

М.Ф. Гамалія, Є.Д. Шишко, І.О. Штонь, І.В. ПрокопенкоІнститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України,
м. Київ, Україна**ФОТОДИНАМІЧНА ДІЯ БАРВНИКА МЕТИЛЕНОВОГО
СИНЬОГО НА КЛІТИНИ МЕЛАНОМИ МИШЕЙ**

Меланома — агресивна злоякісна пухлина, стійка до хіміо- та радіотерапії. Беручи до уваги те, що механізм фотодинамічного ушкодження відрізняється від механізму руйнування клітин протипухлинними препаратами або іонізуючою радіацією, видається цілком вірогідним припущення, що за допомогою фотодинамічної дії можна досягти пошкодження меланомних клітин.

Дослідження виконано на клітинах меланоми мишей (лінія B16F10). В якості фотосенсибілізатора (ФС) використано барвник метиленовий синій (МС) через його відому афінність до пігменту меланомних клітин — меланіну.

Встановлено, що клітини лінії B16F10 проявляють певну чутливість до фотодинамічного впливу з МС, але значно нижчу, ніж пухлинні клітини, що не мають фенотипу множинної лікарської резистентності (Т-клітинна лінія трансформованих лімфоцитів людини Jurkat). Показано, що фотодинамічну активність МС відносно меланомних клітин можна підвищити за допомогою наночастинок золота (НЧ Au) одного з двох видів: НЧ Au, при синтезі яких в якості відновника тетрахлораурату використано цитрат натрію («цитратні»), або НЧ Au, при синтезі яких відновником слугував полксамер плуронік F127 («плуронікові»). Створено нанокмпозитні ФС на основі МС та нанорозмірного золота.

Застосування «цитратних» НЧ Au вдвічі підвищило кількість загиблх внаслідок лазерного опромінення меланомних клітин порівняно з вільним МС в тій же концентрації, що використана в композитному ФС. Композит МС з «плуроніковими» НЧ Au, навпаки, призводив до загибелі децю меншої кількості опромінених світлом клітин порівняно з вільним МС. Це, очевидно, пояснюється частковим відновленням МС до безбарвної лейкоформи залишками плуроніку F127 в розчині НЧ Au після їх відмивання центрифугуванням.

Перевірено також вплив природного полісахариду хітозану на фотодинамічну активність МС. Показано, що використаний разом з МС хітозан підвищує накопичення ФС в клітинах меланоми, що призводить до загибелі 96% опромінених клітин.

Таким чином, клітини меланоми мишей (клітинна лінія B16F10) проявляють певну чутливість до фото динамічного впливу з МС. Чутливість меланомних клітин до такого впливу значно нижча, ніж у пухлинних клітин, що не мають фенотипу множинної лікарської резистентності (Т-клітинна лінія трансформованих лімфоцитів людини Jurkat). Нанокмпозитний ФС на основі цитратних НЧАи та МС продемонстрував вдвічі вищу фото динамічну активність по відношенню до меланомних клітин порівняно з вільним МС в тій же концентрації. Природний полісахарид хітозан підвищив накопичення МС в клітинах меланоми, що дозволило отримати загибель 96% клітин, опромінених лазерним світлом з довжиною хвилі 658 нм.

Ключові слова: клітинна лінія меланоми мишей B16F10, фото динамічна терапія, метиленовий синій, наночастинки золота, хітозан.

Вступ

Меланома — агресивна метастазуюча пухлина, стійка до хіміо- та радіотерапії. Механізм фотодинамічної дії відрізняється від механізму ушкодження клітин протипухлинними препаратами чи іонізуючою радіацією. Тому існує вірогідність того, що за допомогою фотодинамічної терапії (ФДТ) можна буде подолати стійкість меланомних клітин

до ушкодження. Для реалізації фотодинамічного ефекту необхідна одночасна присутність в одному і тому ж місці трьох факторів: молекул нетоксичного фотосенсибілізатора (ФС), світла (лазерного випромінювання з довжиною хвилі, що поглинається ФС), та молекулярного кисню. Молекула ФС, поглинувши квант лазерного світла, переходить у збуджений стан. В присутності кисню ця енергія збудження молекули ФС витрачається на утворення

активних форм кисню — синглетного кисню та вільних радикалів, які й є основними пошкоджуючими факторами при ФДТ.

Але при фотодинамічному впливі на меланомні клітини виникає низка проблем. По-перше, пігмент меланін, що міститься в цих клітинах і виконує функцію їх захисту від пошкоджуючої дії ультрафіолетової частини сонячного спектру, активно поглинає і видиме світло в діапазоні довжини хвиль 400-700 нм, тобто якраз в тій області, в якій поглинають основні ФС, що застосовуються при ФДТ. Таким чином, при опроміненні пухлини меланін конкурує з ФС за світлову енергію. По-друге, в меланоцитах спостерігається висока активність антиоксидантної системи — каталази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, що і зрозуміло, беручи до уваги функцію цих клітин — захищати організм від пошкоджуючого впливу ультрафіолету. Таким чином, активні форми кисню, що утворюються при фотодинамічному впливі, будуть знешкоджуватись антиоксидантною системою меланомної клітини.

Останніми роками виконано низку експериментальних досліджень *in vitro* та *in vivo* з фотодинамічного впливу на клітини меланоми в культурі та на перещеплену мишам пухлину [7, 6, 24]. Для посилення ефективності фотодинамічного впливу деякі автори застосували нанотехнологічний підхід — створили наноконструктивні ФС на основі наночастинок золота (НЧ Au) [3, 4, 18, 15, 5]. ФДТ індукувала апоптоз та аутофагію в меланомних клітинах, зупинку пухлинного росту та подовження життя мишей з перещепленими пухлинами, але досягти повної ремісії вдавалося дуже рідко. В клінічних роботах отримано регресію шкірних метастазів меланоми після ФДТ та відсутність побічних ефектів. Протипухлинні ефекти склалися із прямого пошкодження пухлинних клітин, деструкції судин в пухлині та активації імунної відповіді [21, 12].

При виборі ФС для застосування в досліді з фотодинамічного впливу на експериментальну меланому нашу увагу привернув барвник метиленовий синій (МС). В 1989 році з'явилась стаття [14], в якій порівнювали накопичення МС, міченого ізотопом йоду ^{125}I або астату ^{211}At , в клітинах двох ліній — пігментної меланоми та амеланотичної меланоми, клітини якої не синтезували меланін. Було показано, що МС накопичується тільки в клітинах, що містять меланін. Більше того, в досліді *in vivo* на мишах з перещепленою меланою, яким вводили МС, мічений ізотоп астату, або вільний ізотоп в тій же дозі, терапевтичний ефект спостерігався лише в групі тварин, яким ввели ізотоп разом з МС. При цьому МС забезпечив транспортування та накопичення ізотопу в клітинах меланоми в достатній для лікувального ефекту концентрації [14]. Пізніше на базі цих досліджень було розроблено сцинтилятор для діагностики метастазів меланоми,

який являв собою мічений радіоактивним йодом МС [13, 22].

МС відноситься до групи феногіазинових барвників. На даний час його властивості, зокрема фотохімічні та фотобіологічні характеристики, досить добре вивчені. Молекула МС має високу здатність вступати в окисно-відновні реакції. В залежності від умов, МС може виступати як окисником, так і відновником. Йому властиві фотохімічні реакції обох типів: першого типу — з утворенням вільних радикалів, та другого — з утворенням синглетного кисню. Поглинувши квант світла, молекула МС переходить у збуджений стан. В присутності вільного кисню енергія збудження витрачається на індукцію утворення синглетного кисню [23]. Однак МС може приймати участь в реакціях з переносом електрона і бути в напівокисленому або в напіввідновленому стані, тобто молекула МС сама може бути радикалом. Взаємодіючи з молекулярним киснем, такий радикал може спричинити утворення супероксиданіону, а той, в свою чергу, через реакцію Фентона — утворення гідроксильного радикалу [23].

У роботі [19] за методом Ленгмюрівських моношарів досліджено взаємодію МС з біологічними мембранами. У найпростішій моделі на поверхню розділу вода-повітря наносили розчин фосфоліпідів, з яких побудовані клітинні мембрани — фосфатидилхолін, основну складову поверхневої мембрани, або кардіоліпін, який є важливим складником внутрішньої мембрани мітохондрій. Застосувавши тонкі фізичні методи дослідження, встановили, що МС приєднується до карбонільних груп фосфоліпиду, а синглетний кисень, що утворюється внаслідок збудження молекули МС, розриває подвійні зв'язки в алкільному ланцюгу фосфоліпиду.

Метою роботи було дослідити чутливість клітин меланоми мишей *in vitro* (клітинна лінія В16F10) до фотодинамічного впливу з метиленовим синім та порівняти її з чутливістю до цього фотосенсибілізатора клітинної лінії трансформованих лімфоцитів людини Jurkat, яка не має фенотипу множинної лікарської резистентності, а також перевірити можливість підсилення такого впливу за допомогою наночастинок золота або природного полісахариду хітозану.

Матеріали та методи дослідження

Матеріали. В роботі використано фармакопейний 1% розчин метиленового синього, поллоксамер плуронік F127 (BASF, ФРН), хітозан (Sigma Aldrich, ФРН). Цитратні НЧ Au синтезовано кандидатом хімічних наук О.Б.Щербаківим (Інститут нанотехнологічної індустрії університету «Україна», м. Київ). НЧ Au з використанням плуроніка F127 в якості відновника синтезовано нами.

Клітинні лінії та умови культивування. В дослідженнях використано клітинну лінію меланоми мишей В16F10 та клітинну лінію трансформованих Т-лімфоцитів людини Jurkat. Клітини

лінії V16F10 культивували в живильному середовищі Dulbecco в модифікації Iscove (Sigma, США) з додаванням 15% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США) і пеніциліну та стрептоміцину по 100 од./мл. Суспензійну клітинну лінію Jurkat культивували у живильному середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США) та 80 мкг/мл гентаміцину. Обидві клітинні лінії культивували в термостаті при 37°C, вологості 95% та вмісті CO₂ у 5%.

Устаткування. Використано випромінювання напівпровідникового лазера безперервної дії (ПМВП «Фотоніка Плюс», м. Черкаси, Україна) з довжиною хвилі 658 нм, що відповідає максимуму смуги поглинання МС. Максимальна вихідна потужність лазера 1,1 Вт. Потужність червоного лазерного випромінювання контролювали за допомогою вимірювача Ophir Optonics (США). Спектри поглинання та флуоресценції отримували на спектрофотометрах NanoDrop (США).

Визначення продукції синглетного кисню. Дослідження фотоокислювальних реакцій проводили в безклітинних модельних системах. Рівень продукції синглетного кисню визначали за інтенсивністю флуоресценції специфічного індикатора Singlet Oxygen Sensor Green (Molecular Probes, США), концентрацію якого варіювали в межах 1-5 мкМ. Реєстрацію флуоресценції проводили при $\lambda_{\text{ex}}=470\text{-}505$ нм, $\lambda_{\text{em}}=519\text{-}539$ нм на спектрофлуориметрі NanoDrop ND-3300 (NanoDrop, США) і комбінованому рідері Synergy HT (BioTek, США).

Визначення фотодинамічного впливу. Клітини меланому мишей (лінія V16F10) культивували в чашках Петрі діаметром 30 мм. Коли щільність моношару складала 75-80%, живильне середовище видаляли та замінювали його фізіологічним розчином Хенкса (без фенолового червоного) рН = 7,4, що містив МС у певній концентрації. Клітини інкубували при 37°C та 5% CO₂ протягом 1,5 год. Після цього клітинний моношар тричі відмивали від непоглинутого ФС розчином Хенкса (без фенолового червоного). Клітинний моношар у безбарвному розчині Хенкса опромінювали світлом лазера з довжиною хвилі випромінювання 658 нм, замінювали розчин Хенкса живильним середовищем і культивували ще 18-20 год. для завершення процесів апоптозу, індукованих лазерним опроміненням. Відсоток загиблих клітин визначали у тесті виключення трипанового синього.

Клітини суспензійної культури Jurkat відмивали від живильного середовища центрифугуванням (5 хв. при 1500 об./хв.), переносили в розчин Хенкса з МС, та інкубували 1,5 год. при 37°C. Клітини тричі відмивали від непоглинутого сенсibilізатора розчином Хенкса та опромінювали лазерним світлом з довжиною хвилі 658 нм. Клітини переносили в живильне середовище та інкубували 18-20 год.

Відсоток загиблих клітин визначали в тесті з трипановим синім.

Синтез наночастинок золота та створення нанокompatитних фотосенсibilізаторів. Для синтезу НЧ Au з використанням в якості відновника поллоксамеру плуронік F127 ми скористалися методикою T.Simon зі співавторами [20]. 2 мМ водний розчин тетрахлораурату $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ змішували з 2 мМ водним розчином плуроніку F127 та залишали при кімнатній температурі на 2 год. На цей час розчин набував рубіново-червоного забарвлення, що свідчило про утворення НЧ Au. Розчин центрифугували 20 хв. при 12 000 об./хв. для видалення залишків плуроніку, що не прореагували. Об'єм осаду доводили до 1 мл та вносили 25 мкМ (8 мкг) МС. Після інкубації при кімнатній температурі протягом 2 год розчин НЧ Au знову центрифугували 20 хв. при 12 000 об./хв. Знімали спектри абсорбції та флуоресценції супернатантів, щоб визначити присутність в них надлишку ФС, що не увійшов до складу композиту. Об'єм розчину НЧ Au доводили до необхідного.

Результати та їх обговорення

Визначення темної цитотоксичності та фотодинамічної активності метиленового синього. Першим кроком проведеного дослідження було визначення темної цитотоксичності МС по відношенню до клітин меланому. Для цього моношар меланомних клітин, вирощений в чашках Петрі діаметром 30 мм, інкубували 1,5 год. з розчинами МС різної концентрації — від 1 мкг/мл до 80 мкг/мл. МС розчиняли в фізіологічному розчині Хенкса. Після закінчення інкубації визначали життєздатність клітин в тесті виключення трипанового синього.

На рис. 1 наведено результати таких досліджень. Видно, що концентрація барвника до 10 мкг/мл включно не викликає загибелі клітин меланому. Тому в подальших дослідках по визначенню фотодинамічного впливу МС на клітини лінії V16F10 дана концентрація була максимальною.

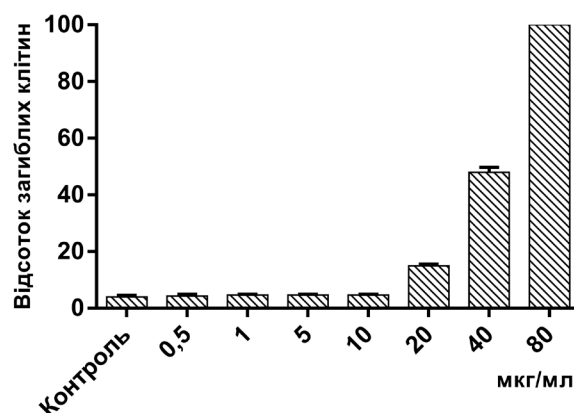


Рис.1. Темнова цитотоксичність МС для клітин меланому мишей (клітинна лінія V16F10)

На рис. 2 наведено результати визначення фотодинамічної активності МС по відношенню до клітин меланоми мишей в культурі (лінія В16F10). Звертає на себе увагу висока стійкість клітин до ушкодження: навіть при концентрації МС 10 мкг/мл та щільності дози енергії опромінення 100 Дж/см² не вдається досягти загибелі всіх опромінених клітин (рис. 2, Б).

мованих Т-лімфоцитів людини (лінія Jurkat). Виявилось, що при таких же параметрах опромінення (щільність дози енергії 12 Дж/см² при щільності потужності випромінювання 10 мВт/см²) той же відсоток загибелі опромінених клітин (30-35%) спостерігається при концентрації МС 0,5 мкг/мл (рис. 4).

Таким чином, незважаючи на афінність меланіну до барвника МС, трансформовані лімфоцити,

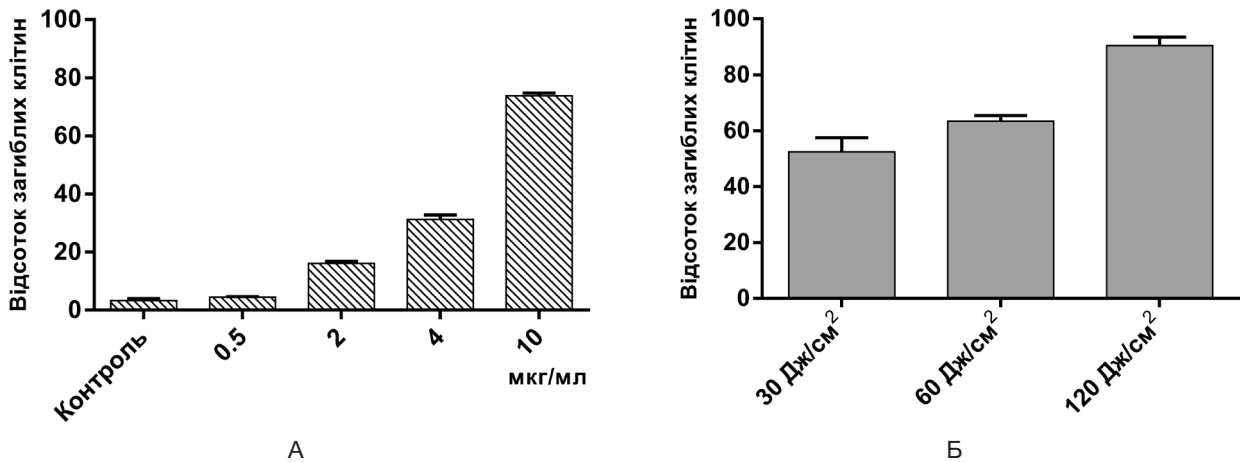


Рис. 2. Фоточитотоксичність МС для клітин меланоми мишей (лінія В16F10):
 А — щільність дози енергії опромінення 12 Дж/см², різні концентрації МС;
 Б — концентрація МС 10 мкг/мл, різні щільності дози енергії опромінення

Виходячи з отриманих результатів, в подальших експериментах на меланомних клітинах ми застосовували щільність дози енергії опромінення 12 Дж/см² при щільності потужності 10 мВт/см². Правильність вибору таких параметрів опромінення було підтверджено визначенням продукції синглетного кисню розчином МС при його опроміненні. З рис. 3 видно, що максимальна кількість синглетного кисню при опроміненні розчину МС з концентрацією 4 мкг/мл утворюється при щільності дози енергії світла 12 Дж/см².

Чутливість клітин меланоми мишей до фотодинамічного впливу з МС порівняли з чутливістю до такого впливу інших клітин, що не мають фенотипу множинної лікарської резистентності — трансфор-

що не володіють фенотипом множинної лікарської резистентності, проявляють більшу чутливість до фотодинамічного впливу з МС, ніж клітини меланоми мишей.

Дослідження фотодинамічної активності нанокompatитних фотосенсибілізаторів. Для підвищення фотодинамічного ушкодження клітин меланоми нами застосовано нанотехнологічний підхід. В експериментах використано нанокompatитні ФС на основі МС та НЧ Au.

Останні (колоїдне золото) здатні підвищувати ефективність ФДТ за рахунок ряду факторів. По-перше, вони доносять до пухлинних клітин більшу кількість молекул ФС (порівняно із застосуванням вільного ФС) [8]. По-друге, відомо, що

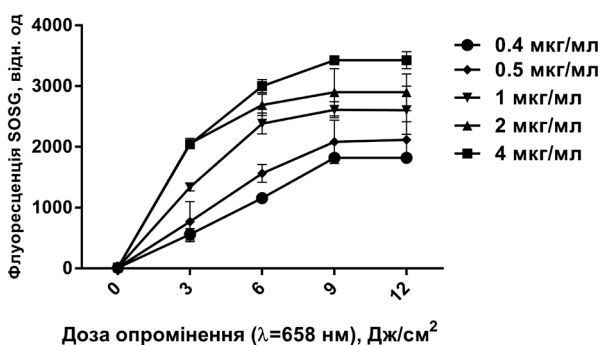


Рис. 3. Продукція синглетного кисню розчинами МС

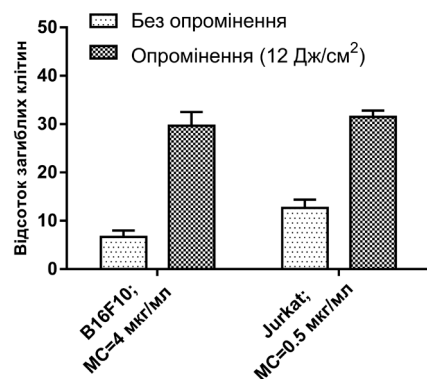


Рис. 4. Чутливість клітин двох ліній до фотодинамічного впливу з МС

НЧ Au володіють пухлинотропністю за рахунок специфічного зв'язування з VEGF₁₆₁ [2]. По-третє, пошкодження пухлинних клітин при фотодинамічному впливі з нанокompatитними ФС може відбуватися за рахунок плазмонних ефектів, що виникають в НЧ Au під впливом електромагнітного поля світла [11, 10]. І, нарешті, показано, що золоті наночастинки сорбують на своїй поверхні вільні радикали [17]. Відомо, що висока реакційна здатність вільних радикалів пояснюється наявністю в них неспарених електронів. З іншого боку, відомо, що атоми благородних металів, в тому числі і золота, мають багато вільних електронів, які утворюють хмару навколо їх наночастинок. Ця хмара вільних електронів і приєднує до себе неспарений електрон вільного радикалу, внаслідок чого радикал сорбується на поверхні НЧ Au.

Відомо також, що між фотореакціями першого та другого типів існують конкурентні взаємовідносини, і якщо реакції одного типу пригнічуються, то реакції іншого типу отримують перевагу. Отже, якщо при фотодинамічному впливі пригнічуються реакції з утворенням вільних радикалів, отримують перевагу реакції з утворенням синглетного кисню, цитотоксичність якого вища порівняно з цитотоксичністю вільних радикалів.

В основі всіх методів синтезу НЧ Au лежить реакція відновлення тетрахлораурату $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, і методи синтезу відрізняються тільки використаним відновником. Ми використали НЧ Au двох типів: 1) отримані цитратним методом (відновлення тетрахлораурату цитратом натрію), та 2) отримані при використанні в якості відновника полуксамеру плуроніка F127.

«Цитратні» сфероподібні НЧ Au мали діаметр 15 нм та були стабілізовані полівінілпіролідом. Досліджено продукцію синглетного кисню при опроміненні нанокompatитів, що містили 4 мкг/мл МС та різні концентрації наночастинок (рис. 5).

Встановлено, що максимальна кількість синглетного кисню продукувалась при опроміненні композиту, що містив 20 мкг/мл НЧ Au.

Таке співвідношення наночастинок та МС в нанокompatиті (20 мкг/мл наночастинок та 4 мкг/мл ФС) було використано в експериментах на клітинах меланоми (рис. 6). Застосування нанокompatиту вдвічі підвищувало кількість загиблих внаслідок опромінення клітин порівняно з вільним МС в тій же концентрації.

При згаданій вище методиці синтезу золотих наночастинок, розробленій T.Simon зі співавторами [20], у якості відновника тетрахлораурату використовується полуксамер плуронік F127. Полуксамери, або плуроніки — це амфифільні триблокові співполімери, молекула яких складається з центрального гідрофобного блоку, представленого поліпропіленоксидом, та на кінцях цього блоку — двома гідрофільними поліетиленоксидними блоками (рис. 7).

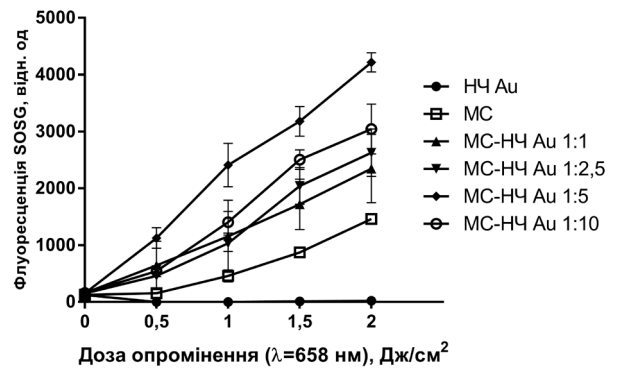


Рис.5. Продукція синглетного кисню композитами МС із наносферами золота

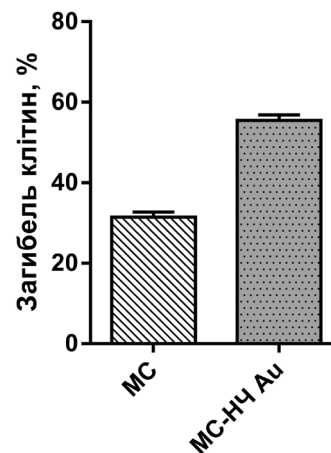


Рис.6. Чутливість клітин меланоми мишей (клітинна лінія B16F10) до фотодинамічного впливу з МС та його нанокompatитом

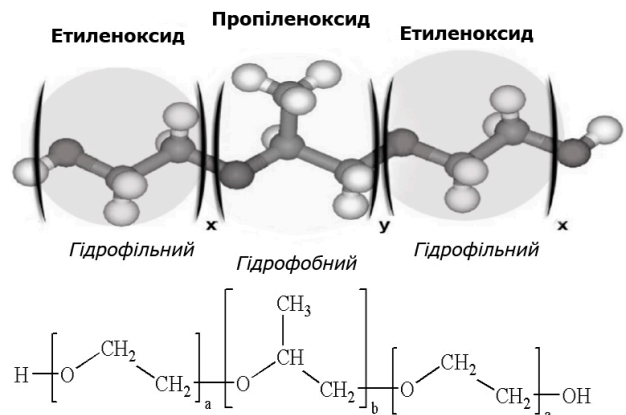


Рис. 7. Структура полуксамеру

Завдяки даній структурі полуксамери приєднують до себе гідрофобні, гідрофільні та амфифільні молекули і легко вбудовуються в поверхневу мембрану клітин, особливо пухлинних, завдяки наявності в мембранах таких клітин великої кількості ліпопротеїнів низької щільності. Таким чином полуксамери можуть переносити в пухлинні клітини молекули лікарських препаратів з різним ступенем розчинності.

Плюронік F127 – нетоксичний біодоступний полімер, дозволений до застосування в фармакології при виготовленні практично всіх лікарських форм. Завдяки своїй здатності легко проводити в пухлинну клітину хіміотерапевтичні препарати, плюронік F127 пройшов II фазу клінічних випробувань по подоланню множинної лікарської резистентності [1]. Резистентність пухлин у великій мірі забезпечується наявністю в поверхневій мембрані їх клітин високоактивного АТФ-залежного транспортера, що відповідає за видалення з клітини молекул лікарських препаратів [1]. Вбудовуючись в поверхневу мембрану, плюронік F127 розріджує її, підвищує плинність мембрани, і таким чином порушує зв'язок між глікопротеїновим транспортером та його АТФ-азою, що також закріплена в поверхневій мембрані. Внаслідок цього відбувається пригнічення АТФ-азної активності, і транспортер перестає функціонувати.

Раніше нами було показано, що плюронік F127 підвищує фотодинамічну активність хлорину еб та його наноконструктивів з колоїдним золотом, в результаті чого спостерігається загибель всіх опромінених трансформованих лімфоцитів Т- та В-клітинних ліній. Тому ми сподівалися, що поєднання в одному композиті НЧ Au, плюроніку F127 та ФС дозволить значно підвищити фотодинамічну активність МС відносно клітин меланоми.

Ми синтезували НЧ Au при відновленні тетрахлораурату плюроніком F127 та створили на їх основі композитний ФС з МС, після чого перевірили його фотодинамічну активність на клітинах меланоми та порівняли її з фотодинамічною активністю вільного МС в тій же концентрації. Виявилось, що при опроміненні клітин меланоми, проінкубованих з таким наноконструктивом, відсоток загиблих клітин менший, ніж при дії вільного МС.

Автори методики синтезу НЧ Au за допомогою плюроніку F127 також створили композитний ФС на основі таких наночастинок та МС і перевірили його фотодинамічну активність в досліді на клітинах меланоми *in vitro* [20]. Вони опромінювали клітини через конденсор мікроскопа і продемонстрували загибель меланомних клітин внаслідок опромінення, але, на жаль, не вказали дозу енергії опромінення і щільність потужності на рівні клітин, а лише вихідну щільність потужності світла. Крім того, вони не проводили кількісного дослідження загибелі опромінених меланомних клітин при дії композитного ФС порівняно з вільним МС і тому не змогли зареєструвати нижчу активність композиту.

Зважаючи на те, що МС має високий редокс-потенціал, а плюронік F127 відновлює золото з тетрахлораурату при кімнатній температурі, вірогідним є припущення, що внаслідок взаємодії МС із залишками плюроніку в розчині наночастинок відбувається відновлення частини молекул МС до безкольорової лейкоформи, і концентрація ФС в композиті зменшується. Його стає недостатньо, щоб підвищити загибель клітин меланоми.

Вплив хітозану на фотодинамічну активність метиленового синього. Крім НЧ Au, нами апробовано вплив на фотодинамічну активність МС природного полісахариду хітозану. Хітозан – продукт деацетилювання хітину - зовнішнього скелету ракоподібних, комах і грибів. Він нетоксичний, біосумісний, дозволений до застосування в фармакології. Хітозан – полікатионний електроліт, його молекула має багато аміногруп (рис. 8), тому він легко утворює комплекси з негативно зарядженими молекулами.

В біологічному середовищі хітозан поступово деградує, вивільняючи приєднані до нього молекули, тому його застосовують в дослідженнях з контрольованого вивільнення лікарських препаратів [16]. Внаслідок високої мукоадгезивності хітозан значно полегшує проникнення лікарських

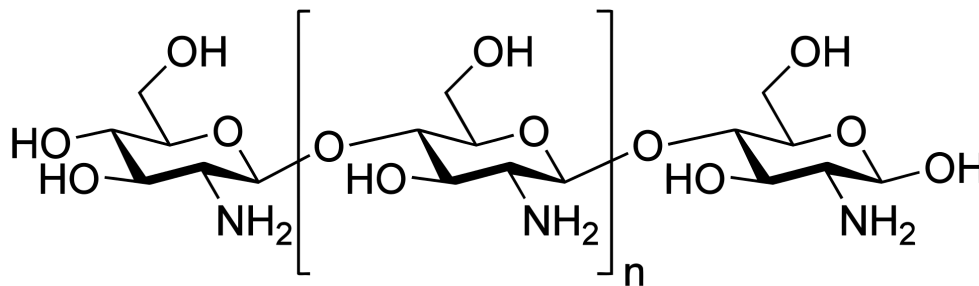


Рис. 8. Структурна формула хітозану

препаратів через слизові оболонки. Показано, що хітозан знижує активність матриксних металопротеїназ (ММР) – ферментів, що забезпечують інвазію та метастазування пухлин. В літературі є дані відносно впливу хітозану на активність ММР-2, ММР-4 та ММР-9 [16, 9]. Особливо важливим є вплив хітозану на активність ММР-2, тому що субстратом для цієї матриксної металопротеїнази є колаген IV типу, основний структурний матеріал базальної мембрани шкіри. Зниження хітозаном активності цієї металопротеїнази може пригнічувати інвазію та метастазування меланоми.

Нами апробовано вплив різних концентрацій хітозану на фотодинамічну активність МС по відношенню до клітин меланоми. Виявилось, що в концентраціях 10 мкг/мл та 20 мкг/мл хітозан не впливає на фотодинамічну активність МС. Але починаючи з концентрації 30 мкг/мл хітозан підвищує відсоток загиблих внаслідок опромінення клітин, і при концентрації хітозану 40 мкг/мл загибель клітин меланоми досягає 96% (рис. 9).

Висновки



Рис. 9. Вплив хітозану на фотодинамічну активність МС (клітинна лінія меланоми мишей В16F10)

Дослідження продукції синглетного кисню МС при опроміненні показало, що хітозан в розчині не впливає на цей процес (рис. 10). Це говорить про те, що причина підвищення фотодинамічної активності ФС хітозаном полягає в процесах, що відбуваються безпосередньо в клітині.

Ми дослідили вплив хітозану на накопичення МС в клітинах меланоми. Виявилось, що хітозан в концентрації 40 мкг/мл більш ніж в три рази збільшує накопичення ФС в клітинах: з 0,66 мкг/млн. клітин до 2,75 мкг/млн. клітин, що, очевидно, і спричиняє підвищення їх загибелі в три рази. Імовірно, взаємодія полікатионної молекули хітозану з негативно зарядженою поверхневою мембраною клітин призводить до збільшення її проникності для МС.

Отримані в експериментах *in vitro* результати відносно чутливості клітин меланоми до фотодинамічного впливу з МС та можливостей підвищити таку чутливість за допомогою НЧ Au чи хітозану в даний час перевіряються в досліджах *in vivo* на мишах з перещепленою меланою В16.

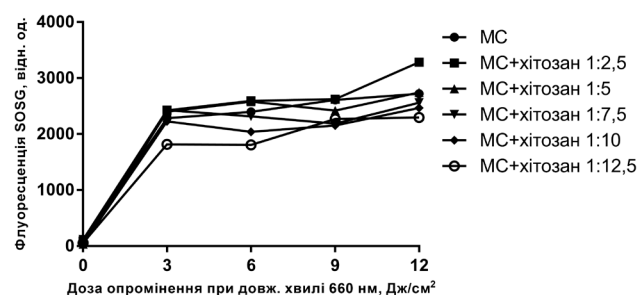


Рис. 10. Продукція синглетного кисню композитами МС із хітозаном

1. Клітини меланоми мишей (клітинна лінія В16F10) проявляють певну чутливість до фотодинамічного впливу з МС.

2. Чутливість меланомних клітин до такого впливу значно нижча, ніж у пухлинних клітин, що не мають фенотипу множинної лікарської резистентності (Т-клітинна лінія трансформованих лімфоцитів людини Jurkat).

3. Нанокompatитний ФС на основі цитратних НЧ Au та МС продемонстрував вдвічі вищу фотодинамічну активність по відношенню до меланомних клітин порівняно з вільним МС в тій же концентрації.

4. Природний полісахарид хітозан підвищує накопичення МС в клітинах меланоми, що дозволило отримати загибель 96% клітин, опромінених лазерним світлом з довжиною хвилі 658 нм.

Подяка

Робота була частково підтримана проектом НАТО SfP No. 984702 «Металеві нанокристали для високочутливого виявлення біохімічних агентів».

Література

1. Alakhova D.Y. Pluronic and MDR reversal: An update / D.Y.Alakhova, A.V.Kabanov // *Mol. Pharm.* – 2014. – Vol. 11, № 8. – P. 2566-2578.
2. Bhattacharya R. Biological properties of «naked» metal nanoparticles / R.Bhattacharya, P.Mukherjee // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – Vol. 60. – P. 1289-1306.
3. Bombelli F.B. The scope of nanoparticle therapies for future metastatic melanoma treatment / F.B.Bombelli, C.A.Webster, M.Moncrieff, V.Sherwood // *Lancet Oncol.* – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. e22-e32.
4. Camerin M. The *in vivo* efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma / M.Camerin, M.Magaraggia, M.Soncin et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 46, № 10. – P. 1910-1918.
5. Camerin M. Delivery of a hydrophobic phthalocyanine photosensitizer using PEGylated gold nanoparticle conjugates for the *in vivo* photodynamic therapy of amelanotic melanoma / M.Camerin, M.Moreno, M.J.Marin et al. // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2016. – Vol. 15, № 5. – P. 889-905.
6. Chang C.-J. *In vitro* and *in vivo* photosensitizing applications of Photofrin in malignant melanoma cells / C.-J.Chang, J.-S.Yu, F.-C.Wei // *Chang Gung Med. J.* – 2008. – Vol. 31, № 3. – P. 260-267.
7. Davids L.M. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool / L.M.Davids, B.Kleemann //

- Cancer Treat. Rev.* – 2010. – Vol. 37, № 6. – P. 465-75.
8. Gamaleia N. F. Photodynamic activity of hematoporphyrin conjugates with gold nanoparticles: Experiments in vitro / N.F.Gamaleia, E.D.Shishko, G.A.Dolinsky et al. // *Exp. Oncol.* – 2010. – Vol. 32, № 1. – P. 44-47.
 9. Gorzelanny C. Specific interaction between chitosan and matrix metalloprotease 2 decreases the invasive activity of human melanoma cells / C.Gorzelanny, B.Pöppelmann, E.Strozyk et al. // *Biomacromolecules.* – 2007. – Vol. 8, № 10. – P. 3035-3040.
 10. Huang X. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy / X.Huang, M.El-Sayed // *J. Adv. Res.* – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 13-28.
 11. Jain P.K. Au nanoparticles target cancer / P.K.Jain, I.H.El-Sayed, M.A.El-Sayed // *Nano Today.* – 2007. – Vol. 2, № 1. – P. 18-29.
 12. Kawczyk-Krupka A. Photodynamic therapy in treatment of cutaneous and choroidal melanoma / A.Kawczyk-Krupka, A.M.Bugaj, W.Latos et al. // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2013. – Vol. 10, № 4. – P. 503-509.
 13. Link E.M. Targeting melanoma with 211At/31J-methylene blue. Preclinical and clinical experience // *Hybridoma.* – 1999. – Vol. 18, № 1. – P. 77-82.
 14. Link E. M. Uptake and therapeutic effectiveness of 125I- and 211At-methylene blue for pigmented melanoma in an animal model system / E.M.Link, I.Brown, R.N.Carpenter, J.S.Mitchell // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49, № 15. – P. 4332-4337.
 15. Mbakidi J.P. Hydrophilic chlorin-conjugated magnetic nanoparticles – potential anticancer agent for the treatment of melanoma by PDT / J.P.Mbakidi, N.Drogat, R.Granet et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23, № 9. – P. 2486-2490.
 16. Muanprasat C. Chitosan oligosaccharide: biological activities and potential therapeutic applications / C.Muanprasat, V.Chatsudhipong // *Pharmacol. Ther.* – 2017. – Vol. 170. – P. 80-97.
 17. Razzaq H. Interaction of gold nanoparticles with free radicals and their role in enhancing the scavenging activity of ascorbic acid / H.Razzaq, F.Saira, A.Yaqub et al. // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2016. – Vol. 161. – P. 266-272.
 18. Rigon R.B. Nanotechnology-based drug delivery systems for melanoma antitumoral therapy: A review / R.B.Rigon, M.H.Oyafuso, A.T.Fujimura et al. // *Biomed Res. Int.* – 2015. – Article ID 841817, 22 p.; <http://dx.doi.org/10.1155/2015/841817>.
 19. Schmidt T.F. Binding of methylene blue onto Langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy / T.F.Schmidt, L.Caseli, O.N.Oliveira, R.Itri // *Langmuir.* – 2015. – Vol. 31, № 14. – P. 4205-4212.
 20. Simon T. LED-activated methylene blue-loaded Pluronic-nanogold hybrids for in vitro photodynamic therapy / T.Simon, S.Boca-Farcau, A.-M.Gabudean et al. // *J. Biophotonics.* – 2013. – Vol. 6, № 11-12. – P. 950-959.
 21. Singh B. Updates in therapy for advanced melanoma / B.Singh, A.Salama // *Cancers (Basel).* – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 17.
 22. Sobal G. Radioiodinated methylene blue – a promising agent for melanoma scintigraphy: Labelling, stability and in vitro uptake by melanoma cells / G.Sobal, M.Rodrigues, H.Sinzinger // *Anticancer Res.* – 2008. – Vol. 28, № 6A. – P. 3691-3693.
 23. Tardivo J.P. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications / J.P.Tardivo, A. Del Giglio, C.S. de Oliveira et al. // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2005. – Vol. 2, № 3. – P. 175-191.
 24. Verdier M. Photodynamic treatment induces cell death by apoptosis or autophagy depending on the melanin content in two B16 melanoma cell lines / M.Verdier, S.Bellaton, T.Naves et al. // *Oncol. Rep.* – 2012. – Vol. 29, № 3. – P. 1196-200.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Гамалія Микола Федорович – д-р біол. наук, проф., зав. лабораторії квантової нанобіології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН (до 2016 року).

Шишко Євгенія Денисівна – канд. біол. наук, старш. наук. співр. Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Адреса: вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022, Україна; тел.: +38 (044) 258-16-58; e-mail: shyshko.e@gmail.com.

Штонь Ірина Олександрівна – провідний інженер лабораторії квантової нанобіології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Адреса: вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022, Україна; тел.: +38 (044) 258-16-58; e-mail: shyshko.e@gmail.com.

Прокопенко Ігор Вікторович – канд. біол. наук, старш. наук. співр. відділу клітинної фотобіології і фотомодуляції зростання пухлин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України. Адреса: вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022, Україна; тел.: +38 (044) 258-16-58; e-mail: shyshko.e@gmail.com.

Н.Ф. Гамалея, Е.Д. Шишко, И.А. Штонь, И.В. Прокопенко

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев, Украина

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КРАСИТЕЛЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО НА КЛЕТКИ МЕЛАНОМЫ МЫШЕЙ

Меланома — агрессивная злокачественная опухоль, устойчивая к химио- и радиотерапии. Принимая во внимание то, что механизм фотодинамического повреждения отличается от механизма разрушения клеток противоопухолевыми препаратами или ионизирующей радиацией, представляется вполне вероятным предположение, что с помощью фотодинамического воздействия можно достичь повреждения меланомных клеток. Исследование выполнено на клетках меланомы мышей (клеточная линия B16F10). В качестве фотосенсибилизатора был использован краситель метиленовый синий (МС) из-за его аффинности к пигменту меланомных клеток меланину.

Установлено, что клетки линии B16F10 проявляют определенную чувствительность к фотодинамическому действию МС, но значительно более низкую, чем опухолевые клетки, не имеющие фенотипа множественной лекарственной резистентности (Т-клеточная линия трансформированных лимфоцитов человека Jurkat). Показано, что фотодинамическую активность МС относительно меланомных клеток можно повысить с помощью наночастиц золота (НЧ Au). В опытах использовано два вида последних: НЧ Au, при синтезе которых в качестве восстановителя тетрахлораурат использовано цитрат натрия («цитратные»), и НЧ Au, при синтезе которых восстановителем служил полоксамер плуроник F127 («плурониновые»).

Созданы нанокомпозитные фотосенсибилизаторы на основе МС и наноразмерного золота. Применение «цитратных» НЧ Au вдвое повысило число погибших в результате облучения меланомных клеток по сравнению со свободным МС в той же концентрации, что и в композитном фотосенсибилизаторе. Композит МС с «плурониновыми» НЧ Au, наоборот, приводил к гибели несколько меньшего количества облученных клеток по сравнению со свободным МС. Это, очевидно, объясняется частичным восстановлением МС до бесцветной лейкоформы остатками плуроника F127. в растворе НЧ Au после их отмывания центрифугированием.

Проверено также влияние природного полисахарида хитозана на фотодинамическую активность МС. Показано, что примененный вместе с МС хитозан повышает накопление фотосенсибилизатора в клетках меланомы, что приводит к гибели 96% облученных клеток.

Таким образом, клетки меланомы мышей (клеточная линия B16F10) демонстрируют определенную чувствительность к фотодинамическому влиянию с МС. Чувствительность меланомных клеток к такому влиянию значительно снижена по сравнению с чувствительностью опухолевых клеток, не имеющих фенотипа множественной лекарственной резистентности (Т-клеточная линия трансформированных лимфоцитов человека Jurkat). Нанокомпозитный ФС на основе цитратных НЧ Au и МС продемонстрировал в два раза более высокую фотодинамическую активность по отношению к меланомным клеткам по сравнению со свободным МС в той же концентрации. Природный полисахарид хитозан повысил накопление МС в клетках меланомы, что позволило получить гибель 96% клеток, облученных лазерным светом с длиной волны 658 нм.

Ключевые слова: клеточная линия меланомы мышей B16F10, фотодинамическая терапия, метиленовый синий, наночастицы золота, хитозан.

N.F. Gamaleia, E.D. Shyshko, I.O. Shton, I.V. Prokopenko

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF THE DYE METHYLENE BLUE ON MURINE MELANOMA CELLS

Melanoma is an aggressive malignant tumor that is resistant to chemo- and radiotherapy. Taking into account that the mechanism of photodynamic damage significantly differs from the mechanism of cell destruction by cytotoxic drugs or ionizing radiation, it can be assumed that melanoma damage can be achieved with the help of photodynamic therapy.

The study was performed on murine melanoma cell line B16F10. Methylene blue (MB) dye was used as a photosensitizer (PS) because of its known affinity to the melanoma cell pigment – melanin.

It has been found that B16F10 cells possess sensitivity to photodynamic therapy with MB. But this effect was significantly lower than for tumor cells that lack multiple drug resistance phenotype (human transformed T-cell line Jurkat). It was shown that the photodynamic activity of MB in relation to melanoma cells can be increased by creating of its composite with gold nanoparticles (GNP), in the synthesis of which tetrachloroaurate reduction was made by sodium citrate, but not by poloxamer Pluronic F127.

After the sensitization of melanoma cells with MB in composition with citrate GNPs and subsequent laser irradiation, twofold increase of cell death was achieved in comparison with free MB used in the same concentration. The MB composite with GNPs, synthesized with the presence of Pluronic F127, on the contrary, after light exposure led to the elimination of a slightly reduced number of cells compared to free MB. This effect can be evidently explained by the partial reduction of the MB to the colorless leuco-form by the pluronic F127, which remained in the solution of GNP after their washing by centrifugation.

The effect of natural polysaccharide chitosan on photodynamic activity of MB was also studied. It has been shown that the use of chitosan together with MB increased the accumulation of PS in melanoma cells, which led to the elimination of 96% of irradiated cells.

Thus, murine melanoma cell line B16F10 exhibits sensitivity to photodynamic therapy with MB. The susceptibility of melanoma cells to this treatment is significantly reduced in comparison with the sensitivity of tumor cells, which do not have the phenotype of multiple drug resistance (transformed human T-cell line Jurkat). Nanocomposite PS based on citrate GNPs and MB demonstrated twice higher photodynamic activity with the respect to melanoma cells in comparison to free MB at the same concentration. Natural polysaccharide chitosan increased the accumulation of MB in melanoma cells, which allowed achieving cell mortality up to 96% after irradiation of the samples with laser light on a wavelength of 658 nm.

Key words: *murine melanoma cell line B16F10, photodynamic therapy, methylene blue, gold nanoparticles, chitosan.*