

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ PLGA И ДИПРОПОКСИБАКТЕРИОПУРПУРИНИМИДА. ОЦЕНКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ

М.Д. Сапельников¹, Е.Д. Никольская², Н.Б. Морозова³, Е.А. Плотникова³,
 А.В. Ефременко^{4,5}, А.В. Панов^{1,6}, М.А. Грин¹, Р.И. Якубовская³

¹МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

²Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения (ВНЦМДЛ), Москва, Россия

³МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

⁵МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ЗАО «Институт фармацевтических технологий», Москва, Россия

Резюме

В статье описан процесс разработки технологии получения наночастиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), включающих дипропоксикабактериопурпуринимид (DPBPI) и предназначенных для фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований различного генеза. В работе подобраны технологические параметры, позволяющие оптимизировать метод получения наночастиц с заданными характеристиками, в результате был получен образец сферических частиц, обладающая средним диаметром частиц $222,6 \pm 2,8$ нм; ξ -потенциалом $-26,3 \pm 4,61$ мВ; индексом полидисперсности 0,144; общее содержание DPBPI в частицах PLGA-DPBPI составило 13,6%. В соответствии с разработанной методикой была осуществлена наработка партии наночастиц PLGA-DPBPI для дальнейших биологических исследований. В экспериментах *in vitro* на клетках немелкоклеточной карциномы легкого человека A549 для DPBPI, доставленного в клетки с помощью наночастиц PLGA-DPBPI, и эмульсии на основе кремофора EL (CrEL-DPBPI) было показано сходное внутриклеточное распределение (концентрирование в везикулярных клеточных структурах и диффузное распределение в цитоплазме), а также была показана высокая фотоиндуцированная активность и отсутствие темновой цитотоксичности в случае использования частиц PLGA-DPBPI. Изучение специфической активности наночастиц PLGA-DPBPI *in vivo* на модели саркомы мягких тканей мыши S37 показало селективное накопление DPBPI в опухолевой ткани и практически полное выведение DPBPI из организма в течение 48 ч, а также выраженную противоопухолевую эффективность при ФДТ.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, наночастицы, PLGA, фотосенсибилизатор, фотоиндуцированная активность, фотоиндуцированная противоопухолевая эффективность, дипропоксикабактериопурпуринимид.

Для цитирования: Сапельников М.Д., Никольская Е.Д., Морозова Н.Б., Плотникова Е.А., Ефременко А.В., Панов А.В., Грин М.А., Якубовская Р.И. Разработка технологии получения наночастиц на основе PLGA и дипропоксикабактериопурпуринимида. Оценка физико-химических и биологических свойств полученной системы доставки // Biomedical Photonics – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 4–17. doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-4-17.

Контакты: Сапельников М.Д., e-mail: maxsapelnikov@gmail.com

DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY FOR OBTAINING PLGA AND DIPROPOXYBATERIOPURPURINIMIDE-BASED NANOPARTICLES. EVALUATION OF PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE OBTAINED DELIVERY SYSTEM

Sapelnikov M.D.¹, Nikolskaya E.D.², Morozova N.B.³, Plotnikova E.A.³,
 Efremenko A.V.^{4,5}, Panov A.V.^{1,6}, Grin M.A.¹, Yakubovskaya R.I.³

¹Federal State Budget Educational Institution of Higher Education “MIREA – Moscow Technological University”, Moscow, Russia

²Russian research center for molecular diagnostics and therapy (RCMDT), Moscow, Russia

³P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of FSBI NMRRC of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

⁴Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁶ZAO “Institute of pharmaceutical technologies”, Moscow, Russia

Abstract

The article describes the process of developing a technology for producing nanoparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA) containing dipropoxybacteriopurpurinimide (DPBPI) for photodynamic therapy of malignant tumors of various origins. Technological parameters for optimizing the method in order to obtain nanoparticles with specified characteristics are presented in this paper. As a result, the nanoparticles sample with an average particle diameter of 222.6 ± 2.8 nm; ξ -potential 26.3 ± 4.61 mV; polydispersity index 0.144; the total content of DPBPI in PLGA-DPBPI nanoparticles 13.6% were obtained. In accordance with the developed technique, the batch of PLGA-DPBPI nanoparticles was developed for further biological studies. In vitro experiments on A549 human non-small cell lung carcinoma for DPBPI, delivered as a part of PLGA-DPBPI nanoparticles, and an EL cremophor-based emulsion (CrEL-DPBPI) showed a similar intracellular distribution (concentrated in vesicular cell structures and diffusely distributed in cytoplasm), as well as high photo induced activity and the absence of dark cytotoxicity in case of PLGA-DPBPI nanoparticles. The study of the PLGA-DPBPI nanoparticles specific activity in vivo on the S37 mouse soft tissue sarcoma model showed the selective accumulation of DPBPI in tumor tissue and the almost complete elimination of DPBPI from the body within 48 hours, as well as significant antitumor efficacy in PDT.

Keywords: photodynamic therapy, nanoparticles, PLGA, photosensitizer, photoinduced activity, photoinduced antitumor efficacy, dipropoxybacteriopurpurinimide.

For citations: Sapelnikov M.D., Nikolskaya E.D., Morozova N.B., Plotnikova E.A., Efremenko A.V., Panov A.V., Grin M.A., Yakubovskaya R.I. Development of the technology for obtaining PLGA and dipropoxybacteriopurpurinimide-based nanoparticles. Evaluation of physicochemical and biological properties of the obtained delivery system, *Biomedical Photonics*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 4–17. (in Russian) doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-4-17.

Contacts: Sapelnikov M.D., e-mail: maxsapelnikov@gmail.com

Введение

На сегодняшний день тема разработки и получения новых лекарственных форм (ЛФ) гидрофобных веществ, имеющих высокую фармакологическую активность, является актуальной. Одной из перспективных ЛФ, применяемой в указанных целях, являются наночастицы на основе биodeградируемых сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA). Данная форма позволяет влиять на процессы доставки и депонирования лекарственных средств в органах и тканях-мишенях [1, 2]. Частицы со средним диаметром около 200 нм эффективно накапливаются как в органах и тканях со злокачественными новообразованиями, так и подвергаются интернализации опухолевыми клетками [1]. Использование PLGA с терминальной карбоксильной группой и соотношением мономерных звеньев 50:50 позволяет получать частицы с меньшим диаметром по сравнению с другими соотношениями мономеров молочной и гликолевой кислот, данный эффект обусловлен его физико-химическими свойствами [3].

Одной из групп новых соединений, в отношении которых применение вышеуказанной ЛФ актуально, являются фотосенсибилизаторы (ФС), используемые для фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний. В частности, интерес представляют бактериохлорины с интенсивным поглощением в ближней ИК-области спектра, поскольку их терапевтическое окно поглощения (750–850 нм) расширяет возможности для диагностики и лечения злокачественных новообразований за счет проникновения в ткани на глубину до 20–25 мм и включения в используемые в настоящее время методы лечения более крупных и/или более глубокозалегающих в тканях опухолей.

Для большинства бактериохлоринов можно выделить общие недостатки, ограничивающие их применение в клинической практике [2]:

- низкая растворимость в воде, что приводит к ограничению применяемой дозы;
- недостаточный уровень селективности и накопления лекарственных веществ в опухолевых

тканях и, как следствие, снижение эффективности ФДТ;

- короткое время циркуляции и низкий уровень накопления ФС в органах и тканях-мишенях.

Таким образом, при получении новых форм для данной группы веществ важно учитывать вышеуказанные недостатки и подбирать оптимальную систему доставки, способную их преодолеть и повысить результативность метода ФДТ.

Идея терапевтического использования наночастиц на основе PLGA, содержащих дипропоксикабактериопурпуринимид (DPBPI), подразумевает избирательную доставку и контролируемое во времени высвобождение фотоактивной субстанции в опухолевой ткани, за счет чего снижается неспецифическая токсичность препарата, а также повышается его противоопухолевая эффективность. Кроме того, данная ЛФ позволяет обеспечивать длительное хранение препарата, а также быстрый и простой способ приготовления его потребительской формы.

Материалы и методы

Разработка технологии получения наночастиц PLGA-DPBPI

Используемые материалы

В работе использовали образец (DPBPI), полученный на кафедре химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского Российского технологического университета. Структурная формула

DPBPI приведена на рис. 1. Концентрацию DPBPI в образцах наночастиц и эмульсиях на основе кремфора определяли спектрофотометрически в длинноволновом максимуме поглощения ($\lambda = 802$ нм) с использованием коэффициента молярной экстинкции 30000 л/(моль·см) [4].

Метод получения наночастиц PLGA-DPBPI

В 2,0 мл хлористого метилена растворяли 3,0 мг DPBPI и 50,0 мг PLGA-COOH (вязкость – 0,17 дл/г в гексафторизопропанол, LACTEL® (Absorbable Polymers, США)) при перемешивании на магнитной мешалке 15 мин. Полученный раствор по каплям добавляли к 10,0 мл 1%-ого водного раствора поливинилового спирта (ПВС) в склянке Дрекселя на 150 мл и перемешивали с помощью магнитной мешалки Variomag Multipoint (Variomag, США) на скорости 1120 об/мин с помощью магнита 9*32 мм в течение 10 мин с закрытой пробкой. Затем эмульсию подвергали обработке гомогенизатором IKA Ultra Turrax T25 (IKA, Германия) (25000 rpm, 3 раза по 1 мин с интервалом в 1 мин). Из полученной эмульсии удаляли органический растворитель на роторном испарителе (LABOROTA 4000-EFFICIENT (Heidolph, Германия)) при вакууме 0,9–1,0 кгс/м² и температуре водяной бани 35°C до полного удаления органического растворителя. Затем суспензию центрифугировали при 14000 об/мин в течение 30 мин при +4°C в целях отделения от избыточного количества ПВС. Надосадочную жидкость декантировали, а осадок, содержащий наночастицы, суспендировали в 2 мл дистиллированной воды. Оса-

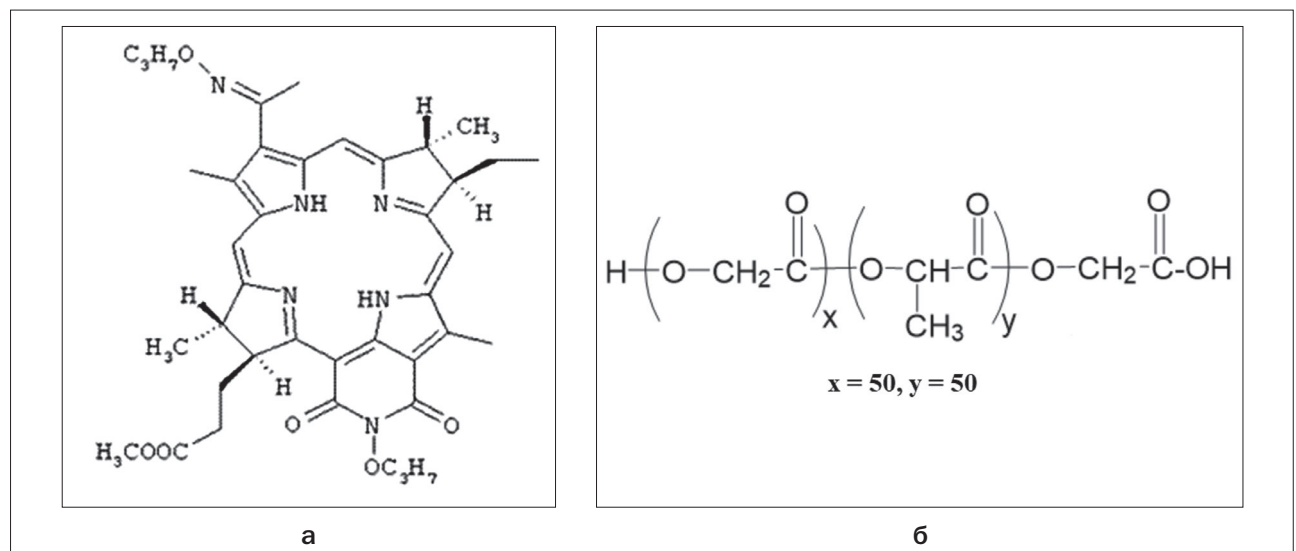


Рис. 1. Химические структуры:
 а. Дипропоксикабактериопурпуринимид (DPBPI);
 б. Соплимер молочной и гликолевой кислот (PLGA-COOH 50/50)

Fig. 1. The chemical structures of:
 a. Dipropoxybacteriopurpurinimide (DPBPI);
 b. Copolymer of lactic and glycolic acids (PLGA-COOH 50/50)

док в виде суспензии подвергали обработке ультразвуком (Transsonic T420 (Transsonic, США)) в течение 1 мин, затем добавляли криопротектор (D-маннит, 5,0 мг) и лиофилизировали в течение 24 ч, предварительно последовательно заморозив в морозильной камере (-20°C) и морозильной установке (-70°C). Полученные частицы хранили при +4°C без доступа света.

В соответствии с указанной методикой была осуществлена наработка наночастиц PLGA-DPBPI для дальнейших биологических исследований.

Определение размеров и ξ -потенциала наночастиц PLGA-DPBPI

Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния, а ξ -потенциал – электрофоретическим методом. Из испытуемого образца наночастиц PLGA-DPBPI готовили водную суспензию с концентрацией 1 мг/мл. Измерения проводили с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, Великобритания) с использованием стандартизованного протокола исследования (SOP).

Определение содержания воды в лиофилизате наночастиц PLGA-DPBPI методом К.Фишера (полумикрометод)

Испытуемый образец лиофилизата наночастиц PLGA-DPBPI в количестве от 20,0 до 100,0 мг (точная навеска) помещают в сосуд титратора (Metrohm 852 KF Titrando, Швейцария), добавляют 5,0 мл метилового спирта. Проводят титрование титрующим раствором (реактивом Фишера). Реактив Фишера представляет собой раствор серы диоксида, йода и пиридина в метаноле. Прибор автоматически отводит на растворение (или на суспендирование) образца перед анализом 10 с. С учётом значения титра определяют содержание воды. Проводили не менее двух параллельных измерений. Конец титрования определяли потенциометрически.

Содержание воды X (в %) вычисляли по формуле 1:

$$X = [(a - b) \times T \times 100] / v, \quad (1)$$

где a – объём реактива Фишера, израсходованный на титрование в основном опыте, мл; b – объём реактива Фишера, израсходованный на титрование в контрольном опыте, мл; v – навеска наночастиц, г; T – титр реактива Фишера, г/мл.

Определение общего содержания DPBPI и его степени включения в наночастицы PLGA-DPBPI спектрофотометрическим методом

Точная навеска (4,0 мг) лиофилизата наночастиц PLGA-DPBPI была растворена в 5 мл хлороформа. На спектрофотометре Helios α (Thermo Electron, США) регистрировали электронные спектры поглощения полученного раствора в диапазоне длин волн 200–1000

нм. По значениям интенсивности абсорбции раствора при длине волны 802 нм определяли концентрацию DPBPI. Расчет общего содержания DPBPI в образце наночастиц (m_{DPBPI} , мг) проводили следующим образом.

По формуле 2 была рассчитана молярная концентрация DPBPI (в моль/л) в растворе хлороформа:

$$C_m = D_{802} / K, \quad (2)$$

где D_{802} – оптическая плотность раствора образца на длине волны 802 нм, K – коэффициент молярной экстинкции субстанции, равный 30000 л/(моль·см).

Затем, с учётом известной молекулярной массы DPBPI (696,84 г/моль), по формуле 3 была рассчитана массовая концентрация DPBPI (в г/л) в полученном растворе:

$$C = C_m \times M_{DPBPI}, \quad (3)$$

где C_m – молярная концентрация субстанции в растворе, моль/л; M_{DPBPI} – молярная масса субстанции, г/моль.

По формуле 4 была рассчитана масса DPBPI (мг) в растворе хлороформа.

$$m_{DPBPI} = C \times V, \quad (4)$$

где C – массовая концентрация субстанции, мг/мл; V – объём раствора хлороформа, мл.

Общее содержание DPBPI (W_{DPBPI} , мг/г) в полученной партии частиц ($m_{НЧ}$, мг) определяли по формуле 5.

$$W_{DPBPI} = (m_{DPBPI} / m_{НЧ}) \times 1000, \quad (5)$$

где m_{DPBPI} – масса DPBPI в растворе хлороформа, мг; $m_{НЧ}$ – масса исследуемого образца наночастиц PLGA-DPBPI, мг.

Количество включенного DPBPI или степень его включения (S , % масс.) в наночастицы определяли по формуле 6.

$$S = (m_{DPBPI} / m_{загр}) \times 100\%, \quad (6)$$

где m_{DPBPI} – масса DPBPI в растворе хлороформа, $m_{загр}$ – масса DPBPI, изначально загруженная для получения наночастиц

Анализ морфологии наночастиц PLGA-DPBPI методом сканирующей электронной микроскопии

Из испытуемого образца наночастиц PLGA-DPBPI готовили водную суспензию с концентрацией 1 мг/мл, которую наносили с помощью микродозатора на двусторонний углеродный скотч. Оставляли высыхать примерно на 20 мин. Изображения образцов получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JSM-7401F (JEOL, Япония).

Анализ морфологии наночастиц PLGA-DPBPI методом просвечивающей электронной микроскопии

Для проведения данного анализа 5–10 мкл водной суспензии исследуемых образцов наночастиц с кон-

центрацией 1 мг/мл наносили на свежеионизированные угольно-формваровые пленки-подложки, через 2 мин избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой и препараты контрастировали 1%-ым водным раствором ацетата уранила. Препараты анализируются на электронном микроскопе (JEOL 100CX, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Негативы (увеличение в 20000–50000 раз) сканировали с разрешением 1200 dpi (dots per inch – точек на 1 дюйм).

Исследования in vitro

Используемые материалы

Для проведения экспериментов *in vitro* в качестве биологической модели были использованы клетки немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549. Культивирование клеток проводили в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10%-ой эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мМ глутамин (ПанЭко, Россия) при температуре 37°C в 5%-ой атмосфере CO₂, далее называемой полной средой. Клетки пересеивали 2 раза в неделю. Жизнеспособность клеток, использованных в экспериментах, составляла не менее 95%.

Подготовка образцов для проведения экспериментов in vitro

Наночастицы, нагруженные DPBPI (PLGA-DPBPI), суспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) до достижения концентрации 0,3 мМ по активному веществу, получая при этом суспензию (исследуемый образец). Положительный контроль получали путем растирания сухого порошка DPBPI в полиэтиленовом масле – кремофоре EL (CrEL), с дальнейшей обработкой ультразвуком на ультразвуковой бане в течение 20 мин и последующим разбавлением 50 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7,4) до 10% CrEL. Концентрация DPBPI в составе эмульсии кремофора EL (CrEL-DPBPI) составляла 0,6 мМ. В экспериментах использовали свежеприготовленные суспензии PLGA-DPBPI и эмульсию CrEL-DPBPI.

Исследование накопления PLGA-DPBPI в клетках немелкоклеточной карциномы легкого человека A549

Для оценки внутриклеточной интернализации PLGA-DPBPI и CrEL-DPBPI, клетки линии A549 при достижении логарифмической фазы роста высевали на покровные стекла в 24-луночные планшеты (в концентрации 7,5·10⁴ кл/луночка) и инкубировали сутки при +37°C в 5%-ой атмосфере CO₂ до достижения конfluence 70%. Клетки инкубировали с исследуемым образцом и положительным контролем в концентрациях 4 и 8 мкМ в течение 2 ч. Внутриклеточное распределение (визуализировали флуоресценцию DPBPI) изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ЛСКМ) LSM710META

(Zeiss, Германия). Все конфокальные флуоресцентные изображения были получены с использованием масляноиммерсионного х63 объектива (C-Apochromat, числовая апертура 1,46). Латеральное разрешение составляло 0,3 мкм, аксиальное разрешение – 1,5 мкм. Флуоресценцию образцов возбуждали гелий-неоновым лазером (543 нм). Для регистрации флуоресценции использовали APD-детекцию с длинноволновым барьерным фильтром с границей 655 нм. Полученные изображения были обработаны в программе ImageJ.

Исследование фотоиндуцированной цитотоксичности PLGA-DPBPI in vitro

Для изучения фотоиндуцированной цитотоксичности образца PLGA-DPBPI клетки A549 высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (плотность посева составляла 2,0·10⁴, 1,2·10⁴ и 0,7·10⁴ кл/луночка). Исследуемые образцы вносили в лунки через 24 ч с интервалом концентраций образцов от 14,0 мкМ до 0,010 мкМ, полученных путем двукратного разбавления. Оценку темновой цитотоксичности частиц PLGA-DPBPI проводили через 72 ч после внесения образца к клеткам A549 с плотностью 0,7·10⁴ кл/луночка. Для CrEL-DPBPI оценку темновой цитотоксичности проводили аналогичным образом через 5 и 8 ч.

Оценку фотоиндуцированной цитотоксичности образцов при различной плотности посева клеток A549 проводили после инкубации клеток с образцами в полной среде в тестируемых диапазонах концентраций в течение 2 ч с последующим облучением в течение 15 мин с помощью 500 Вт галогеновой лампы через водный фильтр толщиной 5 см и широкополосный фильтр (пропускание 680–1000 нм, световая доза составляла 13,5 Дж/см²).

Для оценки фотоиндуцированной цитотоксичности исследуемых образцов в зависимости от световой дозы облучения клетки с плотностью 0,7·10⁴ кл/луночка инкубировали с образцами в полной среде в течение 2 ч, затем трижды отмывали средой DMEM без сыворотки, добавляли к клеткам свежую полную среду и проводили облучение с помощью 500 Вт галогеновой лампы через водный фильтр толщиной 5 см и широкополосный фильтр (пропусканием 680–1000 нм) в течение 15 (13,5 Дж/см²), 30 (27,0 Дж/см²) или 45 (40,5 Дж/см²) мин.

После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 3 ч, а затем окрашивали Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США) и пропидий иодидом (PI) (Sigma-Aldrich, США). Hoechst 33342 (4 мкМ) и PI (6 мкМ) добавляли к клеткам за 15 мин до окончания инкубации. Результат фотодинамического воздействия анализировали при помощи эпи-флуоресцентной микроскопии, используя флуоресцентный микроскоп Axio Observer (Zeiss, Германия). Окрашенные клетки помещали в планшете на предметный

столик инвертированного микроскопа и с помощью цифровой камеры регистрировали флуоресцентные изображения свечения Hoechst 33342 ($\lambda_{\text{возб}}$ 359–371 нм, $\lambda_{\text{рег}} > 397$ нм) и PI ($\lambda_{\text{возб}}$ 530–585 нм, $\lambda_{\text{рег}} > 615$ нм) в клетках. Полученные изображения были обработаны в программе ImageJ, было получено общее число клеток и число погибших клеток для каждой выборки. В каждой выборке просчитывалось 300–400 клеток. По результатам измерений строили график зависимости процента выживших клеток от концентрации образцов. Для сравнения фотоиндуцированной цитотоксичности образцов рассчитывали величины LC_{50} и LC_{90} , соответствующие концентрациям PLGA-DPBPI и CrEL-DPBPI по активному веществу, при которых наблюдается 50 и 90% гибель клеток, соответственно.

Исследования *in vivo*

Используемые материалы

Для проведения экспериментов *in vivo* использовали мышей-гибридов первого поколения F1 (CBA x C57Bl/6J), самок (возраст 7–9 нед, вес тела 18–22 г), которых получали из питомника лабораторных животных «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Животные содержались в отдельных комнатах, в контролируемых условиях окружающей среды. Для экспериментов мышам прививали опухолевые клетки саркомы мягких тканей мыши линии S37 по $1 \cdot 10^6$ клеток подкожно в область икроножной мышцы с внешней стороны бедра. Штамм S37 поддерживали в асцитной форме на мышях самцах линии ICR (CD-1). Исследования проводили на 7 сутки после инокуляции опухоли, когда ее объем достигал 130–160 мм³.

Все манипуляции проводили в соответствии с национальными и международными правилами о гуманном обращении с животными [5, 6].

Подготовка образцов для проведения экспериментов *in vivo*

Для оценки распределения ФС в составе наночастиц в органах и тканях мышей, а также в целях изучения фотоиндуцированной противоопухолевой активности был использован образец PLGA-DPBPI с содержанием активного вещества 13,6 мг/г. Для получения потребительской формы навеска образца вносилась в 0,9%-ый раствор хлорида натрия с получением стабильной суспензии розового цвета.

Оценка распределения PLGA-DPBPI в тканях и органах животных

Изучение биораспределения DPBPI, входящего в состав наночастиц PLGA-DPBPI (доза 7,5 мг/кг по DPBPI, внутривенный путь введения), проводили *ex vivo* на мышях с развитой опухолью методом локальной флуоресцентной спектроскопии. Флуоресценцию регистрировали контактным способом на лазерном

спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей «ЛЭСА» (ООО «Биоспек», Россия).

Объектами исследования являлись опухолевая ткань, кожа и мышца, печень, почки, селезенка, сальник и кровь, полученные от трех животных на каждый интервал наблюдения (0,25, 2, 4, 24 и 48 ч). При возбуждении флуоресценции в красной области спектра (632,8 нм) интегральную интенсивность флуоресценции в спектральном диапазоне измерений (640–900 нм) нормировали на интегральную интенсивность сигнала обратного диффузного рассеяния в ткани возбуждающего лазерного излучения, определяя нормированную флуоресценцию (ФН) в тканях. Накопление PLGA-DPBPI в тканях оценивали по максимальным значениям ФН при длине волны, соответствующей максимуму флуоресценции DPBPI. В ходе исследования рассчитывали флуоресцентную контрастность (ФК) как отношение ФН в опухоли к ФН в коже.

Изучение эффективности фотодинамической терапии с использованием наночастиц PLGA-DPBPI

Фотодинамическую терапию проводили дистанционно на седьмой день роста опухоли саркомы S37 у мышей с введенными частицами PLGA-DPBPI в дозе 2,5 мг/кг по активному компоненту – DPBPI. Животным контрольной группы вводили внутривенно изотонический 0,9%-ый раствор хлорида натрия. В качестве анестезии применяли дроперидол (раствор для инъекций 2,5 мг/мл, ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) в дозе 0,25 мг/мышь внутривентриально. К моменту проведения ФДТ объем опухолей варьировал от 130 до 160 мм³. Для облучения использовали светодиодный источник с длиной волны 810 ± 21 нм (ФГУП ГНЦ НИО-ПИК, Россия): плотность мощности 100 мВт/см² и плотность энергии 150 Дж/см². Интервал между введением ФС и облучением составил 2 ч. За животными, у которых не было продолженного роста опухоли, наблюдали 90 сут после лечения. Оценка противоопухолевого эффекта проводили по средним значениям объема опухоли торможению роста опухоли, увеличению продолжительности жизни и критерию излеченности в контрольной и опытной группах [7]. Объем опухоли (в мм³) рассчитывали по формуле 7:

$$V = a \times b \times c, \quad (7)$$

где a – длина, b – ширина и c – высота опухолевого узла.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента. Для построения графиков и статистической обработки использовали программы OriginPro 8 SRO (OriginLab Corporation, USA), Excel (Microsoft) и Statistica 8 (StatSoft).

Результаты и обсуждение

Разработка технологии получения наночастиц PLGA-DPBPI и их физико-химические свойства

Получение частиц, содержащих DPBPI, проводили с использованием метода одинарных эмульсий [2]. В рамках разработки технологии проводили подбор оптимального состава полимерной композиции: концентрация поверхностно-активного вещества (ПВС) и соотношение органической фазы к водной (О/В). Параметры технологического процесса получения частиц и их характеристики представлены в табл. 1. Также в рамках разработки проводили подбор технологических параметров, таких как тип гомогенизации (с использованием погружного гомогенизатора, либо с применением ультразвукового (УЗ)), метод удаления органического растворителя (с использованием диффузии или вакуума), время центрифугирования суспензии частиц.

Как видно из табл. 1, увеличение концентрации ПВС приводит к увеличению среднего размера частиц и индекса полидисперсности (ПДИ) (образцы 3, 9). Уменьшение концентрации ПВС, напротив, снижает средний размер частиц (образцы 4, 10), но приводит к получению частиц с меньшим содержанием DPBPI за счет увеличения общей массы образца наночастиц PLGA-DPBPI, в связи с чем был выбран 1%-ый ПВС, позволяющий получать частицы меньшего диаметра без видимого снижения общего содержания препарата. Наиболее оптимальным соотношением О/В является 1:5, поскольку уменьшение соотношения до 1:2,5 приводило к резкому увеличению размера и увеличению полидисперсности системы (образец 6), а увеличение соотношения до 1:10 (образец 5) не способствовало существенному снижению размера, однако снижало общее содержание DPBPI в частицах. Использование УЗ-гомогенизатора

Таблица 1

Влияние технологических параметров на основные физико-химические характеристики полученных частиц PLGA-DPBPI

Table 1

The influence of technological parameters on the major physico-chemical characteristics of the obtained PLGA-DPBPI NPs

№ образца PLGA-DPBPI PLGA-DPBPI sample №	ПВС, % PVA, %	О/В O/W	Удаление растворителя Evaporation of organic solvent	Тип гомогенизатора Homogenizer type	t, мин t, min	W _{DPBPI} мг/г W _{DPBPI} mg/g	S, % масс. S, % w.	Средний диаметр, нм Mean diameter, nm	ξ-потенциал, мВ ξ-potential, mV	ПДИ PDI
1	1	1:5	Диффузия Diffusion	Погружной гомогенизатор Immersion homogenizer	15	9,6	28,7	485,1±2,3	-23,8±4,09	0,392
2	1	1:5			15	9,5	26,3	490,1±3,0	-24,6±2,87	0,230
3	2	1:5			15	13,4	35,1	761,3±4,5	-27,4±2,65	0,354
4	0,5	1:5			15	10,2	46,8	540,8±2,4	-20,1±3,42	0,325
5	1	1:10			15	8,1	72,6	523,2±2,2	-17,2±3,21	0,263
6	1	1:2,5			15	10,4	63,4	834,3±1,7	-14,4±2,86	0,368
7	1	1:5			30	13,6	86,1	222,6±2,8	-26,3±4,61	0,144
8	1	1:5	Вакуум Vacuum	УЗ-гомогенизатор US-homogenizer	30	16,9	36,4	261,5±3,2	-23,2±3,92	0,205
9	2	1:5		Погружной гомогенизатор Immersion homogenizer	30	15,6	25,2	340,2±2,4	-20,3±2,47	0,356
10	0,5	1:5			30	12,4	30,3	245,1±3,6	-19,2±4,06	0,232

О/В – соотношение органической фазы к водной; t – время центрифугирования

ПДИ – индекс полидисперсности

O/W – ratio of organic phase to water; t – centrifugation time

PDI – polydispersity index

способствовало незначительному увеличению размера частиц (образец 8), однако степень включения препарата оказалась намного ниже, в связи с чем использование погружного гомогенизатора являлось наиболее актуальным. Удаление растворителя для всех частиц проводили с использованием вакуума, поскольку применение диффузии при атмосферном давлении привело к получению частиц с широкими пиками распределения по размерам и образованию полидисперсной системы (образец 1). Увеличение времени центрифугирования суспензии частиц с 15 до 30 мин, в свою очередь, позволило также снизить средний размер частиц в образце с одновременным снижением ПДИ, что говорит о подборе оптимальных условий получения частиц с заданными характеристиками.

В результате были подобраны оптимальные параметры метода получения частиц PLGA-DPBPI (образец 7), позволяющие получать частицы с улучшенными физико-химическими характеристиками, такими, как максимальные значения общего содержания вещества и степени сорбции, монодисперсное распределение частиц по размерам (ПДИ меньше 0,250), средний диаметр частиц меньше 250 нм, чем и обусловлен их выбор для дальнейших экспериментов. В полученном лиофилизате наночастиц PLGA-DPBPI (образец 7) было определено содержание воды, которое составило не более 1,5%, что было учтено во всех расчетах. Полученные значения общего содержания DPBPI указаны в пересчете на безводное вещество.

Размер частиц и их сферическую форму подтвердили с помощью просвечивающей электронной ми-

кроскопии и сканирующей электронной микроскопии (рис. 2).

Таким образом, дальнейшие эксперименты по изучению эффективности интернализации опухолевыми клетками полученных частиц и их фотодинамической активности на моделях *in vitro* и *in vivo* были проведены с использованием PLGA-DPBPI-7.

Биологические свойства PLGA-DPBPI. Исследования *in vitro*

Исследование накопления PLGA-DPBPI в клетках аденокарциномы легкого A549

Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) было установлено, что DPBPI, входивший в состав частиц PLGA-DPBPI, накапливается в цитоплазматической области клеток A549. При этом наблюдается концентрирование DPBPI в везикулярных клеточных структурах субмикронного размера, а также диффузное окрашивание цитоплазмы (рис. 3 II). Наблюдается частичная со-локализация наночастиц с липидными каплями (рис. 3ж, з), что характерно для циклоимидных производных бактериохлорина p [8].

Поскольку DPBPI обладает гидрофобными свойствами, в группе контроля в качестве солюбилизатора был выбран кремофор EL (CrEL), способный стабилизировать не агрегированную форму тетрапиррольных соединений в водных растворах и не токсичный для клеток *in vitro* в низких концентрациях [8–10]. Важно отметить, что CrEL используется в клинической практике [11].

В клетках, инкубируемых с CrEL-DPBPI, методом ЛСКМ обнаружено сходное с наночастицами внутриклеточное распределение DPBPI. (рис. 3 I). Таким

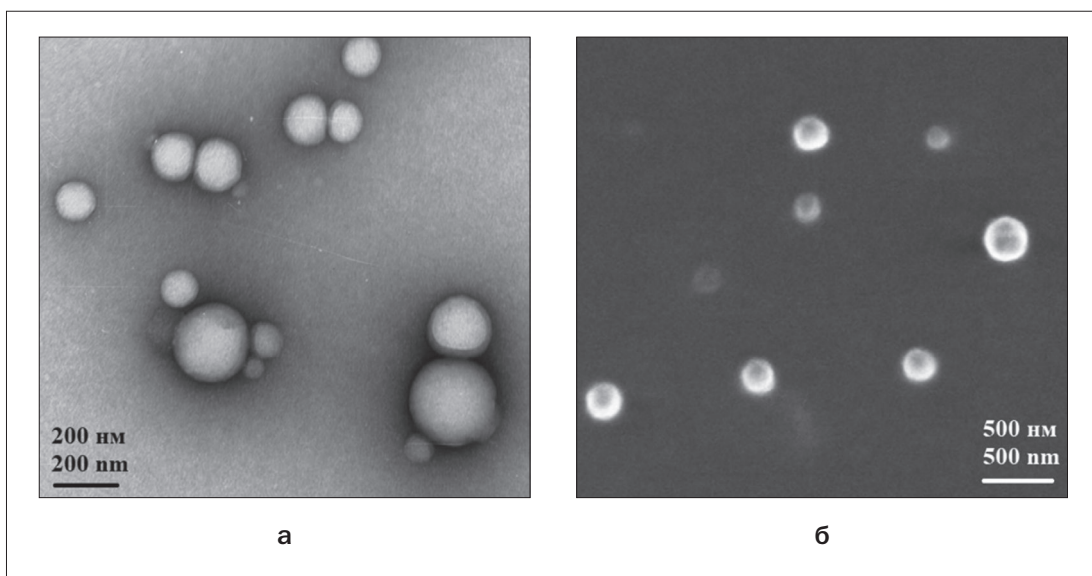


Рис. 2. Микрофотографии частиц PLGA-DPBPI, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (а) и сканирующей электронной микроскопии (б)
Fig. 2. TEM (a) and SEM (б) microphotographs of PLGA-DPBPI NPs

образом, включение DPBPI в состав наночастиц не блокирует его проникновение в клетки и не влияет на характер внутриклеточного распределения DPBPI.

Исследование фотоиндуцированной цитотоксичности PLGA-DPBPI

В экспериментах по изучению цитотоксичности PLGA-DPBPI было установлено, что образец PLGA-DPBPI не проявлял токсичности в отношении клеток A549 при высоких концентрациях и длительных временах инкубации (более 8 ч), в то время как применение DPBPI, входящего в состав CrEL-DPBPI (положительного контроля), было ограничено цитотоксичностью CrEL. Максимальные показатели для его использования составляют не более 5 ч с концентрацией не выше 14 мкМ (рис. 4).

При исследовании фотоиндуцированной цитотоксичности было показано, что частицы PLGA-DPBPI вызывают концентрационно-зависимую гибель клеток A549 (рис. 5). При различной плотности посева клеток ($0,7 \cdot 10^4$ кл/лунка; $2 \cdot 10^4$ кл/лунка, рис. 5а) отношение параметров LC_{50} и LC_{90} (концентрации, вызывающие гибель 50% и 90% клеток, табл. 2) PLGA-DPBPI к CrEL-DPBPI сохраняется и составляет $1,6 \pm 0,1$ (табл. 3). Уве-

личение световой дозы приводит к усилению фотодинамической активности обеих форм DPBPI (рис. 5, табл. 2). Проведение отмывки клеток A549 после 2 ч инкубации с PLGA-DPBPI или CrEL-DPBPI перед облучением не привело к снижению фотодинамического эффекта (рис. 5б). Следовательно, фотоиндуцированная гибель клеток происходит вследствие активации внутриклеточной концентрации PLGA-DPBPI или положительного контроля (рис. 5, табл. 2). Фотодинамический эффект PLGA-DPBPI может лимитироваться скоростью внутриклеточного высвобождения активного вещества из наночастиц, в связи с чем, была исследована фотоиндуцированная цитотоксичность соединений при различном времени облучения. Предварительно образцы были удалены из клеточной среды (проводили отмывку клеток через 2 ч инкубации с образцами). Увеличение времени облучения и, следовательно, световой дозы облучения привело к увеличению фотодинамического эффекта как для PLGA-DPBPI, так и для CrEL-DPBPI (рис. 5б, табл. 2). Отношение параметров LC_{50} и LC_{90} PLGA-DPBPI к CrEL-DPBPI варьируется в пределах $1,6 \div 2,4$ (табл. 3). При этом двукратное увеличение дозы (и двукратное увеличение времени облучения) способствовало снижению LC_{50} в

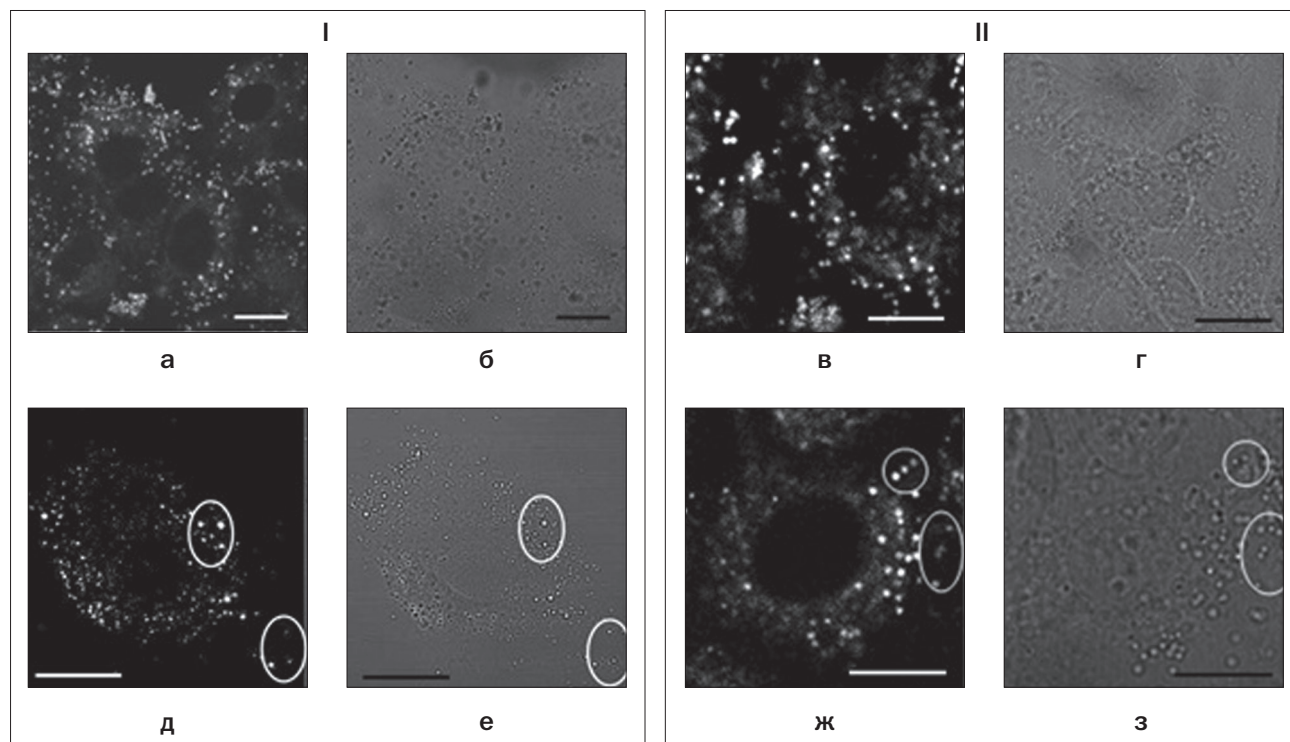


Рис. 3. Типичное внутриклеточное распределение DPBPI, входящего в состав CrEL-DPBPI (I) и PLGA-DPBPI (II), в клетках немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549, полученные методом ЛСКМ (а, в, д, ж) и в проходящем белом свете (б, г, е, з) после инкубации клеток с образцами в концентрации 4 мкМ в течение 2-х ч. На изображениях д-з показана со-локализация DPBPI с липидными каплями (области обведены овалами). Масштаб соответствует 15 мкм

Fig. 3. Typical intracellular distribution of DPBPI in CrEL-DPBPI (I) and PLGA-DPBPI (II) complexes inside A549 human non-small lung cancer cells. Images were obtained by LSCM (a, в, д, ж) and in transmitted white light (б, г, е, з) after incubation of cells with samples at the concentration of 4 μ m for 2 h. The co-localization of DPBPI with lipid drops (the areas are circled ovals) is shown in the images д-з. Scale bar is equal to 15 μ m

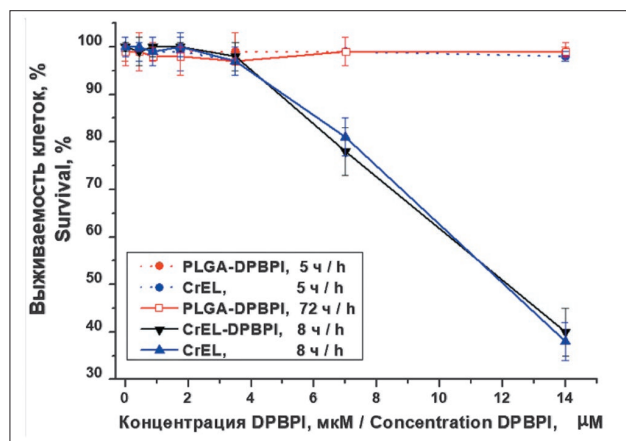


Рис. 4. Выживаемость клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549 от концентрации PLGA-DPBPI, CrEL-DPBPI и CrEL при различном времени инкубации при изучении темновой цитотоксичности

Fig. 4. Survival of non-small cell lung carcinoma cells of the A549 line from the concentration of PLGA-DPBPI, CrEL-DPBPI and CrEL at different times of incubation in the study of dark cytotoxicity

2,53 раза для положительного контроля и в 1,75 раз для PLGA-DPBPI. Дальнейшее увеличение дозы (времени облучения) в 1,5 раза снизило LC_{50} в 1,49 раз для положительного контроля, тогда как для исследуемого образца значение LC_{50} снизилось в 1,7 раз.

Таким образом, применение DPBPI в составе наночастиц PLGA-DPBPI способствует накоплению DPBPI в цитоплазме опухолевых клеток A549 и вызывает фотоиндуцированную цитотоксичность, что подтверждает сохранение фотодинамических свойств DPBPI после включения его в состав полимерной формы.

При увеличении времени облучения и световой дозы фотоиндуцированная цитотоксичность PLGA-DPBPI возрастает линейно, в то время как для CrEL-DPBPI наблюдается тенденция к снижению.

Биологические свойства PLGA-DPBPI. Исследования in vivo

Распределение PLGA-DPBPI в тканях и органах животных

При анализе спектров флуоресценции, полученных *ex vivo* после внутривенного введения мышам DPBPI, установлено, что максимум флуоресценции для красителя в органах и тканях животных регистрировался при 817±3 нм.

Исследованный препарат в виде наночастиц PLGA-DPBPI при внутривенном введении сравнительно быстро поступал в ткань опухоли S37, уровень ФН достигал максимального значения через 2 ч после введения и составлял 7,1±1,1 отн. ед. (табл. 4). Через 48 ч средний уровень ФН в опухоли составлял 9,8% от максимального зарегистрированного значения.

В нормальной коже максимальное накопление DPBPI определялось в интервале времени от 0,25 до 2 ч после внутривенного введения красителя (величина ФН составила 2,6±0,3 – 3,5±0,3 отн. ед.), а через 24 ч DPBPI уже не определялась. Максимальная величина ФК относительно кожи регистрировалась в интервале времени от 2 до 4 ч после введения красителя и составляла 2,7–3,0 отн. ед.

В связи с этим при ФДТ облучение следует проводить через 2 ч после введения наночастиц PLGA-

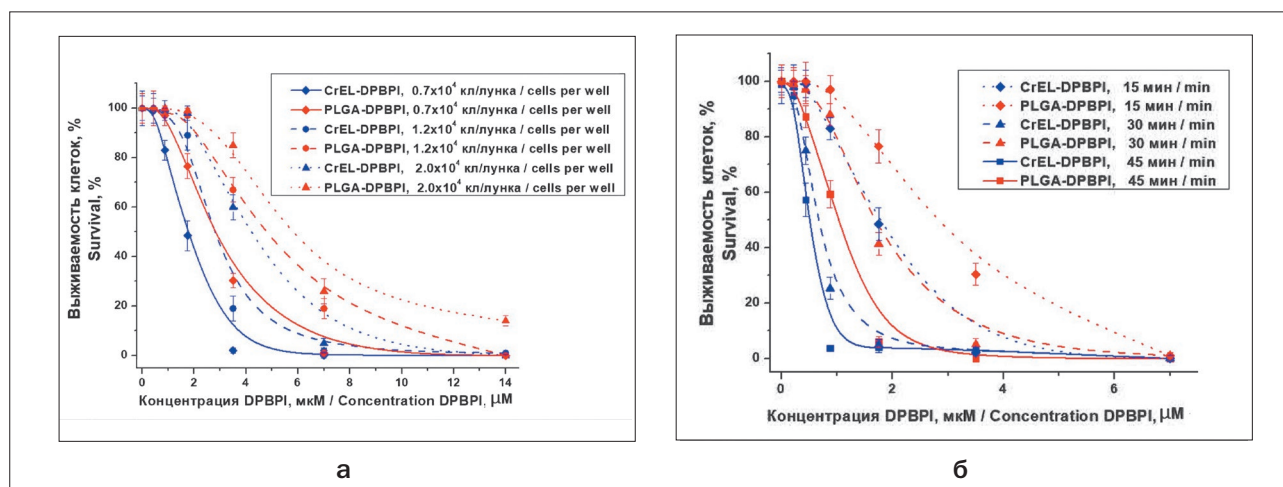


Рис. 5. Выживаемость клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549 от концентрации CrEL-DPBPI и PLGA-DPBPI при изучении фотоиндуцированной цитотоксичности, где (а) – после 2 ч инкубации и облучения галогенной лампой в течение 15 мин (13,5 Дж/см²) при различной плотности клеток; (б) – после 2 ч инкубации, отмывки клеток от соединений во внешней среде и облучения галогенной лампой в течение различного времени облучения. Плотность клеток 0,7·10⁴ кл/лунка

Fig. 5. Survival of non-small cell lung carcinoma cells of the A549 line from the concentration of CrEL-DPBPI and PLGA-DPBPI in the study of photoinduced cytotoxicity. (a) – after 2 hours of incubation and irradiation with a halogen lamp for 15 minutes (13.5 J/cm²) at different cell densities; (b) – after 2 hours of incubation, washing cells from compounds in the environment and irradiation with a halogen lamp for various irradiation times. The density of cells was 0.7·10⁴ cells/well

DPBPI, когда накопление в опухоли и флуоресцентная контрастность достигают максимального значения.

В кровотоке DPBPI определялось в течение суток после введения. В мышечной ткани и сальнике были зарегистрированы невысокие значения нормированной флуоресценции ($4,3 \pm 0,4$ отн. ед. и $4,8 \pm 0,6$ отн. ед., соответственно), которые через сутки снижались на 71,4% и 83,3% от максимального зарегистрированного значения, соответственно. Через 48 ч в коже и сальнике ФН определялось на уровне фона. В основных внутренних органах максимальное накопление DPBPI зарегистрировано в печени и селезенке через 15 мин после введения, ФН составляла $31,3 \pm 1,4$ отн. ед. и $25,9 \pm 1,8$ отн. ед., соответственно. Через 24 ч после внутривенного введения красителя уровень нормированной флуоресценции в печени и селезенке снижался на 88,5% и 89,7% от максимального значения, соответственно, а через 48 ч отмечены только фоновые значения. В почках максимальные значения нормированной флуоресценции DPBPI регистрировались через 2 ч после введения ($12,0 \pm 0,2$ отн. ед.), а через 48 ч флуоресценция в почках определялась на уровне фона. Полученные данные свидетельствуют о быстрой элиминации фотосенсибилизатора из организма мышей и о преимущественном выведении соединения через выделительную систему печени.

Фотоиндуцированная противоопухолевая активность PLGA-DPBPI у мышей с саркомой S37

При проведении ФДТ с PLGA-DPBPI у облученных животных с саркомой S37 в течение 2-х ч развивался отек, который сохранялся до 4 сут. Гибели животных

от фототоксического шока после сеанса ФДТ отмечено не было.

Из представленных на рис. 6 и 7 данных видно, что фотосенсибилизатор обладает противоопухолевой эффективностью. При использовании PLGA-DPBPI в дозе 2,5 мг/кг (по действующему веществу) и интервале между облучением и введением в 2 ч, среднее значение объема опухоли в опытной группе увеличивалось медленно по отношению к объему опухоли контрольной группы, торможение роста опухоли (ТРО) на 22 сут после сеанса ФДТ составило 71%. Максимальное значение ТРО составило 78% на 11 сут. В течение 90 сут у 33% мышей не было выявлено продолженного роста опухоли.

Таким образом, воздействие ФДТ на перевивную опухоль S37 с применением PLGA-DPBPI позволяет достичь выраженного противоопухолевого эффекта при данной постановке эксперимента (УПЖ – 83%, КИ – 33%).

Заключение

Авторами была разработана технология получения наночастиц на основе PLGA, содержащих в своем составе DPBPI и обладающих оптимальными физико-химическими характеристиками, такими, как средний размер частиц, значение ξ – потенциала, степень включения и содержание субстанции в частицах. В экспериментах *in vitro* регистрировалось внутриклеточное накопление и распределение DPBPI в составе частиц PLGA-DPBPI в клетках A549, характер которого совпадал с распределением DPBPI в составе контрольной композиции (CrEL-DPBPI). Было показано

Таблица 2

Значения LC_{90} и LC_{50} для CrEL-DPBPI и PLGA-DPBPI при различной концентрации клеток (облучение галогенной лампой в течение 15 мин, $13,5 \text{ Дж/см}^2$) и времени облучения (плотность клеток $0,7 \cdot 10^4$ кл/лунка, с проведением отмывки)

Table 2

The values of LC_{90} and LC_{50} for CrEL-DPBPI and PLGA-DPBPI at various cells concentrations (halogen lamp exposure for 15 minutes (13.5 J/cm^2)) and irradiation time (cell density of $0.7 \cdot 10^4$ cells / well, with washing)

Концентрация клеток, кл/лунку Cells concentration, cells/well	LC_{90} , мкМ LC_{90} , μM		LC_{50} , мкМ LC_{50} , μM	
	PLGA-DPBPI	CrEL-DPBPI	PLGA-DPBPI	CrEL-DPBPI
$0,7 \cdot 10^4$	$4,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$
$1,2 \cdot 10^4$	$8,0 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$
$2 \cdot 10^4$	$8,5 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$
Время облучения, мин (световая доза, Дж/см ²) Exposure time, min (light dose, J/cm ²)	LC_{90} , мкМ LC_{90} , μM		LC_{50} , мкМ LC_{50} , μM	
	PLGA-DPBPI	CrEL-DPBPI	PLGA-DPBPI	CrEL-DPBPI
15 (13,5)	$4,7 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$
30 (27)	$2,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,1$	$0,67 \pm 0,05$
45 (40,5)	$1,6 \pm 0,1$	$0,67 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,03$

Таблица 3

Отношения $(LC_{90,2})/(LC_{90,1})^*$ и $(LC_{50,2})/(LC_{50,1})^*$ для CrEL-DPBPI (1) и PLGA-DPBPI (2) при различной концентрации клеток (облучение галогенной лампой в течение 15 мин (13,5 Дж/см²) и времени облучения (плотность клеток 0,7·10⁴ кл/лунка, с проведением отмывки)

Table 3

$(LC_{90,2})/(LC_{90,1})^*$ and $(LC_{50,2})/(LC_{50,1})^*$ rates for CrEL-DPBPI (1) and PLGA-DPBPI (2) at various cell concentrations (halogen lamp exposure for 15 minutes (13.5 J/cm²)) and irradiation time (cell density of 0,7·10⁴ cells / well, with washing)

Концентрация клеток, кл/лунка Cells concentration, cells/well	$(LC_{90,2})/(LC_{90,1})$	$(LC_{50,2})/(LC_{50,1})$
0,7·10 ⁴	1,62	1,65
1,2·10 ⁴	2,05	1,68
2,0·10 ⁴	1,60	1,51
Время облучения, мин (световая доза, Дж/см ²) Exposure time, min (light dose, J/cm ²)	$(LC_{90,2})/(LC_{90,1})$	$(LC_{50,2})/(LC_{50,1})$
15 (13,5)	1,62	1,65
30 (27)	2,27	2,39
45 (40,5)	2,39	2,13

^{*}(1) – CrEL-DPBPI; (2) – PLGA-DPBPI

Таблица 4

Интенсивность нормированной флуоресценции DPBPI в органах и тканях мышей с саркомой S37 после введения наночастиц PLGA-DPBPI в дозе 7,5 мг/кг

Table 4

The intensity of the normalized fluorescence of DPBPI in organs and tissues of mice with S37 sarcoma after administration of PLGA-DPBPI polymer particles at a dose of 7.5 mg / kg

Органы и ткани Organs and tissues	Контроль* (Фон) Control* (Background)	Нормированная флуоресценция (ФН), отн. ед. Normalized fluorescence (FN), rel.units				
		Сроки измерения нормированной флуоресценции после введения образца, ч The timing of the measurement of normalized fluorescence after the introduction of the sample, h				
		0,25	2	4	24	48
Опухоль Tumor	3,0±0,2	4,5±0,4	7,1±1,1	5,4±0,7	3,9±0,1	3,4±0,1
Кожа Skin	1,5±0,1	3,5±0,3	2,6±0,3	1,8±0,2	1,6±0,1	1,6±0,1
Мышца Muscle	2,7±0,1	4,1±0,5	4,3±0,4	3,9±0,3	3,1±0,4	2,8±0,1
Сальник Adipose tissue	3,0±0,3	4,2±0,2	4,8±0,6	3,2±0,2	3,2±0,2	3,1±0,1
Печень Liver	7,8±0,2	31,2±1,4	23,4±1,0	18,3±0,1	10,5±0,3	8,6±0,6
Почки Kidneys	7,6±0,2	10,8±0,2	12,0±0,2	9,8±1,2	8,3±0,1	7,8±0,2
Селезенка Spleen	9,4±0,3	25,9±1,8	20,7±1,0	17,0±0,9	11,1±0,6	10,2±0,5
Кровь Blood	4,0±0,5	22,3±0,2	7,7±0,1	6,1±0,1	4,2±0,1	3,9±0,1
ФК** FC**	-	1,3	2,7	3,0	2,4	2,1

* Контроль – мыши без воздействия (фон);

** ФК (флуоресцентная контрастность) = $FN_{\text{опухоль}} / FN_{\text{кожа}}$

* Control – mice without exposure (background);

** FK (fluorescent contrast) = $FN_{\text{tumor}} / FN_{\text{skin}}$, rel. units.

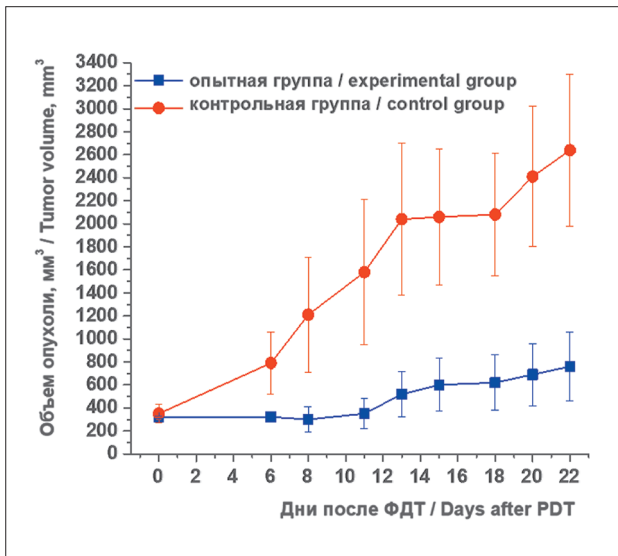


Рис. 6. Объем опухоли S37 у мышей после проведения ФДТ (150 Дж/см², время экспозиции 2 ч) после введения PLGA-DPBPI (в дозе 2,5 мг/кг) в контрольной и опытной группах
Fig. 6. S37 tumor volume in mice after PDT (150 J/cm², exposure time 2 h) after administration of PLGA-DPBPI (at a dose of 2.5 mg/kg) in the control and experimental groups

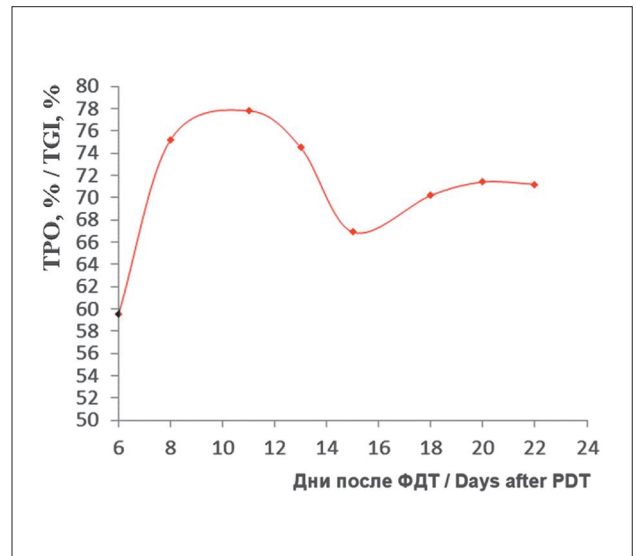


Рис. 7. Торможение роста опухоли (ТРО, %) на 6–22 сут после проведения ФДТ (150 Дж/см², время экспозиции 2 ч) с использованием PLGA-DPBPI (в дозе 2,5 мг/кг)
Fig. 7. Inhibition of tumor growth (TGI, %) on days 6–22 after PDT (150 J/cm², exposure time 2 hours) using PLGA-DPBPI (2.5 mg/kg)

отсутствие темновой цитотоксичности частиц при высоких концентрациях и длительных временах инкубации. Противоопухолевая эффективность частиц PLGA-DPBPI была сопоставима с эффектом CrEL-DPBPI, что подтверждает сохранение фотоиндуцированной активности DPBPI после включения его в состав полимерной матрицы. В экспериментах *in vivo* было показано накопление частиц в опухолевой ткани с ФК до 3,0 отн. ед., а также практически полное выведение

DPBPI из организма через 48 ч. Для кожи это значение составило 24 ч, что немаловажно с учетом специфики проведения процедуры фотодинамической терапии. Также была доказана противоопухолевая фотоиндуцированная активность использования PLGA-DPBPI при проведении ФДТ на модели саркомы мягких тканей S37, излеченность животных достигала 33%. Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности дальнейшего изучения частиц PLGA-DPBPI.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis // *Biochem. J.* – 2004. – No. 377. – P. 159–169.
2. Сапельников М.Д., Панов А.В., Никольская Е.Д., Грин М.А. Разработка систем доставки высокоэффективных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии рака // *Биофармацевтический Журнал* – 2018. – Т. 10, № 1. – С. 14–25.
3. Nikolskaya E., Sokol M., Faustova M., et al. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release // *Acta of Bioeng. and Biomech.* – 2018. – Vol. 20, No. 1. – P. 65–77.
4. Пантюшенко И.В., Грин М.А., Якубовская Р.И. и др. Новый высокоэффективный ИК-фотосенсибилизатор в ряду бактериохлорофилла А для фотодинамической терапии рака // *Вестник МИТХТ*. – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 3–10.
5. Приложение А к Европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS 123). – 13 с. Адрес доступа: <https://rm.coe.int/168007a6a8> (дата обращения 26.02.2019)

REFERENCES

1. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis, *Biochem. J.*, 2004, no. 377, pp. 159–169.
2. Sapelnikov M.D., Panov A.V., Nikolskaya E.D., Grin M.A. Development of delivery systems for highly effective photosensitizers applicable for photodynamic therapy of cancer, *Biopharmatsevticheskiy jurnal*, 2018, vol. 10, no 1, pp. 14–25. (in Russian)
3. Nikolskaya E., Sokol M., Faustova M., Zhunina O., Mollaev M., Yabbarov N., Tereshchenko O., Popov R., Severin E. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release, *Acta of Bioeng. and Biomech.*, 2018, vol. 20, no. 1, pp. 65–77.
4. Pantyushenko I.V., Grin M.A., Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Tsygankov A.A., Mironov A.F. A novel highly effective IR photosensitizer in the bacteriochlorophyll A series for photodynamic therapy of cancer, *Vestnik MITHT*, 2014, vol. 9, no. 3, pp. 3–10. (in Russian)
5. *Prilozhenie A k Evropeyskoy konvencsii ob ohrane pozvonochnykh zhivotnykh, ispol'zuemykh dlya eksperimentov i v drugih nauchnykh*

6. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными (статья №5 конвенции) / пер. с англ. М.С. Красильниковой и И.В. Белозерцевой. – Санкт-Петербург, 2014. – 102 с. Адрес доступа: <http://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Приложение-А-к-ETS.pdf> (дата обращения 26.02.2019)
7. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. и др. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 657–71.
8. Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Lebedeva V., Filyasova A., Yakubovskaya R., Mironov A., Egret-Charlier M., Vigny P. Near-infrared photosensitizer based on a cycloimide derivative of chlorin p6: 13,15-N-(3'-hydroxypropyl)cycloimide chlorin p6 // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – No. 75. – P. 633–643.
9. Nazarova A., Ignatova A., Feofanov A., et al. 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin p6 with isonicotinyl substituent are photosensitizers targeted to lysosomes // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – No. 6. – P. 1184–1196.
10. Efremenko A.V., Ignatova A.A., Borsheva A.A., et al. Cobalt bis(dicarbollide) versus closo-dodecaborate in boronated chlorin e6 conjugates: implications for photodynamic and boron-neutron capture therapy // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2012. – Vol. 11, No. 4. – P. 645–652.
11. Loi S., Rischin D., Michael M., et al. A randomized cross-over trial to determine the effect of Cremophor EL on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of carboplatin chemotherapy // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 54, No. 5. – P. 407–414.
- tselyah (ETS 123)* [Appendix A of the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS No. 123)], 13 p. Available at: <https://rm.coe.int/168007a6a8> (accessed 26.02.2019)
6. *Rukovodstvo po sodержaniyu i uhodu za laboratornymi zhivotnymi (stat'ya №5 konventsii)* [Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals (Article 5 of the Convention)], transl. by Krasilnischikova M.S., Belozertseva I.V. Saint-Petersburg, 2014. 102 p. Available at: <http://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Приложение-А-к-ETS.pdf> (accessed 26.02.2019)
7. Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Karmakova T.A., et al. *Methodical recommendations on the study of photoinduced antitumor properties of drugs*. In: Guide to conducting preclinical studies of medicines. Edited by A.N. Mironov. Moscow, Grif & Ko Publ., 2012, pp. 657–71. (in Russian)
8. Feofanov A., Grichine A., Karmakova T., Plyutinskaya A., Lebedeva V., Filyasova A., Yakubovskaya R., Mironov A., Egret-Charlier M., Vigny P. Near-infrared photosensitizer based on a cycloimide derivative of chlorin p6: 13,15-N-(3'-hydroxypropyl)cycloimide chlorin p6, *Photochem. Photobiol.*, 2002, no. 75, pp. 633–643.
9. Nazarova A., Ignatova A., Feofanov A., Karmakova T., Pljutinskaya A., Mass O., Grin M., Yakubovskaya R., Mironov A., Maurizot J.-C. 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin p6 with isonicotinyl substituent are photosensitizers targeted to lysosomes, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, no. 6, pp. 1184–1196.
10. Efremenko A.V., Ignatova A.A., Borsheva A.A., Grin M.A., Bregadze V.I., Sivaev I.B., Mironov A.F., Feofanov A.V. Cobalt bis(dicarbollide) versus closo-dodecaborate in boronated chlorin e6 conjugates: implications for photodynamic and boron-neutron capture therapy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, vol. 11, no. 4, pp. 645–652.
11. Loi S., Rischin D., Michael M., Yuen K., Stokes K.H., Ellis A.G., Millward M.J., Webster L.K. A randomized cross-over trial to determine the effect of Cremophor EL on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of carboplatin chemotherapy, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2004, vol. 54, no. 5, pp. 407–414.