

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ МЕЛАНОМЫ В16 У МЫШЕЙ С НОВЫМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ БОРИРОВАННЫМ ХЛОРИНОМ

Ю.С. Осипчук, М.А. Каплан, В.В. Дрожжина

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск

Резюме

Проведены пилотные исследования фармакокинетики и фармакодинамики нового фотосенсибилизатора липосомального борированного хлорина у мышей с меланомой В16. Изучена динамика накопления препарата в опухоли и здоровой ткани (уровень накопления в тканях оценивали по интенсивности флюоресценции). Показано, что при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг препарат постепенно накапливался в опухолевых и здоровых тканях, достигая максимальных значений флюоресценции через 2–3 ч после введения. Затем интенсивность флюоресценции в тканях постепенно снижалась, достигая через 120 ч после начала исследования практически исходного фонового уровня. Фотосенсибилизатор накапливался в опухолевой ткани со средней селективностью: индекс контрастности в период максимального накопления препарата в тканях составлял 1,7–2,8. В соответствии с полученными результатами для дальнейших исследований был выбран интервал времени от введения препарата до проведения облучения – 3 ч. На втором этапе исследований была оценена зависимость эффективности фотодинамической терапии от различных параметров: дозы фотосенсибилизатора при внутрибрюшинном введении (5–10 мг/кг), световой дозы (150–300 Дж/см²) и плотности мощности (0,25–0,51 мВт/см²). Облучение проводили полупроводниковым лазером на длине волны 662±1 нм. Наибольшую эффективность показал следующий режим: доза фотосенсибилизатора 5 мг/кг, световая доза 300 Дж/см², плотность мощности 0,44 мВт/см². В этом режиме к концу срока наблюдения (21 день) полная регрессия опухоли была получена у 75% животных, а средний коэффициент абсолютного прироста опухоли составил всего 7,82.

Ключевые слова: опухоль, меланома, фотосенсибилизатор, борированный хлорин, фотодинамическая терапия, флюоресцентная диагностика.

Введение

Первоочередной задачей в развитии фотодинамической терапии (ФДТ) остается поиск новых эффективных фотосенсибилизаторов (ФС). Используемые в настоящее время для ФДТ ФС обладают большим терапевтическим потенциалом, но действие многих из них сопряжено с побочными эффектами [1, 2]. Прогресс в ФДТ опухолей связан с достижениями в создании эффективных ФС, обеспечивающих достаточный терапевтический эффект при минимальном повреждении окружающих здоровых тканей и отсутствии общетоксического действия. В течение последнего десятилетия в ФДТ злокачественных новообразований большой интерес в качестве ФС вызывают производные хлорофилла [3, 4] и ведутся активные работы по созданию структурированных (липосомальных) форм ФС с расширенным спектром возможностей [5–8]. Они проявляют на порядок большую световую токсичность, чем большинство ФС, показывают повышение селективности накопления, увеличение эффективности ФДТ, возможность лиофилизации и хранения при пониженной температуре. Благодаря своим контролируемым размерам, мембранотропности и биосовместимости липосомы являются перспективными системами доставки лекарственных веществ в органы и ткани, что существенно повышает границы

эффективности липосомальных ФС. Уровень и селективность накопления ФС в опухоли, а также скорость его выведения из нормальной ткани являются важнейшими характеристиками для ФДТ. Они влияют как на эффективность метода, так и на вероятность снижения побочных эффектов. Важнейшими условиями для достижения противоопухолевой эффективности являются также параметры лазерного облучения [9–12]. В настоящее время металлосодержащие ФС хлоринового ряда, такие как борированный хлорин и его липосомальная форма активно изучаются в связи с перспективой их использования в борнейтронозахватной терапии и ФДТ рака. В Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН был синтезирован препарат борированный хлорин (патент №2406726 от 20 декабря 2010 года). ГОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова на кафедре фармацевтической технологии и фармакологии была разработана и синтезирована новая лекарственная форма: борхлорин липосомальный лиофилизат, как ФС для противоопухолевой терапии.

Целью данной работы явилось изучение динамики накопления борхлорина липосомального лиофилизата в опухоли и здоровой ткани и скорости его выведения из тканей; установление оптимального сочетания

дозы ФС и дозы облучения, необходимой для воздействия на глубокие слои опухоли при ФДТ для получения максимальной регрессии опухоли.

Материал и методы

Исследования были проведены на мышах-гибридах линии F1 (СВА х С57BL6). В качестве экспериментальной модели опухоли использовали меланому B16. Опухоль перевивали под кожу в область бедра в виде суспензии в объеме 0,1 мл. За день до перевивки опухоли на том бедре, куда прививали опухоль, шерстный покров выстригали и депилировали. В опыт брали мышей на 4–5-й день после перевивки, когда максимальный диаметр опухоли составлял 5–7 мм.

В качестве ФС использовали новый лекарственный препарат борхлорин липосомальный лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1 мг (размер частиц 200 ± 10 нм). Препарат представляет собой сухую пористую массу молочно-зеленого цвета. Непосредственно перед введением препарат растворяли в 4 мл воды для инъекций и интенсивно встряхивали в течение 1 мин до образования дисперсии молочно-зеленого цвета.

Исследование динамики накопления фотосенсибилизатора в опухоли и здоровой ткани

Для изучения динамики накопления препарат липосомальный борированный хлорин вводили мышам с меланомой B16 внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг. Уровень накопления фотосенсибилизатора в опухолевой и здоровой тканях оценивали по интенсивности флуоресценции, которую измеряли методом локальной флуоресцентной спектроскопии на комплексе ЛЭСА-01 (ЗАО «Биоспек», Россия). Диагностический катетер подводили к коже над опухолью и в трех точках под прямым углом к объекту (центр, периферия 1 и периферия 2). Накопление в здоровой ткани определяли на здоровой ткани бедра с опухолью (контроль 1) и на противоположенном бедре (контроль 2). Перед измерением шерстный покров депилировали. Время экспозиции составляло 1–2 с. В различные сроки времени после введения ФС у каждого животного измеряли спектры опухолевой и здоровой тканей. Первое измерение проводили до введения препарата (0 ч), а затем через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 24; 48; 96 и 120 ч.

Для суждения о селективности накопления ФС в опухоли по отношению к здоровой ткани рассчитывали индекс контрастности (опухоль/здоровая ткань).

Исследование влияния на эффективность ФДТ дозы ФС и параметров облучения

Исследования влияния дозы ФС и параметров облучения на эффективность ФДТ были проведены на 9 группах животных со следующими режимами воздействия:

- 1) доза ФС 5 мг/кг, световая доза 150 Дж/см², плотность мощности 0,25 Вт/см²;
- 2) доза ФС 5 мг/кг, световая доза 150 Дж/см², плотность мощности 0,51 Вт/см²;
- 3) доза ФС 5 мг/кг, световая доза 300 Дж/см², плотность мощности 0,44 Вт/см²;
- 4) доза ФС 7,5 мг/кг, световая доза 150 Дж/см², плотность мощности 0,51 Вт/см²;
- 5) доза ФС 7,5 мг/кг, световая доза 300 Дж/см², плотность мощности 0,44 Вт/см²;
- 6) доза ФС 10 мг/кг, световая доза 150 Дж/см², плотность мощности 0,25 Вт/см²;
- 7) доза ФС 10 мг/кг, световая доза 150 Дж/см², плотность мощности 0,51 Вт/см²;
- 8) доза ФС 10 мг/кг, световая доза 300 Дж/см², плотность мощности 0,44 Вт/см²;
- 9) контроль (мышь-опухоленоситель без какого-либо воздействия).

В опытных группах облучение проводили через 3 ч после внутрибрюшинного введения ФС. Животные при облучении находились под тиопенталовым наркозом (внутрибрюшинно 1,25% раствор в объеме 0,05–0,06 мл на животное).

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый лазерный аппарат «Аткус-2» (ЗАО «Полупроводниковые приборы», Санкт-Петербург) с длиной волны излучения 662 ± 1 нм. Диаметр светового пятна составлял 1–1,5 см. Объем опухоли измеряли до проведения ФДТ, в 3, 7, 10, 14, и 21-е дни от начала лечения. Наблюдение за животными проводили до 50–70 дней после ФДТ.

Эффективность ФДТ оценивали по рекомендации Фармкомитета по предклинической апробации препаратов.

1. По коэффициенту абсолютного прироста опухоли (К). Для этого сначала вычисляли объем опухоли по формуле:

$$V = \frac{1}{6} \pi \cdot d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \quad (1),$$

где d_1, d_2, d_3 – взаимно перпендикулярные диаметры опухоли, V – объем опухоли в см³.

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (К) рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0} \quad (2),$$

где V_0 – объем опухоли до воздействия, V_t – объем опухоли на определенный срок наблюдения.

2. По проценту животных в группе с полной регрессией (ПР, %) опухоли ($K = -1$). За полную регрессию опухоли принимали отсутствие видимой и пальпируемой опухоли.

Результаты и обсуждение

Исследование динамики накопления фотосенсибилизатора в опухоли и здоровой ткани

В течение 3 ч после введения липосомального борированного хлорина происходило постепенное увеличение накопления препарата в опухолевой ткани. Через 2–3 ч уровень флуоресценции достигал 5-кратных значений по сравнению с исходным фоновым уровнем. После 3 ч содержание препарата в опухоли начинало незначительно снижаться и держалось примерно на одном уровне до 24 ч. В здоровой ткани мышей также наблюдалось постепенное увеличение накопления препарата в течение 3 ч и далее сохранялось примерно на одном уровне до 48 ч. Мы получили селективность накопления препарата в опухолевой ткани по всем срокам исследования (индекс контрастности от 1,7 до 2,8) (см. рисунок).

Таким образом, у мышей с меланомой В16 липосомальный борированный хлорин накапливается в значительной степени в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью бедра во все сроки исследования (индекс контрастности от 1,7 до 2,8). Уровень максимального накопления препарата в опухоли и самый высокий индекс контрастности наблюдали через 2–3 ч, в связи с этим сделан вывод, что данный срок является оптимальным для проведения ФДТ.

Исследование влияния на эффективность ФДТ дозы ФС и параметров облучения

Результаты, полученные в ходе исследования зависимости эффективности ФДТ от дозы препарата и параметров облучения, представлены в таблице.

При введении ФС в минимальной дозе (5 мг/кг) наибольшую эффективность показал следующий режим облучения: световая доза 300 Дж/см² при плотности мощности 0,44 Вт/см². В этом режиме полная регрессия опухоли к концу срока наблюдения была получена у 75% животных, а средний коэффициент абсолютного прироста опухоли составил всего 7,82. При снижении световой дозы до 150 Дж/см² эффективность лечения заметно падала, при этом она была чуть выше при меньшей дозе плотности мощности (0,25 Вт/см²): 50,7% животных с полной регрессией и средний коэффициент абсолютного прироста опухоли к концу срока наблюдения равный 40,49 при 0,25 Вт/см² против отсутствия полных регрессий и среднего коэффициента абсолютного прироста опухоли к концу срока наблюдения равного 70,40 при 0,51 Вт/см².

Увеличение дозы фотосенсибилизатора до 7,5 мг/кг не оказало существенного влияния на эффективность лечения. При использовании низкой световой дозы при высокой плотности мощности (150 Дж/см², 0,51 Вт/см²) ни у одного животного не было зареги-

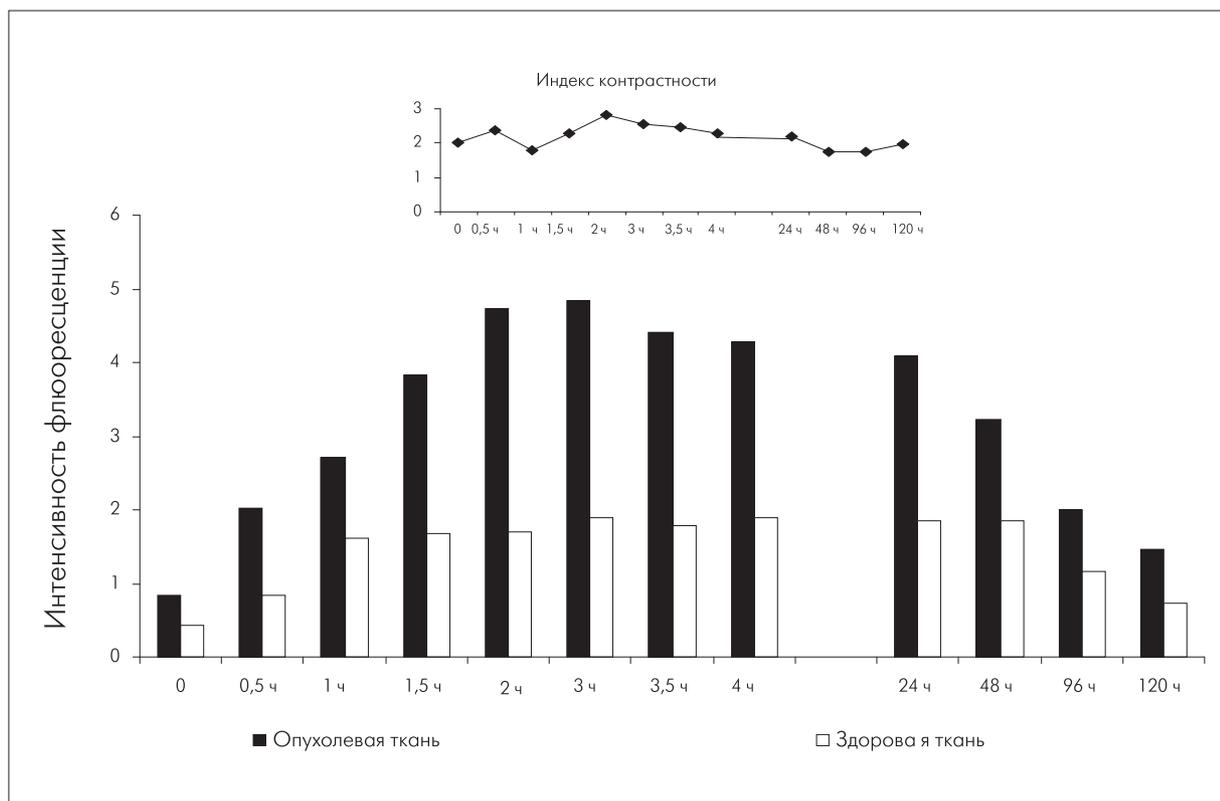


Рис. Уровень накопления и индекс контрастности борхлорина липосомального лиофилизата в опухоли и здоровой ткани мышей с меланомой В16 и скорость выведения ФС после внутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг массы животного

Таблица

Эффективность ФДТ в зависимости от дозы препарата и параметров облучения

№ гр.	Схема опыта	Коэффициент абсолютного прироста опухоли в сроки наблюдения, дни					Сроки заживл. язв после ФДТ, дни
		3	7	10	14	21	
1.	5 мг/кг 150 Дж/см ² 0,25 Вт/см ² (n=7)	Полная регрессия			2,56±1,54 42,8%	40,49±13,72 50,7%	-
2.	5 мг/кг 150 Дж/см ² 0,51 Вт/см ² (n=8)	Полная регрессия	-0,07±0,65 75,0%	4,95±4,18 62,5%	14,40±6,44 37,5%	70,40±30,09 0	-
3.	5 мг/кг 300 Дж/см ² 0,44 Вт/см ² (n=8)	Полная регрессия		-0,59±0,41 85,7%	0,34±1,34 85,7%	7,82±5,83 75%	35,0±4,0
4.	7,5 мг/кг 150 Дж/см ² 0,51 Вт/см ² (n=4)	Полная регрессия	-0,67±0,33 0	-0,32±0,68 0	3,86±2,62 0	23,12±15,44 0	21,0±0,0
5.	7,5 мг/кг 300 Дж/см ² 0,44 Вт/см ² (n=3)	Полная регрессия			2,75±1,46 33,3%	16,29±3,66 33,3%	-
6.	10 мг/кг 150 Дж/см ² 0,25 Вт/см ² (n=10)	Полная регрессия		-0,46±0,37 80,0%	2,11±1,04 50%	16,35±3,60 10%	29
7.	10 мг/кг 150 Дж/см ² 0,51 Вт/см ² (n=2)	Полная регрессия					28,0±7,0
8.	10 мг/кг 300 Дж/см ² 0,44 Вт/см ² (n=1)	Полная регрессия					70
Контроль (n=11)		0,57±0,20 0	2,01±0,54 0	4,74±1,02 0	12,89±4,58 0	53,17±13,06 0	-

стрировано к концу срока наблюдения полной регрессии опухоли, а средний коэффициент абсолютного прироста опухоли составил 23,12. При использовании режима облучения со световой дозой 300 Дж/см² эффективность лечения была даже чуть ниже, чем для дозы ФС 5 мг/кг: 33,3% животных с полной регрессией и коэффициент абсолютного прироста опухоли 16,29 к концу срока наблюдения.

При увеличении дозы ФС до 10 мг/кг (световая доза облучения 150 Дж/см², плотность мощности 0,25 Вт/см²) полная регрессия была получена всего

у 10% животных. В группах с другими параметрами облучения результаты статистически недостоверны, поскольку объем выборки составлял всего 1–2 животных. Оценка эффективности этих режимов требует проведения дополнительных экспериментов.

У части животных после проведения ФДТ на коже в зоне облучения образовывались язвы, зажившие в среднем от 20 до 35 дней. У мыши, получившей максимальную дозу ФС (10 мг/кг) и максимальную световую дозу облучения (300 Дж/см²) язвы заживали в течение 70 дней после сеанса ФДТ.

Заключение

Оптимальное время проведения ФДТ после введения борированного хлорина наступает через 2–3 ч, когда уровень накопления ФС в опухоли и индекс контрастности достигают своих максимальных значений. Практически полное выведение ФС из опухолевой и здоровой тканей мышей наступает через 5 дней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лукьянец Е.А. Поиск новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. – №3. – С. 3–16.
2. Филоненко Е.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия – обоснование применения и возможности в онкологии // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2014. – №1 – С. 3–7.
3. Странадко Е.Ф., Рябов М.В. Фотосенсибилизаторы хлориновой группы – шаг вперед в развитии фотодинамической терапии // Альманах клинической медицины. – 2006. – Т. XII. – С. 36–37.
4. Странадко Е.Ф., Рябов М.В. 5-летний опыт фотодинамической терапии с производными хлорина е6 // Росс. биотер. журнал. – 2004. – Т.3, № 2. – С.58
5. Мачинская Е.А., Иванова-Радкевич В.И. Обзор механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов различной химической структуры в опухолевой ткани // Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2013. – №4. – С. 19–23.
6. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2. – № 4. – С. 3–8.
7. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов и в качестве моделей для фотобиологических исследований // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3. – № 1. – С. 7–13.
8. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Хим. фарм. журнал. – 2001. – Т. 35. – № 4. – С. 32–38.
9. Романко Ю.С., Цыб А.Ф., Каплан М.А., Попучиев В.В. Зависимость противоопухолевой эффективности фотодинамической терапии от плотности световой энергии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 139. – №4. – С. 456–461.
10. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. Современные возможности и перспективы эндоскопической хирургии и фотодинамической терапии злокачественных опухолей // Рос. онкол. журнал. – 1998. – № 4. – С. 4–12.
11. Каплан М.А., Никитина Р.Г., Ольшевская В.А. и соавт. Эффективность фотодинамической терапии меланомы при различных условиях ее облучения (экспериментальное исследование) // Российский вестник фотобиологии и фотомедицины. – 2010. – № 2. – С. 84–89.
12. Странадко Е.Ф. Механизмы действия фотодинамической терапии // Рос. онкол. журнал. – 2000. – №4. – С. 52–56.

Максимальная эффективность ФДТ была достигнута при введении липосомального борированного хлорина в дозе 5 мг/кг с последующим облучением опухоли при световой дозе 300 Дж/см² и плотности мощности 0,44 Вт/см².

REFERENCES

1. Lukyanets E.A. Poisk novykh fotosensibilizatorov dlya fotodinamicheskoi terapii (Search for new photosensitizers for photodynamic therapy), *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2013, No. 3, pp. 3–16.
2. Filonenko E.V. Fluorescentnaya diagnostika i fotodinamicheskaya terapiya – obosnovanie primeneniya i vozmozhnosti v onkologii (Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy: justification of applications and opportunities in oncology), *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2014, No. 1, pp. 3–7.
3. Stranadko E.F., Ryabov M.V. Fotosensibilizatory khlorinovoi gruppy – shag vpered v razvitiy fotodinamicheskoi terapii (Chlorine photosensitizers – Step forward in development of photodynamic therapy), *Al'manakh klinicheskoi meditsiny*, 2006, T. XII, pp. 36–37.
4. Stranadko E.F., Ryabov M.V. 5-letniy opyt fotodinamicheskoi terapii s proizvodnymi khlorina e6 (5-year experience on photodynamic therapy with chlorine e6 derivatives), *Ros. bioter. zhurnal*, 2004, T. 3, No. 2, p. 58.
5. Machinskaya E.A., Ivanova-Radkevich V.I. Obzor mekhanizmov selektivnogo nakopleniya fotosensibilizatorov razlichnoi khimicheskoi struktury v opukholevoi tkani (Review of selective accumulation of photosensitizers with different chemical structure in tumor tissue), *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2013, No. 4, pp. 19–23.
6. Meerovich I.G., Oborotova N.A. Primenenie liposom v fotokhimioterapii: 1. Liposomy v fotodinamicheskoi terapii (Use of liposomas in photochemotherapy: 1. Liposomas in photodynamic therapy), *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2003, T. 2, No. 4, pp. 3–8.
7. Meerovich I.G., Oborotova N.A. Primenenie liposom v fotokhimioterapii: 2. Liposomal'nye formy dlya sozdaniya fotoaktiviruemyykh liposomal'nykh preparatov i v kachestve modelei dlya fotobiologicheskikh issledovaniy (Use of liposomas in photochemotherapy: 2. Liposomal forms for development of photoactive liposomal agents and as models for photobiological studies), *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2004, T. 3, No. 1, pp. 7–13.
8. Oborotova N.A. Liposomal'nye lekarstvennyye formy protivopukholevykh preparatov (obzor) (Liposomal drug forms of anti-cancer drugs (review)), *Khim. farm. Zhurnal*, 2001, T. 35, No. 4, pp. 32–38.
9. Romanko Yu.S., Tsyb A.F., Kaplan M.A., Popuchiev V.V. Zavisimost' protivopukholevoi effektivnosti fotodinamicheskoi terapii ot plotnosti svetovoi energii (Dependence of anti-cancer efficiency of photodynamic therapy on light dose), *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2005, T. 139, No. 4, pp. 456–461.
10. Chissov V.I., Sokolov V.V., Filonenko E.V. Sovremennyye vozmozhnosti i perspektivy endoskopicheskoi khirurgii i fotodinamicheskoi terapii zlokachestvennykh opukholei (Contemporary capabilities and opportunities of endoscopic surgery and photodynamic therapy of malignant tumors), *Ros. onkol. zhurnal*, 1998, No. 4, pp. 4–12.
11. Kaplan M.A., Nikitina R.G., Ol'shevskaya V.A. i soavt. Effektivnost' fotodinamicheskoi terapii melanomy pri razlichnykh usloviyakh ee oblucheniya (eksperimental'noe issledovanie) (Efficacy of photodynamic therapy for melanoma under different modes of its irradiation), *Rossiiskii vestnik fotobiologii i fotomeditsiny*, 2010, No. 2, pp. 84–89.
12. Stranadko E.F. Mekhanizmy deistviya fotodinamicheskoi terapii (Mechanisms of photodynamic therapy), *Ros. onkol. Zhurnal*, 2000, No. 4, pp. 52–56.

PHOTODYNAMIC THERAPY OF MELANOMA B16 IN MICE WITH THE NEW PHOTOSENSITIZER BORONATED CHLORINE

Osipchuk YuS, Kaplan MA, Drozhzhina VV

A.F.Tsyb MRRC – branch of FSI «NMRRС» of Russian Ministry of Health, Obninsk

Pilot studies of pharmacokinetics and pharmacodynamics of new photosensitizer liposomal boronated chlorine in mice with melanoma B16 were performed. Dynamics of drug accumulation in tumor and normal tissue (level of accumulation in tissues was assessed by means of fluorescence) was studied. For intraperitoneal injection at a dose of 5 mg/kg the drug was shown to accumulate gradually in tumor and normal tissues with maximal fluorescence values in 2–3 h after injection. Then fluorescence intensity in tissues gradually decreased, achieving nearly initial base-line in 120 h after beginning of the study. The photosensitizer accumulated in tumor tissue with average selectivity: contrast index for maximal drug accumulation in tissues accounted for 1.7–2.8. According to obtained data for following research the time interval between drug injection and irradiation of 3h was chosen. On the second stage of the study dependence of photodynamic therapy efficacy on different parameters including photosensitizer dose for intraperitoneal injection (5–10 mg/kg), light dose (150–300 J/cm²) and power density (0.25–0.51 mW/m²). The irradiation was performed by semiconductor laser on wavelength of 662±1 nm. The efficacy was maximal for following regimen: photosensitizer dose of 5 mg/kg, light dose of 300 J/m², power intensity of 0.44 mW/cm². For this regimen at the end of follow-up (21 days) complete tumor regression was obtained in 75% of animals and average coefficient of absolute tumor growth accounted for only 7.82.

Keywords: photodynamic therapy, fotogem, photosens, alasens, fotoditazin, radachlorine.

Контакты: Осипчук Ю.С., e-mail: 270886sokol@mail.ru