ВИЗНАЧЕННЯ РОЗПОДІЛУ ІМУНОКОН'ЮГАТУ ГЕМАТОПОРФІРИНУ В ТКАНИНАХ МИШЕЙ ТА АНАЛІЗ ДОБОВИХ КОЛИВАНЬ ЙОГО НАКОПИЧЕННЯ ПУХЛИНАМИ

М.Ф. Гамалія, І.В. Прокопенко, І.О. Лісняк, Є.Д. Шишко, А.А. Мамчур, В.В. Холін*

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України,
03022 Україна, м. Київ, вул. Васильковська, 45,
тел.: (044) 259-0167;
*ПМВП «Фотоніка Плюс»,
18023 Україна, м. Черкаси, вул. Одеська, 8,
тел.: (0472) 66-15-96

УДК 616–006.04:615.37:577.34

За допомогою флуоресцентної спектроскопії встановлено селективне накопичення кон'югату «гематопорфірин-антитіла до фактору росту клітин судинного ендотелію (VEGF) у пухлинах мишей порівняно із нормальними тканинами. Показана достовірна різниця в акумуляції кон'югату пухлинами протягом доби: його максимальне накопичення спостерігається у світлову фазу доби (14:00), а мінімальне – вночі (02:00).

Ключові слова: *фотодинамічна терапія пухлин, ростовий фактор ендотеліоцитів судин (VEGF), кон'югат гематопорфірин- антитіла до VEGF, флуоресцентна спектроскопія.*

Вступ

Фотодинамічна терапія (ФДТ) є принципово новим методом у лікуванні злоякісних пухлин, який ґрунтується на здатності фотосенсибілізаторів селективно накопичуватися у пухлинній тканині. При опроміненні пухлини лазерним світлом із певною довжиною хвилі фотосенсибілізатор генерує синглетний кисень та вільні радикали, дія яких призводить до деструкції малігнізованих клітин.

Метод ФДТ виграє у порівнянні із традиційними променевою та хіміотерапією завдяки високій вибірковості ураження пухлинної тканини, відсутності важких локальних та системних ускладнень і можливості повторення курсу лікувальної процедури. До позитивних факторів слід віднести також можливість поєднання в одній процедурі і лікування, і флуоресцентної діагностики (ФД) [1, 10], тому що за характерним спектром флуоресценції фотосенсибілізатора можна оцінити локалізацію та межі злоякісного новоутворення.

Селективність пошкодження пухлин при ФДТ пояснюється перш за все тим, що фотосенсибілізатор здатний більше накопичуватися та довше затримуватися у пухлині порівняно із нормальними тканинами. Проте такі процеси забезпечують недостатньо високий рівень вибіркового накопичення фотосенсибілізуючих агентів пухлинними тканинами, тому що депонування цих сполук відбувається також і в нормальних тканинах, хоча й у меншій мірі. Власне недостатньо висока селективність накопичення сенсибілізаторів спонукала дослідників до пошуку шляхів ефективного цілеспрямованого транспорту фотосенсибілізаторів до пухлинних тканин. Перший крок у цьому напрямку було здійснено у 1983 році [9]. Тоді і було започатковано розвиток так званої таргетної (цілеспрямованої) ФДТ. При таргетній ФДТ агентами доставки фотосенсибілізатору в пухлину можуть бути пухлиноспецифічні та пухлиноасоційовані антитіла [12, 14], цитокіни [7], фактори росту, їх рецептори тощо [11,13]. У цьому ж напрямку останніми роками активно проводяться експерименти, спрямованні на вивчення антиваскулярних ефектів фотодинамічної терапії [4]. Такі дослідження сконцентровані не лише на пошуках нових фотосенсибілізуючих агентів, мішенями для яких виступала б саме судинна система пухлини, але й на розробці методів адресної їх доставки у пухлину. Одним із перспективних способів такої доставки є направлене селективне транспортування фотосенсибілізаторів, кон'югованих із факторами – індукторами неоангіогенезу та антитілами до них. У попередній нашій роботі [1] викладені підходи та описана розробка методу ФДТ, при якому у якості фотосенсибілізатора використана кон'югована сполука гематопорфірин – антитіла до VEGF (ГП-антиVEGF). Застосування такого

кон'югату дозволило, за нашими даними, підвищити протипухлинний ефект фотодинамічної терапії у порівнянні із вихідним гематопорфірином.

З іншого боку, з метою підвищення ефективності ФДТ пухлин цілком виправданим є використання хронобіологічних підходів із урахуванням добових коливань перебігу фізіологічних процесів в організмі. При даному підході для введення протипухлинного препарату вибирають момент доби, коли чутливість пухлинних клітин до нього є максимальною [5]. Останнім часом ряд літературних джерел відзначають ритмічний добовий характер секреції пухлинами VEGF [6,10], і експерименти у цьому напрямі викликають значну зацікавленість.

Нами проведене флуоресцентне визначення накопичення кон'югату ГП-антиVEGF у пухлинах та нормальних тканинах мишей, а також досліджена динаміка його накопичення у пухлинах протягом доби.

Матеріали та методи

Експерименти проводили на мишах розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до прийнятих міжнародних правил проведення робіт із лабораторними тваринами. Експериментальними моделями служили карцинома легенів Льюїс та саркома 180. У дослідах з карциномою Льюїс були використані миші лінії $C_{57/bl}$, а у дослідах із саркомою 180 – нелінійні миші. Препарат ГП-aVEGF синтезували за описаною методикою [1]. У досліді використані дві групи тварин, по три миші у кожній: одна група – із прищепленою карциномою Льюїс, друга – із саркомою 180.

Досліди проводили на стадії добре сформованої пухлини (діаметр ~ 1 см). Кон'югат ГП-aVEGF уводили тваринам внутрішньоочеревинно із розрахунку 3 мг в об'ємі 0,1 мл на мишу вагою 20 г. На першому етапі досліджень визначались особливості накопичення фотосенсибілізатора у пухлині та нормальних тканинах мишей. У попередніх дослідах було встановлено, що час максимального накопичення сенсибілізатора у пухлинах становить 24 години.

Для кількісного визначення накопичення кон'югату через добу після його уведення тварин забивали цервікальною дислокацією і забирали зразки пухлини, печінки, нирок та шкіри. Видалені тканини двічі промивали у розчині фосфатного буферу (pH 7,2) висушували на фільтрувальному папері та зважували. Потім їх заморожували у рідкому азоті, механічно гомогенізували у фарфоровій ступці і переносили у метанольно-водний розчин (3:1). Ступінь гомогенізації тканин контролювали під мікроскопом. Отримані суспензії центрифугували протягом 10 хвилин при 1500 об/хв. та відбирали супернатанти. Для визначення кількісного накопичення фотосенсибілізатора аналізували спектри флуоресценції супернатантів на спектрофлуориметрі «Nanodrop-3300» (США). Вміст гематопорфірину визначали за його специфічною емісією на хвилі 595 нм, ініційованою хвилею збудження 550 нм. Вимірювали інтенсивність флуоресценції (ІФ) фотосенсибілізатору і розраховували відношення між ІФ у пухлині та нормальній тканині [3].

У попередніх експериментах було встановлено, що продукція VEGF у пухлинах максимальна у світлий період доби (о 14:00), мінімальна – вночі (о 02:00). Для визначення добової динаміки накопичення кон'югату ГП-aVEGF у пухлинах через годину після внутрішньочеревного уведення кон'югату мишей забивали, забирали пухлинну тканину та визначали вміст гематопорфірину за його флуоресценцією, як описано вище.

Результати та їх обговорення

На рисунках 1 та 2 наведені результати спектрофлуориметричного визначення накопичення кон'югату ГП-антиVEGF у пухлинах мишей (карциномі легень Льюїс та саркомі 180) та у нормальних тканинах. Рівень флуоресценції кон'югату у пухлинах прийнятий за 100%.

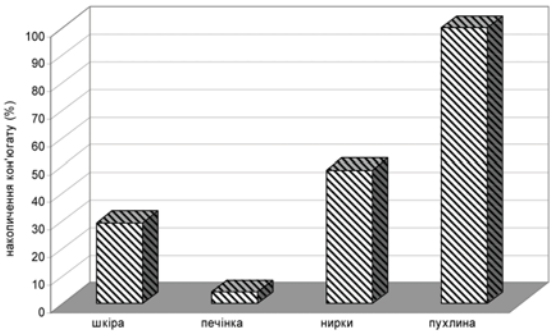

Рис. 1. **Накопичення кон'югату ГП-антиVEGF у карциномі легень Льюїс та у нормальних тканинах мишей**

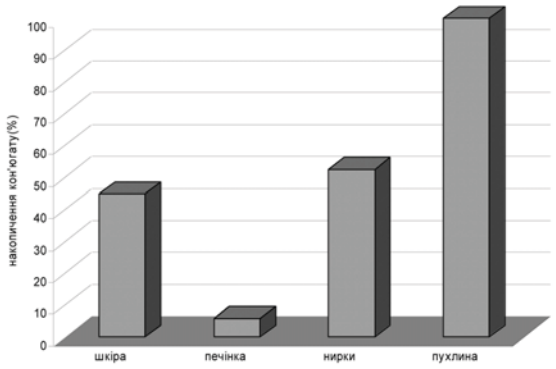

Рис. 2. **Накопичення кон'югату ГП-антиVEGF у саркомі 180 та у нормальних тканинах мишей**

Наведені результати демонструють досить високу селективність накопичення кон'югату в обох пухлинах у порівнянні із нормальними тканинами. Через добу після внутрішньочеревного введення ГП-антиVEGF найменша кількість фотосенсибілізатору акумулюється у печінці (близько 4% мишей із перещепленою карциномою Льюїс і 6% – у мишей із саркомою 180), рівень флуоресценції гематопорфірину у шкірі та нирках вищий.

Наступні дослідження ставили на меті оцінити можливу різницю у накопиченні кон'югату пухлиною протягом доби. Результати експериментів наведені на рисунках 3 та 4.

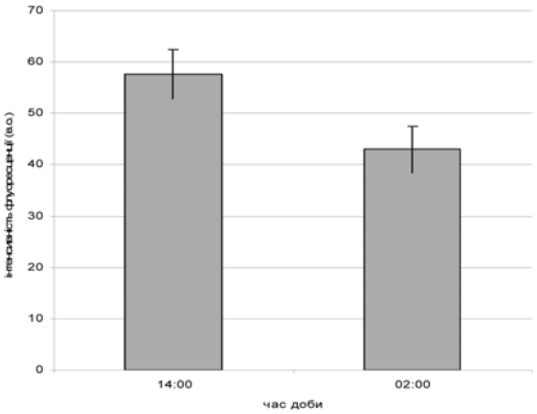

Рис. 3. **Накопичення кон'югату у карциномі Льюїс у залежності від часу доби**

Із представлених даних видно, що найвищий рівень накопичення кон'югату у пухлинах спостерігається у години доби, які співпадають із часом максимальної продукції VEGF пухлинами (світлова фаза доби, 14:00).

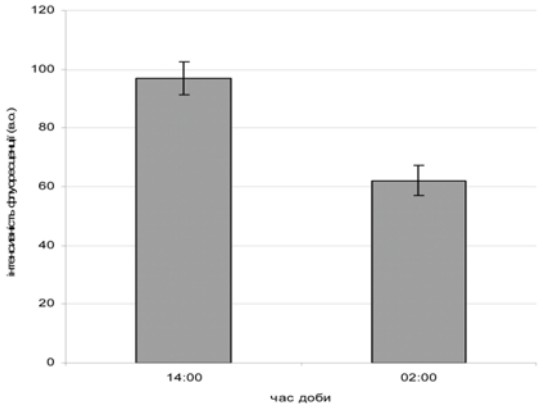

Рис. 4. **Накопичення кон'югату у саркомі 180 у залежності від часу доби**

Мінімальною акумуляція кон'югату є у години, які відповідають мінімальній продукції фактору (середина нічної фази доби, 02:00). Різниця між денним і нічним накопиченням кон'югату у пухлині складає близько 34% у випадку карциноми Льюїс та 38,6% - у мишей із саркомою 180.

Висновки

У результаті проведених досліджень встановлено, що:

- максимальний рівень накопичення кон'югату ГП-антиVEGF через добу після його внутрішньочеревного введення мишам спостерігається у пухлинах, мінімальний – у печінці. У шкірі та нирках мишей рівень накопичення кон'югату має проміжне значення.

- накопичення ГП-aVEGF у пухлинах мишей протягом доби співпадає із динамікою продукції пухлиною VEGF. Максимальне накопичення спостерігається о 14:00, мінімальне – вночі (о 02:00). Різниця між максимальним та мінімальним вмістом кон'югату у пухлинах протягом доби складає 34-39%.

Література

1. Гамалія М.Ф. Створення та експериментальна апробація нового антитіло-кон'югованого сенсибілізатора для фотодинамічної терапії пухлин/ М.Ф. Гамалія, І.О. Лісняк, Н.Л. Новиченко // Фотобіологія та фотомедицина. – 2007. – Т.V, №1. – С. 76-82.

2. Куценок В.В. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей / В.В. Куценок, Н.Ф. Гамалея // Онкология. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 69-73.

3. Куценок В.В. Флуоресцентний аналіз накопичення 5-АЛК – індукованого протопорфірину IX у пухлинній та нормальній тканинах

мишей / В.В. Куценок, І.А. Прокопенко, О.Ю. Артеменко О.Ю. // Укр. радіол. журнал. – 2006. – №1. – С. 38-41.

4. Chen B. Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications/ B. Chen, B.W. Pogue, J.M. Luna // Clin. Cancer. Res. – 2006. – Vol.12, № 3. – P. 917-923.

5. Lévi F. Circadian timing in cancer treatments / F. Lévi, A. Okyar, S. Dulong // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2010. – № 50. – P. 377-421.

6. Lévi F. Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics / F. Lévi, C. Focan, A. Karaboué // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2007. – Vol. 59, № 9-10. – P. 1015-35.

7. Linares R. Efficacy of different targeting agents in the photolysis of interleukine –2 receptor bearing cells/ R. Linares, Y.R. Racheco, T.A. Good // J.Photochem. Photobiol. – 2004. – Vol. 77, № 1-3. – P.17-26.

8. Macdonald L.G. Basic principles of photodynamic therapy / L.G. Macdonald, T.J. Dougherty // Porphyrins Phthalocyanines. – 2001. – №5. – P. 105-129.

9. Mew D. Photoimmunotherapy treatment of animal tumors with tumor – specific monoclonal antibody – hematoporphyrin conjugates/ D. Mew, C.K. Wat, G.H. Towers, J.C. Levy // J. Immunol. – 1983. –Vol. 130, № 3. – P. 1473-1477.

10. Sato F. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression/ F. Sato, U.K. Bhawal, T. Kawamoto // Genes Cells. – 2008. – Vol. 13, № 2. – P. 131-144.

11. Savellano M. Multiepitope HER2 targeting enhances photoimmunotherapy of HER2-overexpessing cancer cells with pyropheophorbide – immunoconjigates/ M. Savellano, B. Pogue, P. Hoopes P. // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65, № 14. – P. 6371-6379.

12. Sharman W.M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems/ W.M. Sharman, J.E. Van Lier, C.M. Allen // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2004. – Vol. 56, № 1. – P.53-76.

13. Soukos N. Epidermal growth factor receptor-targeting immunophotodiagnosis and photoimmunotheraphy of oral precancer in vivo./ N. Soukos, M. Hamblin, S. Keel S. // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61, № 11. – P.4490-4496.

14. Vrouenraets M.B. Comparison of aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate- and meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monoclonal antibody conjugates for their efficacy in photodynamic therapy in vitro/ M.B. Vrouenraets, G.W. Visser, M. Stigter // Int. J. Cancer. – 2002. – Vol. 98, № 5. – P. 793-798.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОКОНЪЮГАТА ГЕМАТОПОРФИРИНА В ТКАНЯХ МЫШЕЙ И АНАЛИЗ СУТОЧНЫХ КОЛЕБАНИЙ ЕГО НАКОПЛЕНИЯ ОПУХОЛЯМИ

*Н.Ф. Гамалея, И.В. Прокопенко, И.А. Лисняк., Е.Д. Шишко, А.А. Мамчур, В.В. Холин**
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,
03022 Украина, г. Киев, ул. Васильковская, 45,
тел.: (044) 259-0167;
**ЧМПП «Фотоника Плюс»,*
18023 Украина, г. Черкассы, ул. Одесская, 8,
тел.: (0472) 66-15-96

С помощью флуоресцентной спектроскопии продемонстрирована селективность накопления фотосенсибилизатора гематопорфирин-антитело к фактору роста клеток сосудистого эндотелия (VEGF) в опухолях мышей по отношению к нормальным тканям. Показана достоверная разница в его аккумуляции в опухолях на протяжении суток: максимальное накопление конъюгата наблюдается в светловое время суток (14:00), минимальное – ночью (02:00).

***Ключевые слова**: фотодинамическая терапия опухолей, VEGF, конъюгат «гематопорфирин-антитело к VEGF», флуоресцентная спектроскопия.*

THE STUDY OF HEMATOPORPHYRINE- IMMUNOCONJUGATE DISTRIBUTION IN MURINE TISSUES AND DAILY FLUCTUATIONS ANALYSIS OF ITS UPTAKE IN TUMORS

*N.F. Gamaleiya, I.V. Prokopenko, I.O. Lisnyak, E.D. Shishko, A.A. Mamchur, V.V. Kholin**
Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology by R.E. Kavetskiy of NAS of Ukraine,
03022 Ukraine, Kiev, Vasilkovskaya Str., 45,
tel.: (044) 259-0167;
**PSPE «Fotonika Plus»,*
18023 Ukraine, Cherkassy, Odesskaya Str., 8,
tel.: (0472) 66-15-96

Using fluorescence spectroscopy, the selectivity of accumulation of hematoporphyrine-antiVEGF antibody photosensitizer in murine tumors versus normal tissues has been demonstrated. The significant difference of its diurnal accumulation in tumors has been established: the maximal uptake of the conjugate has been observed at daylight time (14:00), the minimal one – at night (02:00).

***Key words**: photodynamic therapy of tumors, vascular endothelial growth factor, «hematoporphyrine antiVEGF antibody» conjugate, fluorescence spectroscopy.*