

УДК 544.032.65+615.277.3+ 615.831.7

СРАВНЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ И ФОТОЛОНА

М.П. САМЦОВ¹, Д.С. ТАРАСОВ^{1,2}, А.П. ЛУГОВСКИЙ¹,
Е.С. ВОРОПАЙ², Р.Д. ЗИЛЬБЕРМАН³, А.О. САВИН³

¹НИУ «Институт прикладных физических проблем имени А.Н. Севченко» БГУ (Минск, Беларусь)

²Белорусский государственный университет (Минск, Беларусь)

³ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» (Минск, Беларусь)

Аннотация. В работе проведено сравнение противоопухолевой активности нового индоотрикарбоцианинового фотосенсибилизатора и разрешенного для клинического применения фотосенсибилизатора Фотолон. Исследования противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов проводились на половозрелых инбредных мышцах-самках линии C57BL/6, которым на наружную поверхность бедра перевивали асцитную карциному Эрлиха. Доза препарата, время начала фотовоздействия, длина волны излучения, энергия и плотность мощности облучения для обоих фотосенсибилизаторов выбирались в соответствии с протоколом его использования. Для фотодинамической активации индоотрикарбоцианинового фотосенсибилизатора использовался полупроводниковый лазерный источник света собственной разработки (длина волны излучения 750 нм). Фотовоздействие с фотосенсибилизатором Фотолон проводилось с помощью лазерного терапевтического аппарата «ФДТ-лазер» (длина волны излучения 660 нм). На основе анализа динамики роста опухоли в течение 21 суток после проведения фотодинамической терапии, установлено, что новый фотосенсибилизатор обладает противоопухолевой фотодинамической активностью не хуже, чем для применяемого в клинической практике Фотолон, а по некоторым важным для фотосенсибилизаторов параметрам превосходит его.

Ключевые слова: индоотрикарбоцианиновые красители, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор.

COMPARISON OF THE ANTI-TUMOR PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF THE PHOTOSENSITIZER BASED ON INDOTRICARBOCYANINE DYE AND PHOTOLON

MICHAEL P. SAMTISOV¹, DMITRI S. TARASAU^{1,2}, ANATOLY P. LUGOVSKI¹,
EUGENE S. VOROPAY², ROMAN D. ZILBERMAN³, ALEXANDER .O. SAVIN³

¹A.N Sevchenko Institute for Applied Physical Problems of BSU (Minsk, Belarus)

²Belarussian State University (Minsk, Belarus)

³Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus (Minsk, Belarus)

Abstract. The paper compares the antitumor activity of a new indotricarboyanine photosensitizer and Photolon, a photosensitizer approved for clinical use. Studies of the antitumor activity of photosensitizers were carried out on mature inbred female mice of the C57BL/6 line, which were transplanted onto the outer surface of the thigh with Ehrlich's ascitic carcinoma. The dose of the drug, the time of the start of photoexposure, the wavelength of radiation, the energy and power density of irradiation for both photosensitizers were chosen in accordance with the protocol of its use. For photodynamic activation of the indotricarboyanine photosensitizer, a semiconductor laser light source with a radiation wavelength of 750 nm of our own design was used. Photoexposure with a photosensitizer Photolon was carried out using a laser therapeutic device "PDT-laser" with a wavelength of 660 nm. Based on the analysis of tumor growth dynamics within 21 days after photodynamic therapy, it was found that the new photosensitizer has antitumor photodynamic activity no worse than that of Photolon used in clinical practice, and surpasses it in some important parameters for photosensitizers.

Keywords: indotricarboyanine dyes, photodynamic therapy, photosensitizer.

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) занимает одну из ведущих позиций среди современных методов лечения злокачественных новообразований. Дальнейшее развитие метода ФДТ связывают с созданием фотосенсибилизаторов (ФС) нового поколения, требования к которым не ограничиваются только высоким терапевтическим эффектом. Научным сообществом ведется разработка новых ФС, которые активируются световым излучением в окне прозрачности биотканей (700-900 нм). Это позволяет повысить глубину как повреждения, так и диагностики новообразований. По результатам комплексных исследований фотофизических свойств ряда индотрикарбоцианиновых красителей в модельных средах и опухолевых моделях на экспериментальных животных *in vivo* выделен краситель с оптимальными свойствами для тераностики злокачественных новообразований [1]. На данном этапе разработки отработана схема синтеза и лабораторный регламент получения нового ФС, разработан прототип лекарственной формы препарата на основе глюкозы, определены оптимальные условия проведения сеанса фотодинамической терапии в экспериментах с перевивными опухолями на лабораторных животных. В данной работе представлены результаты сравнения его терапевтических свойств с разрешенным к применению в клинической практике ФС Фотолон (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь).

Методика проведения эксперимента

Исследование противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов проводилось на половозрелых инбредных мышках-самках линии С57ВL/6 массой 18-20 г (получены в виварии ИБОХ НАНБ). В качестве модели опухолевого роста использовали аденокарциному Эрлиха (АКЭ), инокулированную подкожно на наружную поверхность бедра. Поддержание опухолевой линии осуществлялось на мышках линии ICR путем перевивки неразведенного асцита опухоли от животного-донора животному-реципиенту каждые 9-11 дней. Для перевивки опухоли мышкам подкожно вводился разведенный в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида АКЭ до концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток на 0,1 мл. Подсчет количества клеток проводили с помощью камеры Горяева в 100 больших квадратах. Эксперимент для двух фотосенсибилизаторов проводили через 10 дней после перевивки животным в одном эксперименте. Опытные и контрольные группы формировались из животных с опухолями, объем которых достиг 30-40 мм³ (линейные размеры опухолевого узла порядка 4-6 мм).

Доза препарата, время начала фотовоздействия, длина волны излучения, энергия и плотность мощности облучения для обоих ФС выбирались в соответствии с протоколом его использования. Для нового фотосенсибилизатора исходили из результатов собственных исследований. Так индотрикарбоцианиновый ФС использовался в виде прототипа лекарственной формы: смесь хроматографически чистого красителя с безводной глюкозой в соотношении 1:30. Начало фотовоздействия осуществлялось в соответствии с его фармакокинетикой через час после введения ФС. Для облучения использовался полупроводниковый лазерный источник света собственной разработки, с длиной волны излучения 750 нм.

Для Фотолона ориентировались на протокол и результаты исследования его противоопухолевой активности, выполненные разработчиками. Облучение проводилось с помощью лазерного терапевтического аппарата «ФДТ-лазер» (Институт физики НАНБ), который разрешен к применению в медицинской практике и предназначен для ФДТ с использованием ФС Фотолон (длина волны излучения 660 нм).

При этом параметры проведения ФДТ были идентичными по следующим пунктам (таблица 1): одинаковая опухолевая модель, способ введения препарата, параметры светового пятна на поверхности опухолевого узла. Животные во время эксперимента находились под общим тиопенталовым наркозом, дополнительно обездвигивались на специальной площадке с помощью фиксаторов. С целью обеспечения одинаковых условий фотовоздействия на образцы подвод светового излучения от разных лазеров осуществлялся с помощью одного и того же световода и линзового растрового рассеивателя.

Противоопухолевая активность фотосенсибилизаторов оценивалась согласно рекомендациям Фармкомитета по доклиническим исследованиям лекарственных средств [2]. Для объективной оценки противоопухолевой активности рассчитывался коэффициент торможения роста опухоли (ТРО):

$$TPO, \% = \frac{V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}}{V_{\text{контроль}}} \times 100\% \quad (1)$$

где $V_{\text{контроль}}$ – средний объем опухоли (мм³) контрольной группы; $V_{\text{опыт}}$ – средний объем опухоли (мм³) опытной группы.

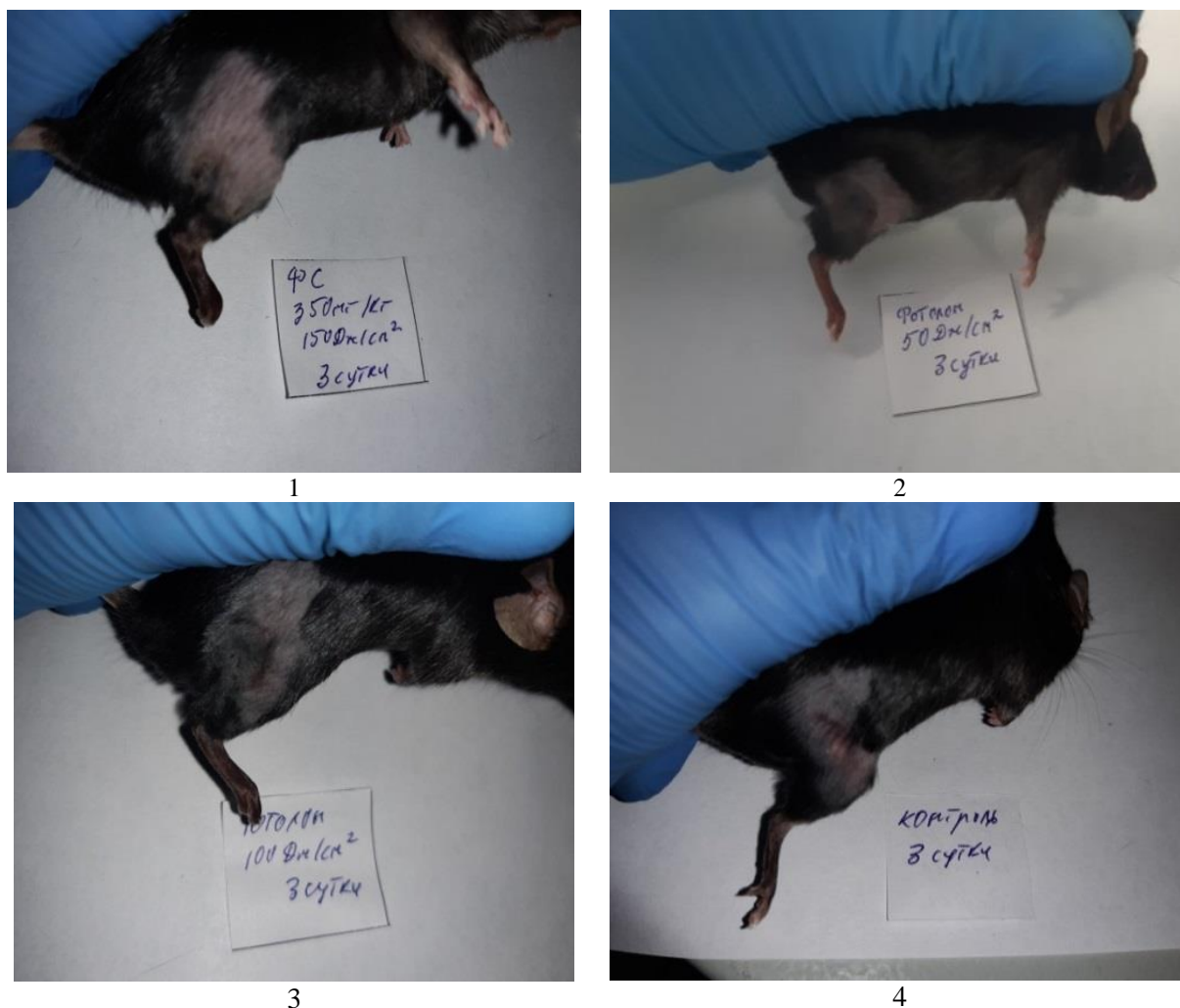
Таблица 1. Параметры исследования противоопухолевой активности ФДТ при использовании нового ФС и Фотолон

	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Опухолевая модель	Аденокарцинома Эрлиха на мышцах линии С57В1/6		
Фотосенсибилизатор	Фотолон (РУП «Белмедпрепараты»)		Индотрикарбоцианиновый ФС
Кол-во животных	10		
Источник фотовоздействия	660 нм	660 нм	750 нм
Световая доза ФДТ	50 Дж/см ²	100 Дж/см ²	140 Дж/см ²
Плотность мощности	150 мВт/см ²	150 мВт/см ²	100 мВт/см ²
Доза ФС	5 мг/кг	5 мг/кг	10,7 мг/кг
Введение	внутривенно		
Начало облучения после введения	60 минут		
Длительность облучения	5,5 минут	11 минут	23 минут
Длительность наблюдения после ФДТ	21 сутки		

Результаты и их обсуждение

В течение 21 суток проводилось наблюдение за состоянием животных и динамикой роста опухолей в опытных и контрольных группах. Для обоих исследованных ФС наблюдается одинаковая динамика роста опухоли после ФДТ. На 3-5 сутки после проведения ФДТ у животных испытываемых группах 1-3 на месте локализации опухоли наблюдались ожоги с формированием струпа, наблюдалось нарушение функционирования лапы (особенно в группе 2). Нормализация состояния лапы происходит через 7 – 14 суток после облучения.

На 3 сутки у животных опытных групп среди пораженных ожогом тканей опухолевые узлы не обнаруживались (рисунок 1). Заживление ран у животных протекало достаточно быстро, однако неравномерно для разных опытных групп. Наиболее медленно этот процесс протекал у животных, которым вводился ФС Фотолон и проводилось облучение при энергетической экспозиции 100 Дж/см².



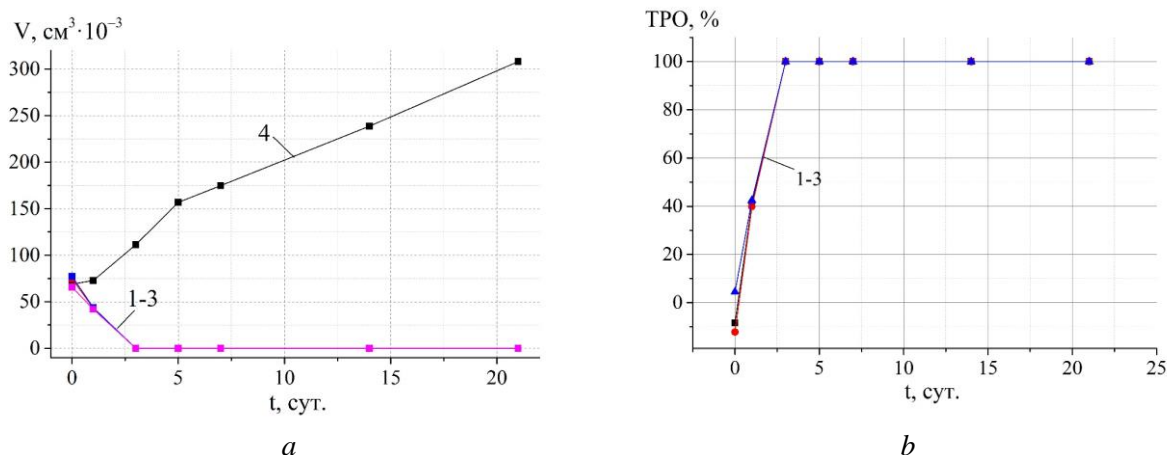
1 – индотрикарбоцианиновый ФС $10,7\text{ мг/кг}$ + облучение 750 нм , 140 Дж/см^2
2 – ФС Фотолон 5 мг/кг + облучение 660 нм , 50 Дж/см^2
3 – ФС Фотолон 5 мг/кг + облучение 660 нм , 100 Дж/см^2
4 – контроль

Рис. 1. Динамика роста опухоли и ТРО у мышей C57BL/6 с привитой АКЭ после в/в введения индотрикарбоцианинового ФС или ФС Фотолон и проведения ФДТ

На 14 и 21 сутки после проведения ФДТ опухоли не выявлялись ни в одной из испытуемых групп. В контрольных группах рост опухоли продолжается, на 21 сутки объем опухоли увеличился в 6-8 раз. Анализ динамики роста опухоли и ТРО позволяет заключить, что при обеспечении оптимальных условий фотодинамической терапии ФС Фотолон и новый ФС демонстрируют одинаковую противоопухолевую активность для опухолевого штамма асцитной карциномы Эрлиха (рисунок 2).

Фотолон относится к фотосенсибилизаторам второго поколения, в то время как индотрикарбоцианиновый краситель по многим параметрам соответствует третьему и четвертому поколению ФС [3-5]. Новый ФС характеризуется интенсивным поглощением и флуоресценцией в области $700 - 800\text{ нм}$, где максимально пропускание биологических тканей. Использование источников возбуждения с длиной волны в этом диапазоне повышает глубину повреждения опухолевых тканей (до $20 - 30\text{ мм}$) и глубину регистрации флуоресценции (до 15 мм), что расширяет терапевтический и диагностический потенциал нового ФС [6]. Индекс контрастности накопления индотрикарбоцианинового красителя в зависимости от опухолевого штамма лежит в диапазоне 4-7, тогда как для ФС Фотолон этот параметр составляет ~ 2 . В экспериментах с лабораторными животными для индотрикарбоцианинового красителя выявлена высокая скорость выведения: через сутки после сеанса ФДТ его концентрация в

тканях снижается на порядок. Для него установлена низкая общая токсичность и низкий уровень светобоязни после терапии.



- 1 – индотрикарбоцианиновый ФС 10,7 мг/кг + облучение 750 нм, 140 Дж/см²
2 – ФС Фотолон 5 мг/кг + облучение 660 нм, 50 Дж/см²
3 – ФС Фотолон 5 мг/кг + облучение 660 нм, 100 Дж/см²
4 – контроль

Рис. 2. Динамика роста опухоли и ТРО у мышей С57ВL/6 с привитой АКЭ после в/в введения индотрикарбоцианинового ФС или ФС Фотолон и проведения ФДТ

Заключение

Таким образом установлено, что новый фотосенсибилизатор обладает противоопухолевой фотодинамической активностью не хуже, чем для применяемого в клинической практике Фотолона, а по некоторым важным для фотосенсибилизаторов параметрам превосходит его.

Список литературы

1. Lugovski A.A., Samtsov M.P., Kaplevsky K.N., et al. Novel indotricarbocyanine dyes covalently bonded to polyethylene glycol for theranostics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2016;316:31-36.
2. Миронова А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Москва: Гриф и К; 2012.
3. Oniszczyk A., Wojtunik-Kulesza K.A., Oniszczyk T., Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;83:912-929.
4. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*. 2016;473(4):347-364.
5. Lange N., Szlasa W., Saczko J., Chwiłkowska A. Potential of cyanine derived dyes in photodynamic therapy. *Pharmaceutics*. 2021;13(6):818.
6. Самцов М.П., Тарасов Д.С., Горященко А.С., Казачкина Н.И., Жердева В.В., Савицкий А.П., Меерович И.Г. Оптимизация параметров фантома для диффузионной флуоресцентной томографии биотканей in vivo. *Журн. Белорус. гос. ун-та. Физика*. 2018;1:33-40.