

**СИНТЕЗ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ
НОВОГО НАНОКОМПОЗИТНОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА
ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

Штонь И.А., *Чумаченко В.А., Шишко Е.Д.,
*Куцевол Н.В., Арсентьева К.Г., Гамалея Н.Ф.

Лаборатория квантовой нанобиологии,
Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
имени Р.Е.Кавецкого НАН Украины,
ул. Васильковская, 45, г. Киев, 03022 Украина;
тел.: +38(044) 258-16-58
e-mail: nikolai.gamaleia@ukr.net

*Химический факультет, Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 60, г. Киев, 01601 Украина

*Исследованные в работе золи наночастиц золота синтезированы в сополимерной декстран-полиакриламидной матрице. Распределение наночастиц по размеру в коллоидном растворе охарактеризовано с помощью динамического рассеяния света и просвечивающей электронной микроскопии. Полученные золи золота использованы для приготовления нанокompозитного фотосенсибилизатора путем их комплексования с хлорином еб. В исследованиях *in vitro* на злокачественных лимфоцитах человека противоопухолевая фотодинамическая активность нанокompозита оказалась в два раза выше, чем у свободного хлорина еб. Высокая противоопухолевая фотодинамическая активность нанокompозита была подтверждена в опытах *in vivo* на мышах с перевитой карциномой легких Льюис.*

Ключевые слова: сополимер, декстран-полиакриламид, наночастицы золота, хлорин еб, фотодинамическая терапия, синглетный кислород, клеточная линия МТ-4, карцинома мышей Льюис.

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) опухолей является одним из выдающихся достижений современной медико-биологической науки. Этот метод основан на использовании специальных красителей – фотосенсибилизаторов (ФС), которые после введения в организм избирательно накапливаются в опухолевых тканях и при облучении светом переходят в возбужденное (триплетное) состояние. Возбужденные ФС вступают в реакцию с тканевым кислородом, приводя к генерации его активных форм, в конечном счете вызывающих окислительное повреждение опухолевых клеток. Благодаря селективности действия ФДТ на опухоли и отсутствию серьезных побочных эффектов, этот метод лечения как онкологических, так и других заболеваний был успешно внедрен в медицинскую практику ряда стран мира.

В последние годы активно исследуется возможность использования наночастиц на основе полимеров в качестве систем таргетной доставки ФС. Наночастицы, содержащие ФС, имеют ряд преимуществ перед исходными фотосенсибилизирующими препаратами, поскольку позволяют

предотвратить агрегацию молекул ФС, часто ведущую к снижению его активности, а также повысить концентрацию ФС в ткани-мишени. Кроме того, наночастицы на основе полимеров могут быть дополнительно нагружены различными соединениями, в свою очередь усиливающими эффект лечения.

Недавно был предложен для использования в ФДТ и другой класс наноматериалов – наночастицы золота [3]. В системах, содержащих наночастицы золота, удается достигнуть определенного повышения квантового выхода образования синглетного кислорода. Таким образом, привлекательным представляется использование в качестве транспортера ФС двойной, гибридной системы, содержащей одновременно полимер и наночастицы золота.

Целями данного исследования было создать наноноситель на основе разветвленного водорастворимого полимерного матрикса с оптимальным содержанием в нем золота и ФС; определить скорость старения наночастиц, контролируя их размерные характеристики; наконец, изучить противоопухолевую фотодинамическую активность разработанных нанокompозитов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Полимерная матрица. Разветвленные сополимеры декстран-полиакриламид (Д-ПАА) использовали в качестве полимерной матрицы для синтеза наночастиц золота. Методика получения, молекулярные параметры и особенности синтеза звездообразного сополимера Д-ПАА были детально обсуждены ранее в наших работах [4, 5, 6, 8]. Молекулярные характеристики сополимера по данным гель-хроматографического анализа с использованием детекторов светорассеяния и рефрактометрии были равны: $M_w = 1,57 \times 10^6$ г/моль, $R_g = 67$ нм, $M_w/M_n = 1,81$. Соплимер анионной формы (Д-ПАА/ПЭ) был получен с помощью щелочного гидролиза исходного сополимера. Гидролиз проводили в течение 30 мин с использованием гидроксида натрия. Степень гидролиза карбамидных групп сополимера в карбоксилатные определенный потенциометрическим титрованием был равен 37%. Д-ПАА/ПЭ пересаждали ацетоном, затем лиофильно сушили и хранили в вакууме для предотвращения дальнейшего гидролиза образца. Как сообщалось ранее [4], разветвленные полимеры имеют более компактную молекулярную структуру и, следовательно, более высокую локальную концентрацию функциональных групп по сравнению с линейными аналогами. Такие структурные особенности дают преимущества разветвленным полимерным системам для применения их в нанотехнологиях [1, 2, 7].

Синтез наночастиц золота. Наночастицы золота были синтезированы химическим восстановлением тетрахлороаурата (III) водорода (Sigma Aldrich, США) в растворе полимера. При этом полимер играл роль матрицы, способной влиять на процесс нуклеации, контролировать рост и стабилизировать наночастицы. В реакционной смеси 0,012 мл 0,1 М водного раствора тетрахлороаурата (III) водорода добавляли в 0,5 мл водного раствора полимера ($C = 1,10\text{-}3$ г.см⁻³) и перемешивали в течение 20 минут. Затем добавляли 0,047 мл 0,1 М водного раствора боргидрида натрия (Sigma Aldrich, США) и реакционную смесь перемешивали еще в течение 30 минут. Формирование наночастиц Au регистрировалось визуально по изменению цвета раствора на рубиново-красный. Процесс восстановления проводили при температуре 5°C.

Получение нанокомпозитного ФС. Хлорин еб (Santa Cruz Biotechnology, США) растворяли в 1 объеме диметилсульфоксида и смешивали с 5 объемами физиологического раствора Хенкса без фенолового красного. Для определения оптимального соотношения хлорина еб и наночастиц Au, был приготовлен ряд образцов с различным массовым соотношением ФС и золота (1:1; 1:10

и 1:100). Чтобы определить, при каком соотношении весь хлорин еб связывался с нанозолотом, нанокомпозиты осаждали центрифугированием на протяжении 10 минут. (скорость вращения 12000 об/мин) и регистрировали спектры поглощения супернатантов.

Регистрация образования синглетного кислорода. Генерация синглетного кислорода (1O_2) контролировалась с помощью специфического сенсора синглетного кислорода (Singlet Oxygen Sensor Green, SOSG, Molecular Probes, США). В соответствии с инструкциями изготовителя, исходный раствор SOSG (5 мМ) в метаноле хранили при температуре -20°C. Для определения образования 1O_2 в растворах хлорина еб и его нанокомпозита в пробы добавляли 2 мкМ SOSG и подвергали их лазерному облучению (длина волны 658 нм, максимальная плотность дозы = 2 Дж/см²). Флуоресценцию SOSG на длине волны 530 нм регистрировали с помощью флуороспектрометра NanoDrop 3300 (NanoDrop, США).

Абсорбционная спектроскопия. Спектры поглощения нанокомпозитов регистрировали в диапазоне длин волн 200-800 нм с помощью спектрофотометра Varian Cary 50 (Пало-Альто, Калифорния, США).

Просвечивающая электронная микроскопия. Для приготовления образца 400-ячеечную медную сетку, покрытую углеродной пленкой, гидрофилизировали с помощью тлеющего разряда (ELMO, Cordouan Technologies Bordeaux, Франция). Каплю объемом 5 мкл наносили и адсорбировали в течение 1 мин., избыток раствора удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Исследование наночастиц золота проводилось с использованием двух просвечивающих электронных микроскопов (ПЭМ), Tecnaï G2 или CM12 (FEI, Эйндховен, Нидерланды); изображения были получены с помощью камеры ssCCD Eagle на ПЭМ Tecnaï и камеры Megaview SIS - на ПЭМ CM12.

Квазиупругое рассеяние света. Измерения динамического рассеяния света проводились с использованием аппарата Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Аппарат включал He-Ne-лазер с длиной волны излучения 632,8 нм и мощностью 4 мВт. Рассеивание света наблюдали под углом в 60°.

Лазерное облучение биологических объектов. Для лазерного облучения клеточных культур и экспериментальных опухолей, перевитых лабораторным животным, были использованы полупроводниковые лазеры (фирма «Фотоника Плюс», Украина) с длиной волны 658 нм. Мощность лазерного излучения контролировали с помощью измерителя Ophir Nova II (Ophir Optronics, Израиль).

Эксперименты со злокачественными клетками in vitro. Клетки линии МТ-4 (Т-клеточный лейкоз человека) были получены из банка клеточных культур Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е.Кавецкого

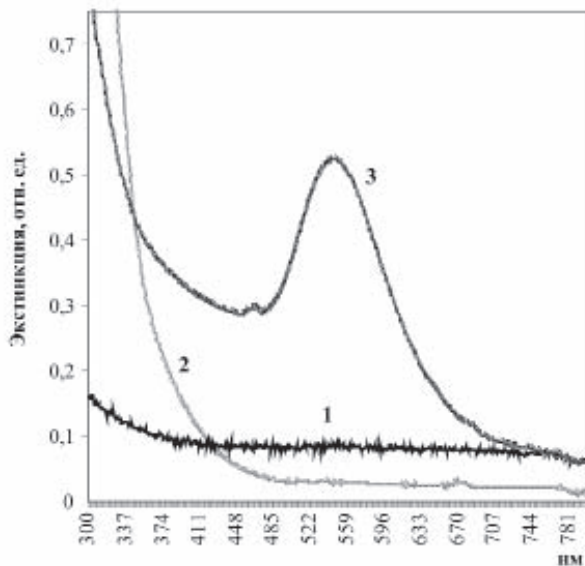


Рис. 1. Спектры поглощения света: 1 - раствором полимера; 2 - HAuCl_4 в растворе Д-ПАА/ПЭ; 3 - наночастиц Au, синтезированных в Д-ПАА/ПЭ

НАН Украины. Клетки поддерживали в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, при температуре 37°C в инкубаторе с 95% влажностью и 5% CO_2 в воздухе.

Для фотодинамической обработки готовили суспензии клеток, находящихся в логарифмической фазе роста ($0,5 \times 10^6$ / мл), в сбалансированном солевом растворе Хенкса. Через 1,5 часа инкубации клеток при температуре 37°C с хлоридом еб или с его наноконкомпозитом, пробы дважды промывали 10-кратным объемом раствора Хенкса и подвергали воздействию красного лазерного излучения (длина волны 658 нм, плотность

ли жизнеспособность клеток с помощью теста на исключение красителя трипанового синего.

Эксперименты in vivo. Противоопухолевую фотодинамическую активность наноконкомпозитов изучали на мышах линии C57BL/6 с карциномой легких Льюис, перевитой животным в стопу задней конечности. ФДТ проводили, когда диаметр опухоли достигал 3,5-5,0 мм. Мыши были разделены на три группы: I - контрольные животные (без воздействия); II - животные, в хвостовую вену которых вводили свободный хлорид еб (дозой 1,5 мг/кг); III - животные, которым вводили то же количество хлорид еб в виде наноконкомпозита. Спустя 1 час после инъекции ФС опухоли у животных групп II и III подвергали лазерному облучению от того же источника, что и суспензии клеток (длина волны 658 нм, плотность мощности - 50 мВт/см², дозы - 45 Дж/см²).

Результаты и обсуждение

На рис.1 показаны спектры поглощения систем, содержащих раствор полимера; HAuCl_4 в растворе Д-ПАА/ПЭ или наночастиц Au, синтезированных в Д-ПАА/ПЭ. Максимум поверхностного плазмонного резонанса наночастиц золота, находящийся в области 548 нм, регистрируется для золя Au, полученного в присутствии сополимера. Положение пика соответствует размерам наночастицам 5-20 нм. Следует отметить, что небольшой до-полнительный максимум поглощения при 470 нм может быть следствием наличия асимметричных частиц в коллоидном растворе. Это подтверждается результатами электронной микроскопии, представленными ниже. Процесс старения полученных наносистем изучался с помощью метода динамического рассеивания света. Данные измерений представлены на рис. 2.

Видно, что непосредственно после синтеза коллоидных растворов в них преобладают наночастицы Au размером 20-30 нм; второй мак-

Таблица 1

Динамика положения пиков распределения наночастиц Au по гидродинамическому радиусу

Образец	Время после синтеза, дни	Радиус, нм			
		1-й пик (наночастицы)		2-й пик (макромолекулы)	
Д-ПАА/ПЭ	1	25	±0,5	71	±0,7
	8	17		62	
	60	35		71	

мощности - 1,1 мВт/см², дозы - 1 Дж/см²). После облучения клетки переносили в среду для культивирования и инкубировали при 37 С в течение 18 часов для завершения фотодинамически индуцированного процесса апоптоза. Затем определя-

ли жизнеспособность клеток с помощью теста на исключение красителя трипанового синего. В течение первой недели происходили определенные изменения в наносистемах - появлялись наночастицы Au размером менее 20 нм; хорошо выраженный

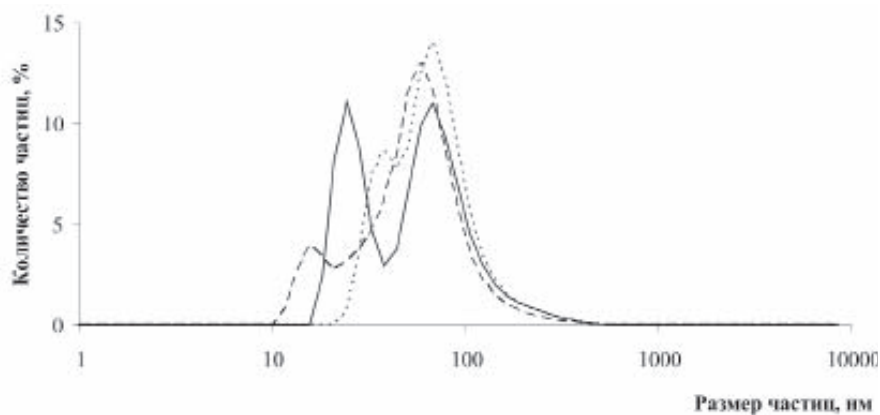


Рис. 2. Изменение со временем распределения по гидродинамическим радиусам наночастиц Au, синтезированных в Д-ПАА/ПЭ матрице.

Сроки измерений: 1-й день после синтеза – сплошная линия; 8-й день – штриховая линия; 60-й день – пунктирная линия

максимум, соответствующий молекулам полимера, оставался практически в том же положении. Через два месяца после синтеза наблюдалось некоторое увеличение размера наночастиц Au (до 35 нм). В табл. 1 приведена динамика положения пиков распределения наночастиц Au по гидродинамическому радиусу через 1 день, неделю и 2 месяца после синтеза. Данные электронной микроскопии по размеру наночастиц в системе, подтверждают результаты, полученные с помощью динамического рассеивания света. На микрофотографии (рис. 3) видно наличие сферических и агрегированных наночастиц Au.

Используя вышеописанные полимерные системы, мы получали нанокompозитный ФС путем смешивания раствора хлорина еб с раствором наночастиц. Исследование спектров поглощения супернатантов после преципитации нанокompозитного ФС показало на-

личие несвязанного хлорина еб в образце с массовым соотношением компонентов хлорин еб: Au – 1: 1 (рис. 4 А). С другой стороны, хлорин еб не определялся в супернатанте нанокompозита с массовым соотношением 1:10 (рис. 4 Б), что указывало на полное связывание хлорина еб с наночастицами. Поэтому в дальнейших экспериментах был использован нанокompозитный ФС именно такого состава.

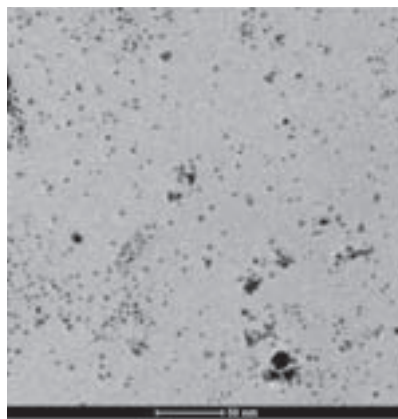


Рис. 3. Просвечивающая электронная микроскопия наночастиц Au в Д-ПАА матрице (через 60 дней после синтеза)

Опыты с этим нанокompозитом показали, что при воздействии светом с длиной волны 658 нм он генерирует синглетный кислород на уровне, сопоставимом со свободным хлорином еб (рис. 5).

В последующих экспериментах *in vitro*, проведенных на культуре малигнизированных лимфоцитов человека МТ-4, было установлено, что в отсутствие облучения красным светом нанокompозит не проявляет цитотоксич-

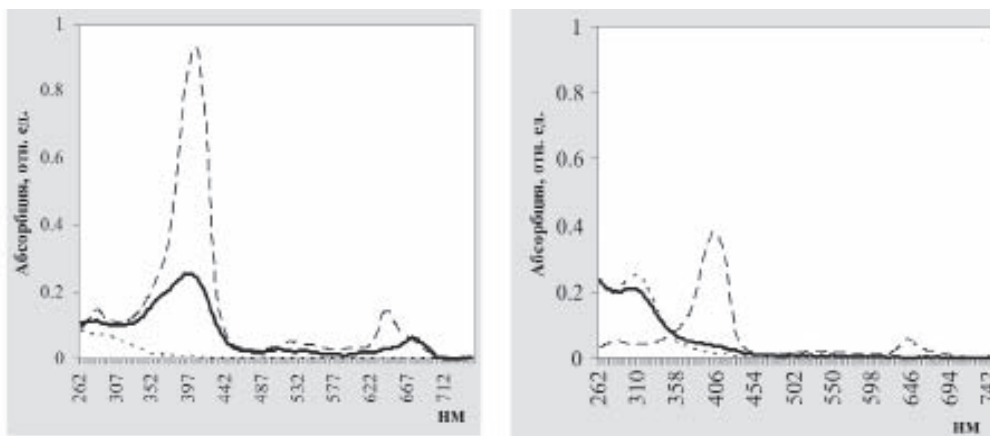


Рис. 4. Спектры поглощения света супернатантами раствора хлорина еб и его нанокompозитами после осаждения. А - хлорин еб: Au в массовом соотношении 1:1 (150:150 мкг/мл); Б - хлорин еб: Au в массовом соотношении 1:10 (50:500 мкг/мл). Сплошная линия – нанокompозит, штриховая - хлорин еб; пунктирная - наночастицы золота

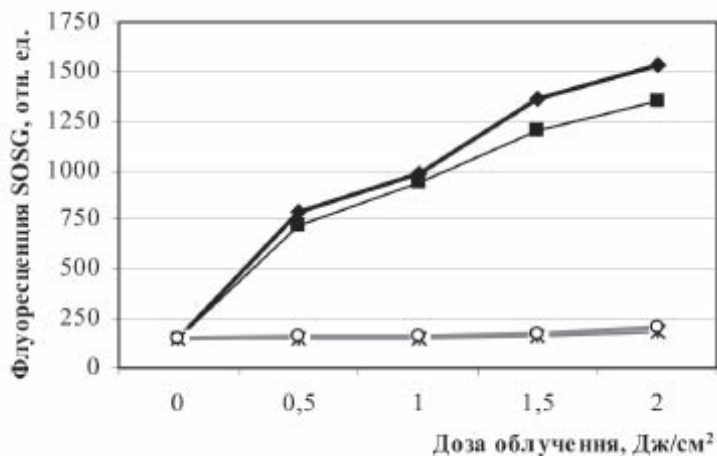


Рис. 5. Генерация синглетного кислорода хлорином е6 и его наноккомпозитом в массовом соотношении хлорин е6:Аu = 1:10 при лазерном облучении: (♦) – хлорин е6 (■) – наноккомпозит, (○) – наночастицы золота, (○) – сополимер

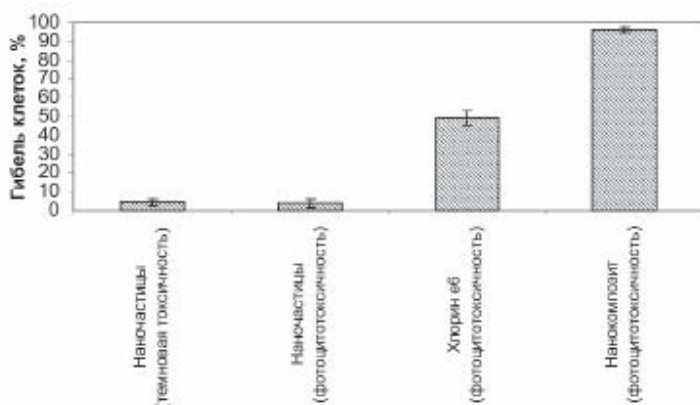


Рис. 6. Фотодинамическое действие хлорина е6 и его наноккомпозита на малигнизированные лимфоциты человека линии МТ-4.

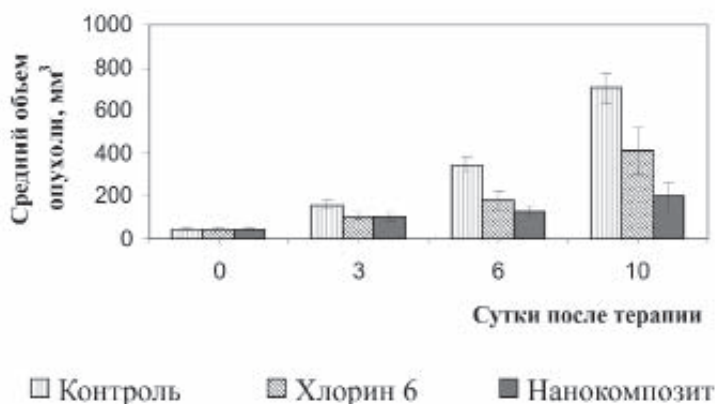


Рис. 7. Результаты ФДТ мышей с карциномой легких Льюис при использовании в качестве ФС хлорина е6 или его наноккомпозита

ности. В то же время смертность предварительно инкубированных с наноккомпозитом лимфоцитов после лазерного облучения была почти в два раза выше, чем смертность клеток, инкубированных со свободным хлорином е6 в той же концентрации (рис. 6). Таким образом, комплексообразование хлорина е6 с наночастицами золота в декстран-полиакриламидной матрице почти вдвое увеличивает его фотодинамическую активность *in vitro*.

Положительные результаты, достигнутые в экспериментах *in vitro*, послужили основанием для проведения исследований *in vivo*. Усиленная фотодинамическая противоопухолевая активность наноккомпозитного ФС по сравнению со свободным хлорином е6 была подтверждена в экспериментах на мышах с трансплантированной им карциномой легких Льюис (рис. 7). На 10-й день после лазерного воздействия средний объем опухолей у животных, которые получили наноккомпозит, был в 1,5 раза ниже, чем в группе мышей, получавших свободный ФС.

Как было показано выше (рис. 5), композитный ФС, исследованный в данной работе, под влиянием света генерирует синглетный кислород, который считается основным повреждающим фактором фотодинамического воздействия. При этом продукция синглетного кислорода наноккомпозитом несколько ниже, чем у свободного хлорина е6.

Однако в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* фотодинамическая эффективность наноккомпозита оказалась гораздо выше по сравнению со свободным ФС. Причина этого состоит, вероятно, в том, что наноккомпозитом в опухолевые клетки доставляется намного больше молекул ФС, чем свободным хлорином е6.

Выводы

В результате проведенной работы создан композитный ФС, состоящий из наночастиц золота в сополимерной декстран-полиакриламидной матрице и хлорина е6. Наноккомпозитный ФС в экспериментах *in vitro* со злокаче-

ственими клетками лінії МТ-4 проявил фотодинамічну протипухлевую активність, підвищену в два рази по сравнению со свободним ФС. Висока фотодинамічна ефективність наноконструкції підтверджена і в експериментах *in*

vivo при ФДТ карциноми легких Льюїс, привитої лабораторним мишам. На основі отриманих даних передбачається рекомендувати цей наноконструктивний фотосенсибілізатор для доклінічного дослідження.

Литература

1. Bezuglyi M. Water-soluble branched copolymers dextran-polyacrylamide and their anionic derivatives as matrices for metal nanoparticles in situ synthesis / M. Bezuglyi, N. Kutsevol, M. Rawiso, T. Bezuglaya // *Chemik*.- 2012.- Vol.66, №8.- P.862–867.
2. Chumachenko V. In situ formation of silver nanoparticles in linear and branched polyelectrolyte matrices using various reducing agents / V. Chumachenko, N. Kutsevol, M. Rawiso et al. // *Nanoscale Research Letters*.- 2014.- Vol.9, №1.- P.164.
3. Gamaleia N.F. Gold mining for PDT: great expectations from tiny nanoparticles / N.F. Gamaleia, I.O. Shton' // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*.- 2015.- Vol.12, №2.- P.221–231.
4. Kutsevol N.V. Features of the intramolecular structure of branched polymer systems in solution / N.V. Kutsevol, T.N. Bezuglaya, M.Y. Bezuglyi // *Journal of Structural Chemistry*.- 2014.- Vol.55, №3.- P.548–559.
5. Kutsevol N. Branched dextran-graft-polyacrylamide copolymers as perspective materials for nanotechnology / N. Kutsevol, T. Bezuglaya, M. Bezuglyi, M. Rawiso // *Macromolecular Symposia*.- 2012.- Vol.317-318, №1.- P.82–90.
6. Kutsevol N. Star-like dextran-graft-(polyacrylamide-co-polyacrylic acid) copolymers / N. Kutsevol, M. Bezuglyi, T. Bezuglaya, M. Rawiso // *Macromolecular Symposia*.- 2014.- Vol.335, №1.- P.12–16.
7. Kutsevol N.V. Dextran-g-polyacrylimide star polymers: prospects of application in nanotechnology / N.V. Kutsevol, V.A. Chumachenko, M. Rawiso et al. // *Journal of Structural Chemistry*.- 2015.- Vol.56.- P.1016–1023.
8. Kutsevol N. Solution properties of dextran-polyacrylamide graft copolymers / N. Kutsevol, J.-M. Guenet, N. Melnik et al. // *Polymer*.- 2006.- Vol.47, №6.- P.2061–2068.

СИНТЕЗ І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА АПРОБАЦІЯ НОВОГО НАНОКОМПОЗИТНОГО ФОТОСЕНСІБІЛІЗАТОРА ДЛЯ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ

Штонь І.О., *Чумаченко В.А., Шишко Є.Д., *Кутсевол Н.В., Арсент'єва К.Г., Гамалія М.Ф.
Лабораторія квантової нанобіології,
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
імені Р.С. Кавецького НАН України,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 Україна;
тел.: +38(044) 258-16-58
e-mail: nikolai.gamaleia@ukr.net

*Хімічний факультет, Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 60, м. Київ, 01601 Україна

Досліджені в роботі золі наночастинок золота синтезовані в сополімерній декстран-поліакриламідній матриці. Розподіл наночастинок за розміром в колоїдному розчині охарактеризовано за допомогою динамічного розсіювання світла і трансмісійної електронної мікроскопії. Отримані золі золота використано для приготування наноконструктивного фотосенсибілізатора шляхом їх комплексування з хлорином еб. У дослідях *in vitro* на злоякісних лімфоцитах людини протипухлинна фотодинамічна активність наноконструктиву виявилася в два рази вище, ніж у вільного хлорину еб. Висока протипухлинна фотодинамічна активність наноконструктиву була підтверджена в дослідях на мишах з перещепленою карциномою легень Льюїс.

Ключові слова: сополімер, декстран-поліакриламід, наночастинок золота, хлорин еб, фотодинамічна терапія, синглетний кисень, клітинна лінія МТ-4, карцинома мишей Льюїс.

*SYNTHESIS AND EXPERIMENTAL TESTING OF A NEW NANOCOMPOSITE PHOTOSENSITIZER
FOR PHOTODYNAMIC THERAPY*

*Shton' I.O., *Chumachenko V.A., Shishko E.D., *Kutsevol N.V., Arsentjeva K.G., Gamaleia N.F.
Laboratory of Quantum Nanobiology,
R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine,
45 Vasilkivska Str., Kyiv, 03022 Ukraine;
tel.: +38(044) 258-16-58
e-mail: nikolai.gamaleia@ukr.net*

** Department of Chemistry, Taras Shevchenko National University of Kyiv,
60 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601 Ukraine*

Gold nanoparticles were synthesized in copolymer dextran-polyacrylamide matrix. The distribution of nanoparticles in the colloidal solution by size was characterized by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. Obtained gold nanoparticles were used for nanocomposite photosensitizer preparation by their combining with chlorine e6. In in vitro studies on human malignant lymphocytes, nanocomposite photodynamic activity was two times higher than that for free chlorin e6. High photodynamic antitumor activity of the nanocomposite was confirmed in experiments on mice with transplanted Lewis lung carcinoma.

Keywords: *copolymer, polyacrylamide, dextran, gold nanoparticles, chlorin e6, photodynamic therapy, singlet oxygen, cell line MT-4, mouse Lewis carcinoma.*