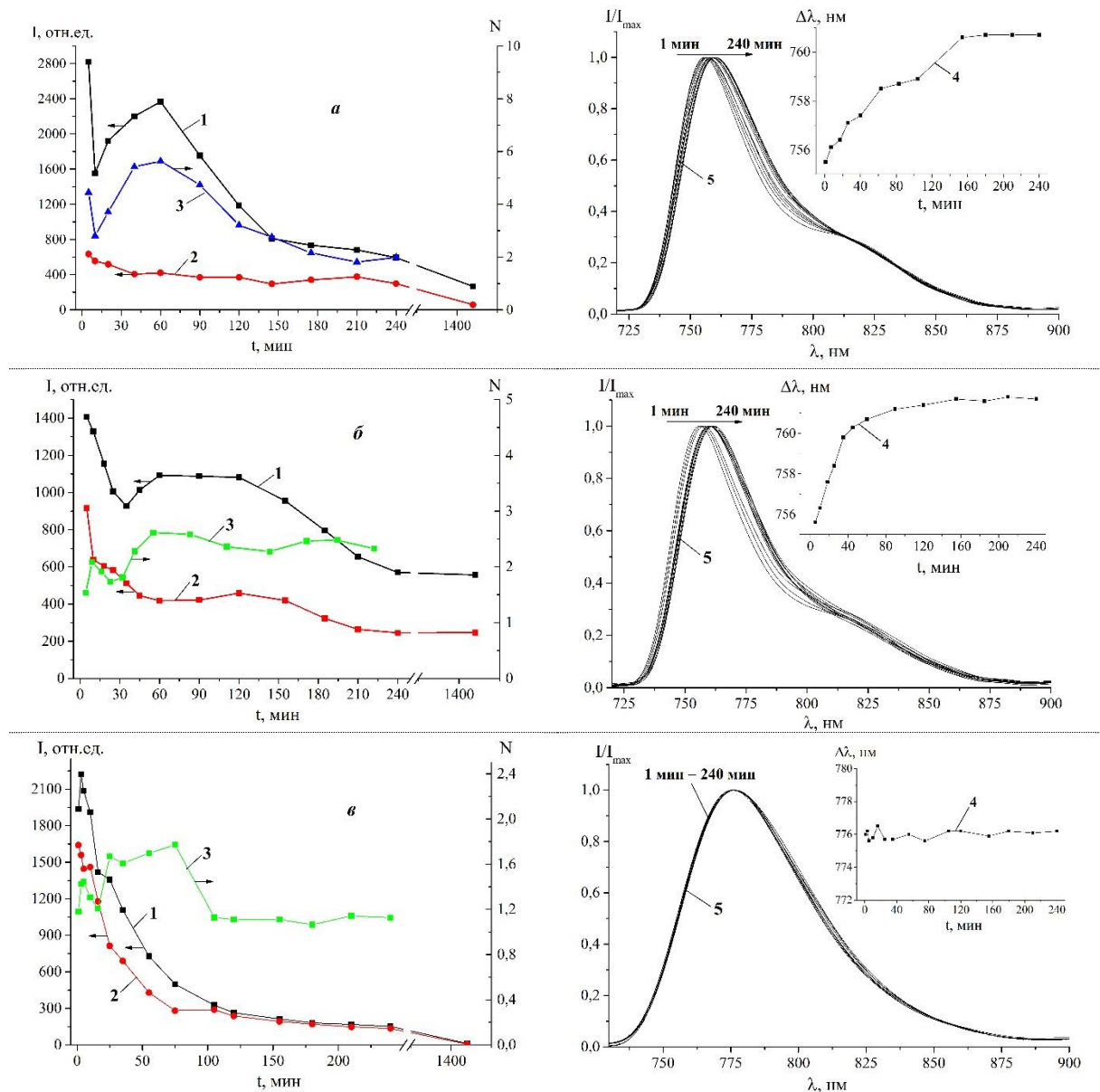
Рис. 1. – Структурные формулы исследованных красителей.

Накопление индотрикарбоцианинового ФС в тканях лабораторных животных определяли путем регистрации спектров флуоресценции с помощью разработанного в НИИПФП им. А. Н. Севченко БГУ лазерного флуоресцентного спектрометра с оптоволоконным вводом возбуждающего излучения и свечения флуоресценции. В качестве источника возбуждения в спектрометре используется полупроводниковый лазер с длиной волны излучения 684 нм. Оптическая система спектрометра состоит из излучателя-светоколлектора, малогабаритного полихроматора и блока фотоприемника (ПЗС-линейка).

На рис. 2 представлены фармакокинетики накопления красителей ПК1–ПК3 в опухолевой и здоровой мышечной тканях. Интенсивность флуоресценции ПК3 монотонно уменьшается в течение всего времени наблюдения. При этом положение максимума и форма спектра флуоресценции при регистрации от опухолевого узла и мышечной ткани стабильны в течение всего времени наблюдения. В течение 4 часов после внутривенного введения красителя значение индекса контрастности флуоресценции вблизи 1,4, достигая максимума через 25 минут после введения. Его среднее значение не превышает 1,6, которое свидетельствует о низкой избирательности накопления в опухолевых тканях.

Профиль фармакокинетики красителей ПК1 и ПК2 имеет более сложную форму. Приблизительно через 15 минут для ПК1 и 30 минут для ПК2 после внутривенного введения фармакокинетики в опухолевом узле проходит через локальный минимум, а через 60 минут достигается максимум. Сигнал флуоресценции ПК1 и ПК2 при регистрации от здоровой мышечной ткани монотонно уменьшается в течение всего периода наблюдения. Положение локального минимума на кинетике изменения интенсивности флуоресценции для опухолевого узла коррелирует с быстрым уменьшением сигнала флуоресценции в течение первых 20 минут в мышце. По всей видимости, на данном временном интервале значительная часть красителя локализована в крови. В дальнейшем (>60 минут) сигнал флуоресценции ПК1 и ПК2 в тканях монотонно уменьшается. Обращает на себя внимание плато на фармакокинетики красителей ПК1 и ПК2 во временном окне от 50 до 100–150 минут. Для данных

красителей наблюдается существенно более высокое значение индекса контрастности: 5,6 для ПК1 и 2,6 для ПК2.



а – ПК1 в дозе 10,7 мг/кг; **б** – ПК2 в дозе 5 мг/кг; **в** – ПК3 в дозе 9,5 мг/кг

Рис. 2. – Изменение от времени после введения интенсивности флуоресценции красителей в тканях асцитной карциномы Эрлиха (1) и бедра (2) мышей линии С57В1, индекса контрастности (3), положение максимума (4); нормированные спектры флуоресценции для разных временных отсчетов (5).

Следует отметить, что спектры флуоресценции красителей ПК1 и ПК2 *in vivo* изменяются с течением времени после их внутривенного введения. Главным образом, наблюдается длинноволновое смещение максимума спектра флуоресценции. Диапазон изменения положения максимума флуоресценции составляет 755,5–760,8 нм для ПК1 и 755,5–761,7 нм для ПК2. Для обоих красителей деформация спектра флуоресценции *in vivo* в опухолевой и мышечной тканях весьма похожи. Наиболее интенсивные изменения спектра флуоресценции происходят в течение первых 40–80 минут, после чего наблюдается стабилизация спектральных параметров. Аналогичная деформация спектра флуоресценции ПК1 и ПК2 наблюдалась при исследовании взаимодействия красителей с белками сыворотки крови человека [2]. С помощью экспериментов по геле-

электрофорезу нами ранее показано, что трикарбоцианиновые красители с хлорзамещенным ортофениленовым мостиком в цепи сопряжения ковалентно связываются с альбумином и липопротеинами высокой плотности. Разумно полагать, что деформация спектра флуоресценции красителей ПК1 и ПК2 в тканях *in vivo*, обусловлена взаимодействием с белками плазмы крови.

Красители ПК1 и ПК3 имеют схожую динамику выведения: через сутки после внутривенного введения сигнал флуоресценции красителей в тканях уменьшается более чем на порядок по сравнению с временем максимального их накопления. Содержание в тканях красителя ПК2 без ПЭГ через сутки уменьшается не более чем в два раза по сравнению с максимумом. Таким образом, наличие хлорзамещенного ортофениленового мостика и полиэтиленгликолей в структуре красителя обеспечивает высокую избирательность накопления в опухолевых тканях и эффективное выведение из организма экспериментального животного в течение суток.

Благодарности

Исследования выполнены при поддержке гранта Президента Республики Беларусь. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории токсикологии ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» Петрову П. Т., Зильберману Р. Д., Савину А. О. за предоставленную возможность проведения экспериментов с лабораторными животными.

Литература

1. Lugovski A.A., Samtsov M.P., Kaplevsky K.N., Tarasau D.S., Voropay E.S., Petrov P.T., Istomin Y.P. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2016. V. 316. P. 31–36.
2. Самцов М.П., Тарасов Д.С., Малюшкова Е.В., Хлудеев И.И., Луговский А.А., Семак И.В. Гель-электрофорез комплексов трикарбоцианиновых красителей с белками плазмы крови. *Медэлектроника–2020. Средства медицинской электроники и новые медицинские технологии: сб. науч. ст. XII Междунар. науч.-техн. конф.* (Минск, Республика Беларусь, 10 декабря 2020 года). – Минск : БГУИР, 2020. С. 125–132.

In vivo fluorescence of indotricarbocyanine dyes during their accumulation in animal tissues

M.P. Samtsov¹, D.S. Tarasov^{1,2}, A.P. Lugovski¹, E.S. Voropay²

¹*A.N. Sevchenko Institute for Applied Physical Problems of Belarusian State University, Minsk; e-mail: dmitrij-tarasov@list.ru*

²*Belarussian State University, Minsk*

The paper presents the results of studies of the influence of functional groups in the structure of the indotricarbocyanine photosensitizer on its pharmacokinetics and biodistribution in tissues of experimental animals. Using laser fluorescence spectroscopy, *in vivo* fluorescence spectra of indotricarbocyanine dyes localized in tissues were obtained for different time counts after intravenous administration. The profile of their pharmacokinetics was determined by the change in the intensity of their fluorescence in tumor and healthy muscle tissues. It has been shown that the presence of a chlorine-substituted orthophenylene bridge and polyethylene glycols in the structure of the dye provides a high selectivity of accumulation in tumor tissues and effective excretion from the body of an experimental animal within 24 hours.

Keywords: tricarbocyanine dyes, laser-induced fluorescence spectroscopy, photodynamic therapy, photosensitizer, pharmacokinetics.