

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-47-56>

# Разработка полимерных микрочастиц с радахлорином и оценка перспектив их использования в фотодинамической терапии

А.М. Мирошкина<sup>1</sup>, С.П. Кречетов<sup>2</sup>, Н.Л. Соловьева<sup>1</sup>, И.И. Краснюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

**Контакты:** Анастасия Максимовна Мирошкина [asyamir@mail.ru](mailto:asyamir@mail.ru)

**Введение.** Сегодня активно ведутся разработки по получению систем доставки на основе микро- и наночастиц для повышения избирательности и эффективности действия фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии. Такие частицы позволяют повысить эффективность уже используемых химиотерапевтических препаратов за счет их накопления в опухоли, а также способствуют преодолению лекарственной устойчивости опухолевых клеток.

**Цель исследования** – получение микрочастиц на основе биосовместимого блок-сополимера молочной и глицериновой кислот с включением фотосенсибилизатора радахлорина, магнитных наночастиц и перфтордекалина и последующая оценка их использования в качестве терапевтических агентов для фотодинамической терапии.

**Материалы и методы.** Микрочастицы были получены с помощью метода двойной эмульсии, описаны с помощью электронной микроскопии. Оценка фотодинамических свойств таких микрочастиц была проведена с помощью спектрофотометрии и МТТ-теста на культуре клеток.

**Результаты.** Получены микрочастицы сферической формы размером менее 1 мкм. Высвобождение действующего вещества из микрочастиц происходило постепенно, в течение 2 нед, а в микрочастицах с магнитными наночастицами концентрация радахлорина оставалась практически неизменной в течение месяца. Воздействие на микрочастицы светом красного светодиода сопровождалось образованием синглетного кислорода. Электронная микроскопия показала внутриклеточное положение микрочастиц в опухолевых клетках. МТТ-тест выявил значительное угнетение жизнеспособности клеток в присутствии микрочастиц.

**Заключение.** Результаты исследования позволяют рассматривать полученные биосовместимые полимерные микрочастицы с включением в них радахлорина в качестве депо радахлорина для местного применения при фотодинамической терапии опухолей.

**Ключевые слова:** микрочастицы, радахлорин, перфтордекалин, магнитные наночастицы, фотодинамическая терапия

**Для цитирования:** Мирошкина А.М., Кречетов С.П., Соловьева Н.Л., Краснюк И.И. Разработка полимерных микрочастиц с радахлорином и оценка перспектив их использования в фотодинамической терапии. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):47–56. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-47-56.

## Development of polymeric microparticles with radachlorine and estimation of the prospects of their use in photodynamic therapy

Anastasia M. Miroshkina<sup>1</sup>, Sergey P. Krechetov<sup>2</sup>, Natalia L. Solovieva<sup>1</sup>, Ivan I. Krasnyuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University); 9 Institutskiy per., Dolgoprudny 141701, Russia

**Contacts:** Anastasia Maximovna Miroshkina [asyamir@mail.ru](mailto:asyamir@mail.ru)

**Introduction.** Nowadays, the development of delivery systems based on micro- and nanoparticles is being actively pursued to increase the selectivity and efficiency of photosensitizers in photodynamic therapy. Such microparticles

could increase the effectiveness of the already used chemotherapeutic drugs due to their accumulation in the tumor and help to overcome the drug resistance of tumor cells.

**The aim** of this research was to obtain microparticles based on a biocompatible block copolymer of lactic and glycolic acids with the inclusion of the photosensitizer radachlorin, magnetic nanoparticles, and perfluorodecalin and their subsequent evaluation as therapeutic agents for photodynamic therapy.

**Materials and methods.** Microparticles were obtained using the double emulsion method, described using of electron microscopy. Evaluation of their photodynamic properties was carried out using spectrophotometry and MTT-test on cell culture.

**Results.** Spherical microparticles with a size of less than 1  $\mu\text{m}$  were obtained. The release of the active substance from microparticles occurred gradually over two weeks, and in the case of the presence of magnetic nanoparticles, the concentration of radachlorin remained practically unchanged for a month. Exposure of microparticles to the light of LED is accompanied by the formation of singlet oxygen. Electron microscopy indicated intracellular position of microparticles in tumor cells. The MTT test revealed a significant inhibition of cell viability in the presence of microparticles.

**Conclusion.** The research results allow us to consider the obtained biocompatible polymer microparticles with the inclusion of radachlorin as a depot of radachlorin for local use in photodynamic therapy of tumors.

**Key words:** microparticles, radachlorin, perfluorodecalin, magnetic nanoparticles, photodynamic therapy

**For citation:** Miroshkina A.M., Krechetov S.P., Solovieva N.L., Krasnyuk I.I. Development of polymeric microparticles with radachlorine and estimation of the prospects of their use in photodynamic therapy. Rossiyskiy bioterapevicheskiy zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):47–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-47-56.

## Введение

Основным недостатком применения химиотерапии при лечении онкологических заболеваний является системное токсическое действие противоопухолевых препаратов [1]. Использование фотодинамической терапии (ФДТ) в клинической практике характеризуется высоким процентом положительных результатов в лечении опухолей на ранних стадиях [2] и относительно меньшим количеством побочных эффектов по сравнению с химиотерапией [3]. В основе метода ФДТ лежит способность предварительно введенных в организм фотоактивных веществ — фотосенсибилизаторов (ФС) — накапливаться в опухоли и под воздействием лазерного облучения с определенной длиной волны генерировать цитотоксичный синглетный кислород. Применение процедуры ФДТ уменьшает побочные системные эффекты даже при введении ФС в системный кровоток [4]. В сочетании с эндоскопией ФДТ используется для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта, легких, мочеполовых путей, перитонеальной и плевральной полостей [5].

Радачлорин® (РХ) является ФС 2-го поколения, который используется для флуоресцентной диагностики и ФДТ злокачественных опухолей [6]. В качестве действующих веществ он содержит натриевые соли хлорина е6 (до 90 %), хлорина р6 (5–7 %) и пурпурина 5 (1–5 %). Привлекательность использования РХ обусловлена наличием у него выраженного максимума в красной области спектра поглощения (662 нм) и высоким квантовым выходом образования синглетного кислорода при поглощении света в этой области [7]. Высокая фототоксичность РХ [8], хорошая избирательность накопления препарата в опухоли и быстрое выведение его из организма обуславливают

отсутствие гиперфоточувствительности кожных покровов и малое количество побочных системных эффектов после ФДТ [8]. Эффективность ФДТ с использованием РХ показана для злокачественных новообразований кожи, легких, желудочно-кишечного тракта, мочеполовых путей [9, 10].

Системы доставки на основе микро- и наночастиц (МЧ и НЧ) позволяют повысить эффективность действия на опухоли уже использующихся при лечении рака химиотерапевтических препаратов [11, 12] путем увеличения местного воздействия на молекулярные мишени в результате накопления таких частиц в опухоли. Еще одним положительным моментом использования систем доставки на основе МЧ и НЧ является преодоление лекарственной устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам в молекулярной форме [13].

Включение ФС в состав МЧ и НЧ позволяет повысить эффективность ФДТ не только с помощью описанных выше общих преимуществ использования МЧ и НЧ в качестве систем доставки [14]. Наличие у ФС собственной флуоресценции позволяет визуализировать частицы с этими веществами в тканях организма, что делает МЧ и НЧ с ФС пригодными для тераностики: диагностики, лечения и наблюдения за изменениями в опухоли в ходе лечения [15].

Использование биоразлагаемых полимеров в качестве основы для получения систем доставки стало возможным благодаря их способности образовывать стабильные МЧ и эффективному включению лекарственных веществ различной физико-химической природы в полимерную матрицу. Основными критериями выбора материала для каркаса МЧ являются биосовместимость с клетками, простота изготовления,

отсутствие токсичности и ответных воспалительных процессов, иммунологических и тромбогенных ответов [16].

Включение магнитных наночастиц (МНЧ) в полимерную матрицу МЧ и дальнейшее управление ими с помощью внешнего магнитного поля позволяют рассматривать подобные МЧ в качестве системы целевой доставки лекарственного препарата к соответствующему биологическому объекту [17]. Способность МНЧ поглощать внешнюю электромагнитную энергию и преобразовывать ее в тепло привлекательна для использования таких частиц в качестве гипертермических агентов, улучшающих эффективность лучевой и химиотерапии за счет ускорения процесса поражения и деструкции клеток опухоли [18]. Накопление МЧ, содержащих МНЧ, в пораженной области организма также способствует контрастированию картины, получаемой с помощью магнитно-резонансной томографии [19].

Совместное включение РХ и МНЧ в полимерную матрицу МЧ рассматривается как перспективное направление повышения эффективности использования РХ для ФДТ и флуоресцентной диагностики. Создание таких частиц должно способствовать внутриклеточному накоплению и депонированию РХ, а также пролонгированию его действия. Это позволит еще больше локализовать действие ФС и увеличить продолжительность терапевтического окна для ФДТ.

**Цель данного исследования** — получение биосовместимых, биodeградируемых полимерных МЧ с включением РХ и МНЧ и оценка возможности использования таких частиц в качестве терапевтических агентов для ФДТ.

### Материалы и методы

При изготовлении МЧ в качестве ФС использовали концентрат для приготовления раствора для инфузий «Радахлорин» («РАДА-ФАРМА», Россия), содержащий 3,5 мг/мл смеси натриевых солей хлорина е6, хлорина р6, пурпурина 5.

В работе были использованы: блок-сополимер 65:35 молочной и гликолевой кислот (СМГК) Resomer RG 653 H (Evonik Industries AG, Германия); лецитин Lipoid S 100 (Lipoid GmbH, Германия); перфтордекалин (ПФД), 1,3-дифенилбензофуран (ДФБФ), диметилсульфоксид (Sigma, США); поливиниловый спирт 18–88 (Merck, Германия); метилцеллюлоза А4М (Ashland, США). Хлористый метилен, ацетонитрил, а также реактивы, применявшиеся для приготовления буферных растворов, имели квалификацию «химически чистый» или «чистый для анализа» и были получены от «Химмед» (Россия). Суспензия стабилизированных олеиновой кислотой гидрофобных МНЧ в хлороформе (18,5 мг/мл) была предоставлена Е.Л. Колчиным (лаборатория нанобиотехнологий

МФТИ, Россия). В работе использовали деионизованную воду, полученную на установке обратного осмоса УВОИ 1812С6 («НПК Медиана-Фильтр», Россия).

**Метод изготовления МЧ.** Для приготовления МЧ по методу множественной дисперсии «твердое в масле в воде» (Т/М/В) лиофильно высушивали 30 мкл раствора для инфузий «Радахлорин». Затем лиофилизат диспергировали в растворе 2,5 % СМГК и 0,1 % лецитина в хлористом метиле. Полученную первичную дисперсию «твердое в масле» эмульгировали по каплям в 20 мл водного раствора 1 % поливинилового спирта и 0,5 % метилцеллюлозы при температуре 4 °С с использованием Ultra Turrax 25 (IKA, Германия). Готовую вторичную эмульсию Т/М/В смешивали с охлажденными до 4 °С 500 мл воды и выдерживали в течение 6 ч при комнатной температуре с перемешиванием при 300 мин<sup>-1</sup> верхнеприводной мешалкой Eurostar 20 digital (IKA, Германия) с пропеллерным перемешивающим элементом до удаления дихлорметана и затвердевания МЧ. Созревшие МЧ осаждали центрифугированием при 2000 g. Супернатант сливали, а осадок промывали ресуспендированием в 50 мл воды с последующим осаждением в указанных выше условиях. Отмытые МЧ замораживали при –25 °С и высушивали в течение 15 ч в лиофильной сушилке VaCo 2 (ZIRBUS, Германия).

При включении в МЧ стабилизированных олеиновой кислотой МНЧ и ПФД на стадии получения первичной дисперсии «твердое в масле» в раствор СМГК и лецитина в хлористом метиле добавляли 55 мкл суспензии МНЧ и 20 мкл ПФД перед диспергированием лиофилизата РХ.

**Растровая электронная микроскопия (РЭМ).** Изображения получены с использованием микроскопа MAIA3 (TESCAN, Чехия). Образцы частиц для электронной микроскопии наносили на кремниевые подложки в виде суспензии в воде и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Изображения получали при ускоряющем напряжении 10 кВ.

**Измерение размеров и дзета-потенциала МЧ.** Размеры и дзета-потенциал МЧ измеряли в водной суспензии на анализаторе размеров частиц и дзета-потенциала Photocor Compact-Z («Фотокор», Россия).

**Определение содержания РХ в МЧ.** Для определения содержания РХ навеску МЧ растворяли в ацетонитриле и измеряли оптическую плотность при длине волны 662 нм относительно ацетонитрила. Для калибровки использовали растворы РХ в ацетонитриле, получаемые разведением раствора для инфузий «Радахлорин». Содержание воды в калибровочных растворах было менее 0,05 % по объему. Измерения оптической плотности и снятие оптических спектров поглощения образцов проводили на спектрофотометре UV 3600 (Shimadzu, Япония).

**Высвобождение РХ из МЧ.** Высвобождение РХ из МЧ исследовали в 50 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7,4. В 5 мл буфера в центрифужной пробирке суспендировали 8–10 мг МЧ, разливали по 0,4 мл в пробирки Ерпендорф 1,5 мл и инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Перед отбором проб для определения высвободившегося РХ суспензию перемешивали до однородности встряхиванием, а затем осаждали МЧ центрифугированием при 10 000 g 10 мин. На каждый срок отбирали по 0,3 мл супернатанта. Отобранные пробы супернатанта хранили в замороженном состоянии при –20 °С. По завершении эксперимента все отобранные пробы размораживали с последующим определением концентрации РХ по его флуоресценции с использованием планшетного считывателя CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия) в 96-луночных планшетах. Флуоресценция возбуждалась на длине волны 401 нм, регистрировалась на длине волны от 660 нм. Для калибровки использовали растворы РХ в 50 мМ калий-фосфатном буфере, получаемые разведением раствора для инфузий «Радахлорин». Высвобождение РХ из МЧ сравнивали с его разрушением при инкубации в тех же условиях.

**Генерация синглетного кислорода МЧ.** Способность РХ в составе МЧ к образованию синглетного кислорода оценивали при облучении светом светоизлучающего диода (СИД) LZ1 00R202 (OSRAM SYLVANIA LED Engin, США) с максимумом излучения 660 нм. 0,5 мг/мл МЧ в 50 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7,4 помещали в стандартную кювету спектрофотометра при температуре 25 °С. К полученной суспензии добавляли 20 мкл 1 мМ раствора ДФБФ в этаноле, и кювету в заданное время облучали сверху светом СИД. До и после облучения измеряли оптическую плотность при 415 нм в полосе поглощения ДФБФ, превращающегося при взаимодействии с синглетным кислородом в эндоперекись, не поглощающую при этой длине волны. Убыль оптической плотности использовали в качестве характеристики интенсивности образования синглетного кислорода. Образование синглетного кислорода МЧ, содержащими РХ, сравнивали с образованием синглетного кислорода в растворе РХ с концентрацией 8,75 мкг/мл.

**Исследование фотодинамического эффекта МЧ в культуре клеток.** Клеточные культуры СНО (клетки яичников сирийского хомячка) были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). При изучении влияния МЧ на клетки использовали 6-луночные планшеты. Высеивали по  $10^5$  клеток в лунку в 2 мл среды DMEM 12, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина. Клетки культивировали в темноте при

температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % содержанием CO<sub>2</sub>. После 24 ч культивирования и формирования монослоя в одной трети лунок 1-го планшета культуральную среду заменяли на свежую, в другой трети лунок — на раствор 1,75 мкг/мл РХ в культуральной среде, и в остальных лунках — на суспензию 0,5 мг/мл различных видов МЧ в культуральной среде. Через 24 ч во всех лунках культуральную среду заменяли свежей и половину лунок каждого вида облучали 10 мин светом СИД LZ1 00R202 с облученностью на поверхности культуральной среды 100 мВт/см<sup>2</sup>. Влияние МЧ и фотодинамического облучения на клетки оценивали через 24 ч. Микрофотографирование клеток осуществляли на световом микроскопе Axio Observer.A1 (Carl Zeiss, Германия), оборудованном осветителями HAL 100, HBO 100 и цифровой монохромной камерой AxioCam 503 mono, работающей под управлением программного обеспечения ZEN 2. При микроскопии устанавливали блок светофильтров 45 HQ TexasRed (EX BP 560/40, BS FT 585, EM BP 630/75).

**Оценка жизнеспособности клеток.** Для оценки жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста во всех лунках культуральную среду заменяли на свежую, содержащую 0,5 мг/мл МТТ, и инкубировали 0,5 ч в темноте при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. После этого среду удаляли и содержимое лунок растворяли в 1 мл диметилсульфоксида. Количество образовавшегося формазана характеризовали оптической плотностью полученных растворов в лунках при 550 нм, измеренной с использованием планшетного считывателя CLARIOstar. Жизнеспособность клеток после воздействия МЧ и фотодинамического облучения характеризовали отношением оптических плотностей в лунках с клетками, подвергшимися воздействию, и в лунках с контрольными клетками без каких-либо воздействий (100 % жизнеспособность).

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel. Приводимые экспериментальные данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение по результатам как минимум 3 независимых измерений. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Полученные МЧ характеризуются субмикронным размером. Отрицательный заряд частиц обуславливает наличие концевых карбоксильных групп у используемой для получения МЧ СМГК. Полученная величина дзета-потенциала находится на уровне значений, известных из литературы для немодифицированных частиц, что указывает на отсутствие заметного

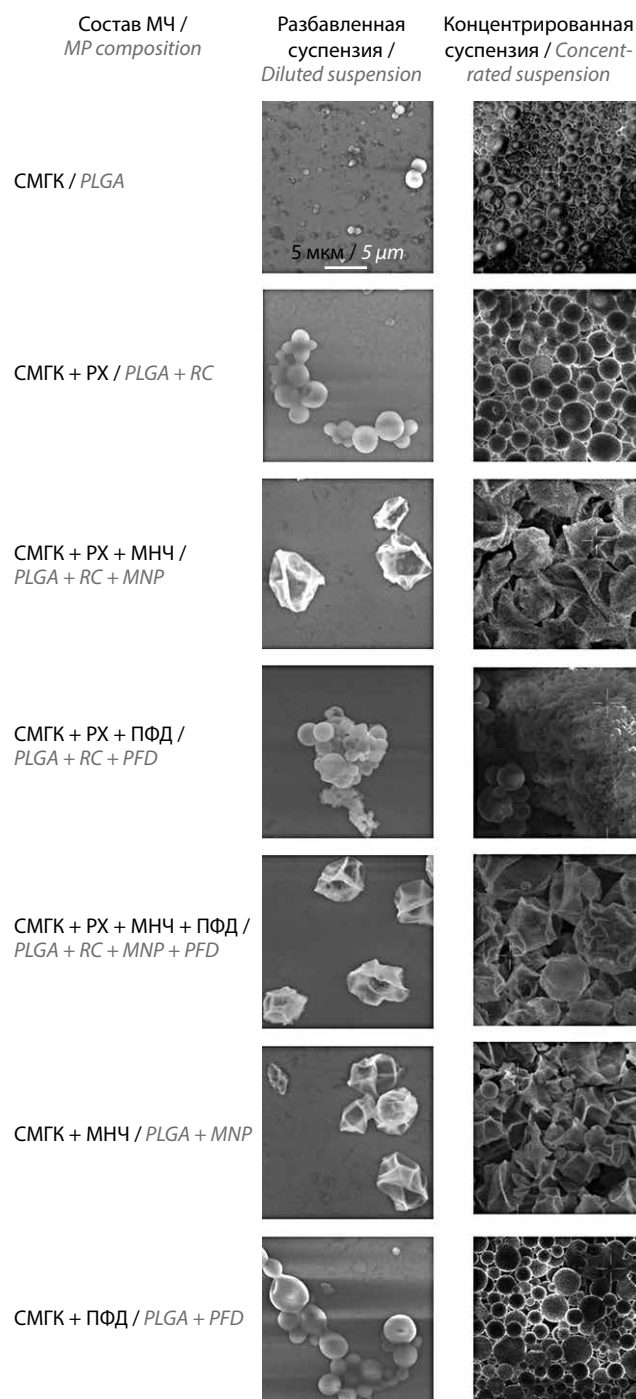


влияния РХ в составе МЧ на их заряд. На изображениях РЭМ видно, что полученные МЧ без МНЧ вне зависимости от присутствия ПФД – сферической формы (рис. 1). При наличии МНЧ в полимерной матрице МЧ имеют неправильную форму с выраженными складками. Данные изменения формы могут быть связаны с образованием 2 фаз – на поверхности МЧ и в ее ядре в начале созревания МЧ. Отсутствие растворимости СМГК в углеводородах [20] предполагает низкое сродство этого полимера к олеиновой кислоте, покрывающей МНЧ, что является предпосылкой для образования внутри созревающей МЧ гидрофобной фазы, обогащенной МНЧ, но с низким содержанием СМГК. Эта фаза более гидрофобна, чем окружающий ее раствор с более высоким содержанием СМГК в хлористом метилена. Диффузия и испарение хлористого метилена из системы приводят в начале созревания МЧ к концентрированию этого раствора с формированием достаточно плотной оболочки, которая по мере диффузии через нее растворителя и уменьшения объема внутренней фазы сморщивается и формирует видимые на изображениях РЭМ складки. Сходным образом происходит образование складок на поверхности частиц, получаемых из полимеров распылительной сушкой с высокой скоростью [21].

Включение РХ в МЧ составило около 10 % от расчетного в образцах без МНЧ (см. таблицу). Наличие МНЧ в МЧ приводит к существенному увеличению включения РХ – до 60–70 %. Необходимо отметить, что добавление лецитина в значительной степени способствует включению РХ в полимерную матрицу МЧ: по результатам предварительных экспериментов при его отсутствии включение РХ в МЧ без МНЧ не превышает 1 %.

На спектрах поглощения образцов, полученных при растворении МЧ в ацетонитриле, присутствуют характерные для РХ пики (рис. 2): длинноволновый в районе 662 нм и коротковолновый в районе 402 нм. Это указывает на то, что РХ, инкапсулированный в МЧ, сохраняет исходные оптические свойства, важные для ФДТ.

Выявляемое достоверно ( $p < 0,05$ ) более высокое образование синглетного кислорода МЧ с РХ по сравнению с МЧ без РХ при облучении водной суспензии МЧ красным СИД указывает на возможность использования таких частиц для ФДТ (рис. 3). Присутствие в полимерной матрице ПФД и МНЧ значительно увеличивает генерацию синглетного кислорода. В МЧ с ПФД это может быть связано с повышенным общим содержанием кислорода в дисперсии из-за его большей растворимости в перфторуглеородах. Интенсификация образования синглетного кислорода в МЧ с МНЧ может быть объяснена выявленным в данном случае увеличением включения РХ в МЧ.



**Рис. 1.** Растровая электронная микроскопия микрочастиц разного состава. Масштабная метка – общая для всех изображений. Здесь, а также на рис. 2–6 и в таблице: МЧ – микрочастицы, СМГК – сополимер молочной и гликолевой кислот, РХ – радацилорин, МНЧ – магнитные наночастицы, ПФД – перфтордекалин

**Fig. 1.** Scanning electron microscopy of microparticles with different composition. Scale mark is common to all images. Here, on figures 2–6 and in table: MP – microparticles, PLGA – Poly(lactide-co-glycolide acid), RC – radachlorin, MNP – magnetic nanoparticles, PFD – perfluorodecalin

Согласно полученным данным (рис. 4), в водной дисперсии МЧ в течение 1-го часа достигается

## Характеристики МЧ

## Characteristics of MP

Состав МЧ MP composition	Гидродинамический радиус МЧ ( $\bar{R} \pm \sigma_R$ ), мкм Hydrodynamic radius of MP ( $\bar{R} \pm \sigma_R$ ), $\mu\text{m}$	Коэффициент полидисперсности МЧ ( $\sigma_R^2/\bar{R}^2$ )* Polydispersity factor of MP ( $\sigma_R^2/\bar{R}^2$ )*	Дзета-потенциал МЧ, мВ Zeta potential of MP, mV	Содержание РХ в МЧ, мкг/мг RC content in MP, $\mu\text{g}/\text{mg}$	Включение РХ в МЧ**, % Inclusion of RC in MP**, %
СМГК PLGA	$0,270 \pm 0,143$	0,280	$-16,6 \pm 2,0$	—	—
СМКГ + РХ PLGA + RC	$0,112 \pm 0,018$	0,027	$-19,5 \pm 4,5$	$0,27 \pm 0,11$	$6,6 \pm 2,7$
СМКГ + РХ + МНЧ PLGA + RC + MNP	$0,240 \pm 0,045$	0,035	$-23,6 \pm 6,8$	$2,34 \pm 0,78$	$60,6 \pm 20,1$
СМКГ + РХ + ПФД PLGA + RC + PFD	$0,138 \pm 0,054$	0,150	$-18,7 \pm 0,4$	$0,27 \pm 0,20$	$16,9 \pm 12,3$
СМКГ + РХ + МНЧ + ПФД PLGA + RC + PFD + MNP	$0,318 \pm 0,150$	0,224	$-19,6 \pm 1,8$	$1,16 \pm 0,59$	$72,3 \pm 36,8$
СМКГ + МНЧ PLGA + MNP	$0,315 \pm 0,092$	0,086	$-17,6 \pm 2,0$	—	—
СМКГ + ПФД PLGA + PFD	$0,378 \pm 0,129$	0,116	$-16,0 \pm 1,1$	—	—

\*Рассчитан по приведенным результатам измерения размеров частиц; \*\*доля от теоретического содержания РХ в МЧ при условии его полного включения.

\*Calculated according to the given results of measuring the particle sizes; \*\*fraction of the theoretical content of RC in the MP, subject to its full inclusion.

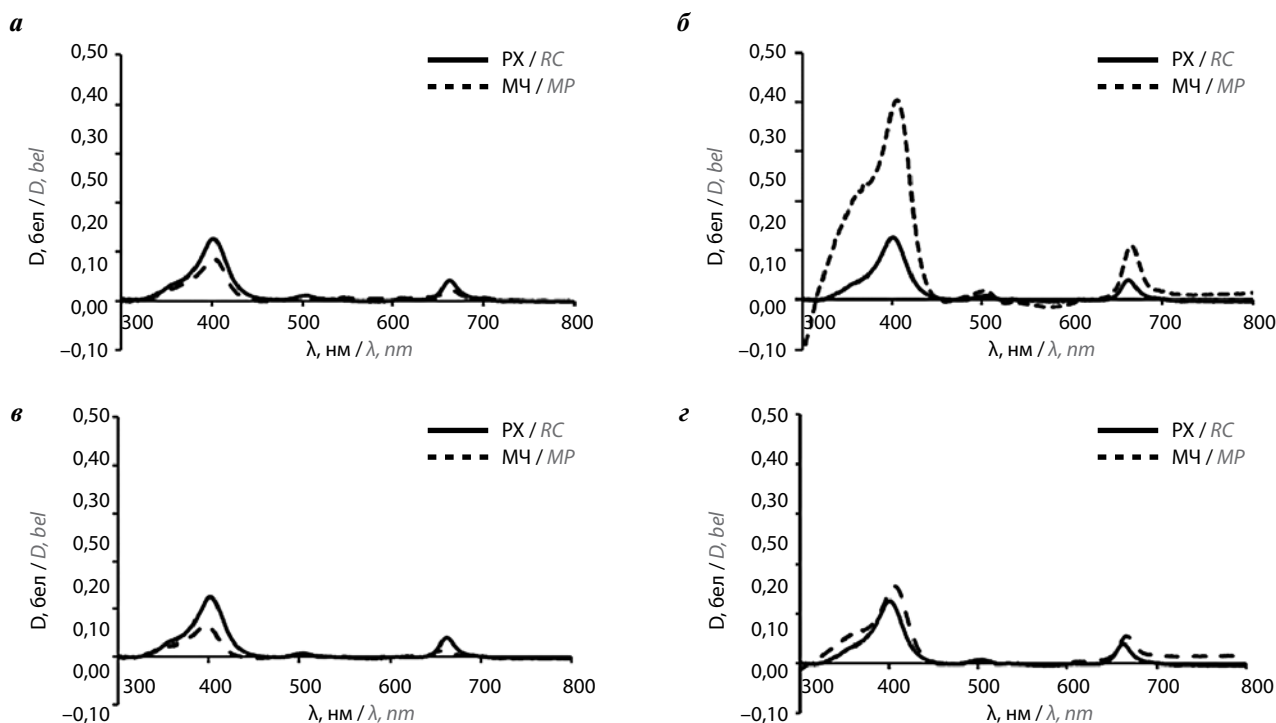


Рис. 2. Спектры поглощения РХ (8,75 мкг/мл) и МЧ (1 мг/мл) в ацетонитриле: а – СМГК + РХ; б – СМГК + РХ + МНЧ; в – СМГК + РХ + ПФД; г – СМГК + РХ + ПФД + МНЧ

Fig. 2. Absorption spectra of RC (8.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and MP (1  $\text{mg}/\text{ml}$ ) in acetonitrile: а – PLGA + RC; б – PLGA + RC + MNP; в – PLGA + RC + PFD; г – PLGA + RC + PFD + MNP

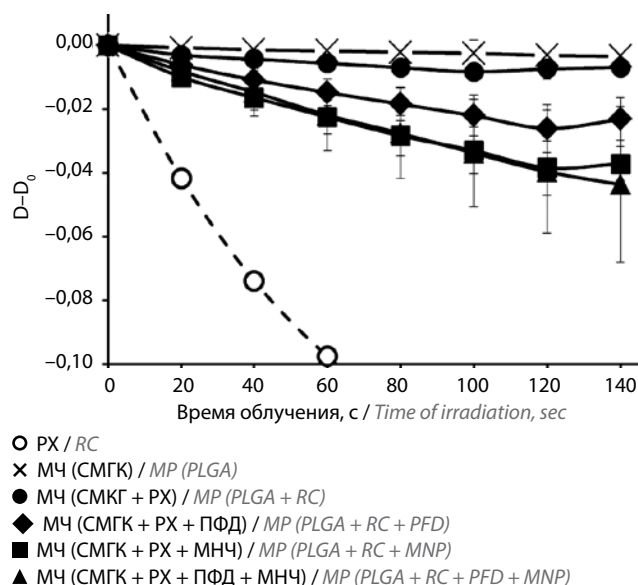


Рис. 3. Генерация синглетного кислорода

Fig. 3. Generation of singlet oxygen

близкая к максимальной концентрация РХ, которая затем медленно снижается в течение периода до 1 мес. В растворе РХ без частиц с исходной концентрацией РХ, практически равной максимальной концентрации высвободившегося из МЧ РХ, его содержание убывает существенно быстрее и уже через сутки оказывается достоверно ниже, чем в суспензии МЧ. При этом в суспензии МЧ без МНЧ концентрация РХ убывает лишь до половины от максимальной только через 2 нед, а в случае присутствия в полимерной матрице МНЧ концентрация РХ остается практически неизменной в течение 30 дней. Описанная кинетика высвобождения характеризует МЧ как депо с пролонгированным высвобождением РХ, пригодное для проведения нескольких последовательных сеансов ФДТ без повторных инъекций ФС.

Согласно результатам проведенных исследований с использованием световой микроскопии, МЧ с РХ поглощаются клетками и накапливаются в цитоплазме, не вызывая при этом существенных изменений в плотности монослоя (рис. 5). Хорошо различимая флуоресценция МЧ на изображениях флуоресцентной микроскопии указывает на возможность использования таких частиц в качестве агентов для диагностики посредством визуализации поглотивших их клеток.

В результате МТТ-теста выявлено, что поглощение МЧ, содержащих РХ, клетками СНО в культуре сопровождается снижением их жизнеспособности различной степени в зависимости от состава МЧ (рис. 6). Наблюдаемое угнетение метаболизма может быть связано как с цитотоксическим действием высвобождающегося внутри клеток РХ, так и с нарушением их структуры поглощенными МЧ. Наиболее значи-

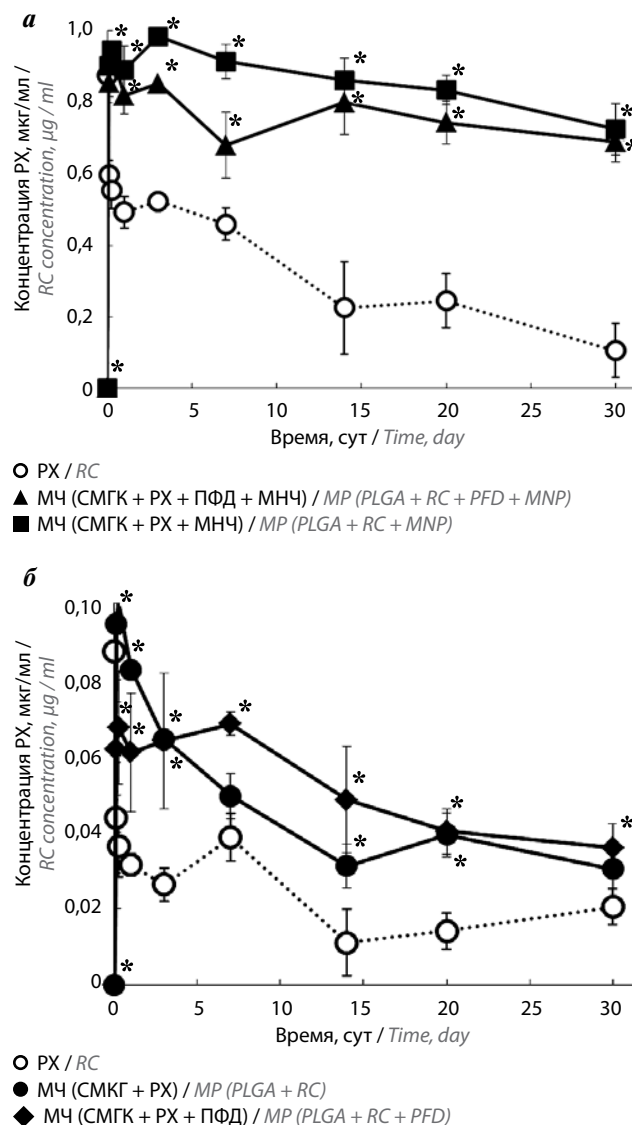
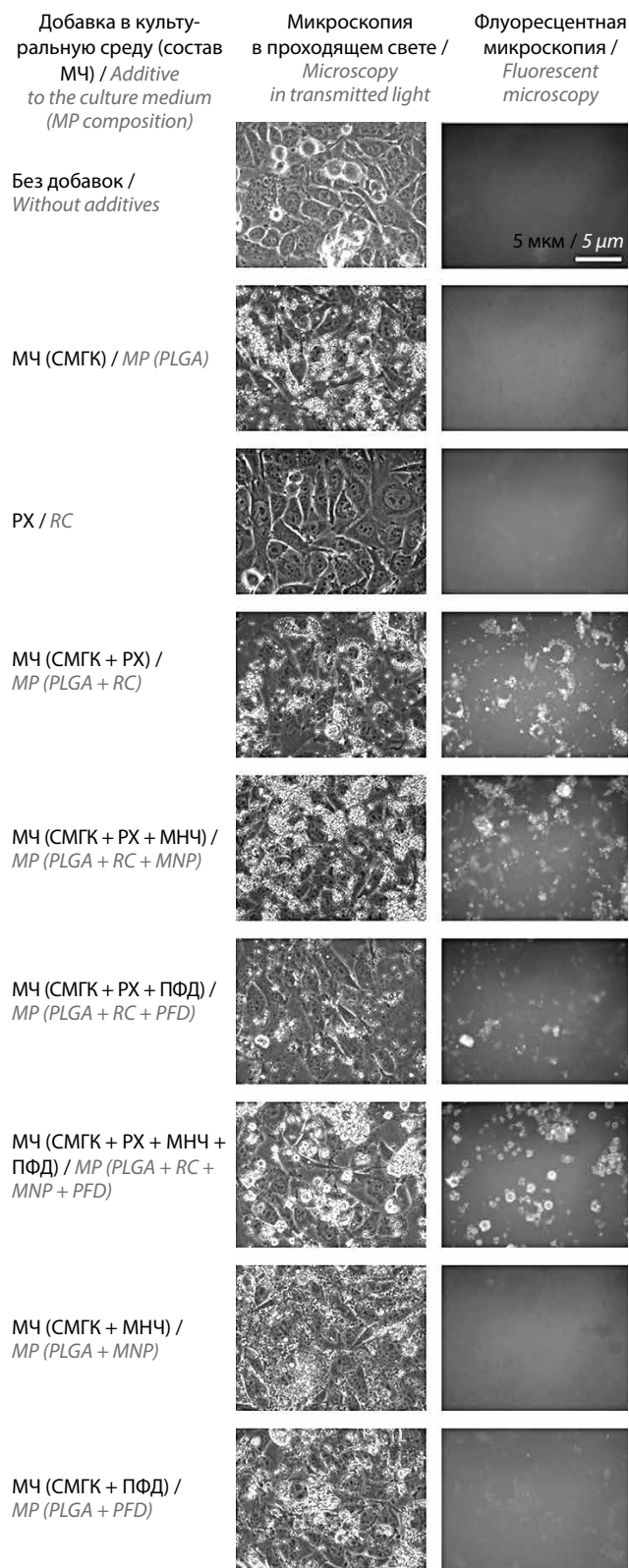
Рис. 4. Высвобождение РХ из МЧ: а – РХ (0,875 мкг/мл), МЧ (СМГК + РХ + ПФД + МНЧ), МЧ (СМГК + РХ + МНЧ); б – РХ (0,0875 мкг/мл), МЧ (СМГК + РХ), МЧ (СМГК + РХ + ПФД), \* $p < 0,05$  для отличий от пробы только с РХ

Fig. 4. RC release from MP: а – RC (0.875 µg/ml), MP (PLGA + RC + PFD + MNP), MP (PLGA + RC + MNP); б – RC (0.0875 µg/ml), MP (PLGA + RC), MP (PLGA + RC + PFD); \* $p < 0.05$  for the differences from samples with RC alone

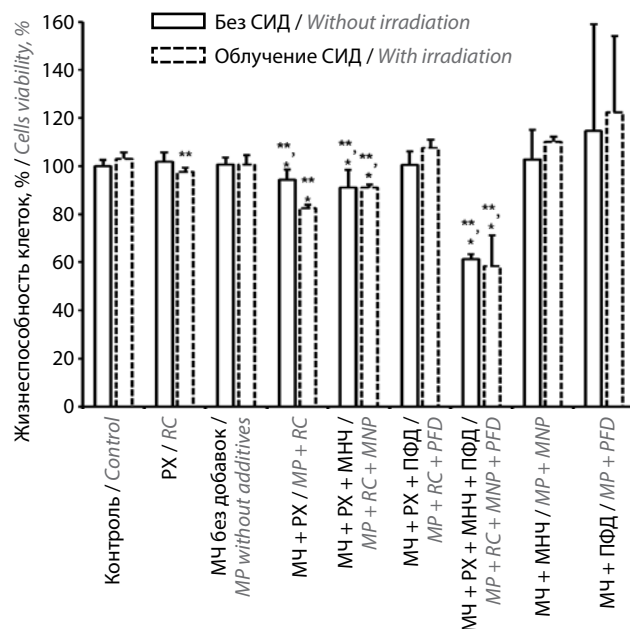
тельное угнетение жизнедеятельности клеток заметно для МЧ, содержащих в полимерной матрице РХ и МНЧ. Однако это, по-видимому, не связано с описанными особенностями поверхности таких частиц, поскольку в отсутствие РХ не наблюдается угнетающего действия на клетки МЧ, содержащих МНЧ. Кроме того, согласно полученным данным, наличие МНЧ не способствует фотодинамическому действию на клетки РХ в составе МЧ. В то же время свободный РХ и МЧ, содержащие только РХ, обладают заметным фотодинамическим повреждающим действием. Наличие ПФД в составе МЧ не сопровождается заметным





**Рис. 5.** Световая микроскопия монослая клеток СНО (клетки яичников сирийского хомячка) через 1 сут после инкубации с МЧ разного состава. Масштабная метка — общая для всех изображений

**Fig. 5.** Light and fluorescence microscopy of a monolayer of CHO cells (Syrian hamster ovary cells) 1 day after incubation with MPs of different composition. Scale mark is common to all images



**Рис. 6.** Влияние PX и содержащих PX МЧ на жизнеспособность клеток и фотодинамическое действие на эти клетки облучения светодиодами (СИД) по результатам МТТ-теста; \* $p < 0,05$  для отличий от контроля без облучения СИД и воздействия МЧ и PX; \*\* $p < 0,05$  для отличий между облученными СИД клетками по отношению к клеткам без облучения СИД после инкубации с определенным видом МЧ или PX

**Fig. 6.** Influence of RC and RC-containing MPs on cell viability and photodynamic effect of light irradiation on these cells according to the MTT test results; \* $p < 0.05$  for differences from the line cells without any additives and irradiation; \*\* $p < 0.05$  for differences between irradiated cells in relation to cells without irradiation after incubation with certain type of MP or RC

влиянием на особенности реакции поглотивших МЧ клеток и на фотодинамический эффект. Можно лишь отметить более сильное повреждающее действие МЧ, в которых одновременно присутствуют PX, МНЧ и ПФД.

### Закключение

Применение технологии Т/М/В позволяет получить содержащие PX МЧ, пригодные для использования в качестве депо, которое в течение 30 дней может поддерживать в своем микроокружении концентрации ФС, способные вызывать цитотоксический фотодинамический эффект. При введении полученных МЧ в опухоль их поглощение клетками будет способствовать повышению эффективности ФДТ за счет внутриклеточного высвобождения действующего вещества.

Поскольку МЧ имеют размер меньше 1 мкм и отрицательный заряд, то их поглощение клетками должно протекать в основном по типу фагоцитоза. При внутрисосудистом введении накопление полученных МЧ, вероятнее всего, будет происходить главным образом в печени, селезенке, легких и других



органах с высоким содержанием клеток системы мононуклеарных фагоцитов. Выход полученных МЧ из кровеносного русла в других местах будет невысоким. Однако присутствие в полимерной матрице таких МЧ МНЧ позволит накапливать полученные МЧ в интересующих местах кровеносного русла за счет воздействия на них внешнего магнитного поля. Присутствие МНЧ в полимерной матрице МЧ значительно увеличивает включение в них РХ, а также продолжительность его постепенного выхода в среду по отношению к простым МЧ с РХ, что позволяет рассматривать такие частицы в качестве фотодинамического средства пролонгированного действия.

В целом полученные результаты показывают, что на основе биodeградируемого СМГК могут быть

получены биосовместимые МЧ с включением РХ, обладающие способностью к его пролонгированному высвобождению. Воздействие на такие частицы светового излучения, применяемого при ФДТ с использованием РХ, сопровождается образованием синглетного кислорода, обладающего цитотоксическим эффектом для опухолевых клеток. Присутствие в полимерной матрице МЧ МНЧ и ПФД увеличивает процент включения РХ и интенсифицирует образование синглетного кислорода. Длительное высвобождение инкапсулированного РХ из таких частиц и их возможное накопление в проблемных областях с помощью воздействия внешних факторов позволяет увеличить терапевтическое окно при использовании ФС.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Falzone L., Salomone S., Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol* 2018;9:1300. DOI: 10.3389/fphar.2018.01300.
- Гамаюнов С.В., Шахова Н.М., Денисенко А.Н. и др. Фотодинамическая терапия — преимущества новой методики и особенности организации службы. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2014;2:101–4. [Gamayunov S.V., Shakhova N.M., Denisenko A.N. et al. Photodynamic therapy: the benefits of the new technique and service organization details. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal* 2014;2:101–4. (In Russ.)].
- Филоненко Е.В., Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике. *Biomedical Photonics* 2016;5(2):26–37. [Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice. *Biomedical Photonics* 2016;5(2):26–37 (In Russ.)].
- Ozog D.M., Rkein A.M., Fabi S.G. et al. Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatol Surg* 2016;42(7):804–27. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000800.
- Yanovsky R.L., Bartenstein D.W., Rogers G.S. et al. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2019;35(5):295–303. DOI: 10.1111/phpp.12489.
- Bergh H., Vogel A. Therapeutic Laser Applications and Laser-Tissue Interactions II. *Proceedings of the SPIE* 2005;5863:186–97.
- Vargas F., Díaz Y., Yartsev V. et al. Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media. *Ciencia* 2004;12(1):70–7.
- Douillard S., Lhommeau I., Olivier D., Patrice T. *In vitro* evaluation of Radachlorin sensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2010;98(2):128–37. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2009.11.011.
- Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2009;6(2):94–6. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2009.06.001.
- Shiryaev A.A., Musaev G.K., Levkin V.V. et al. Combined treatment of nonresectable cholangiocarcinoma complicated by obstructive jaundice. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019;26:218–23. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.006.
- Nair P.R. Delivering Combination Chemotherapies and Targeting Oncogenic Pathways via Polymeric Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)* 2019;11(4):630. DOI: 10.3390/polym11040630.
- Pan J., Rostamizadeh K., Filipczak N., Torchilin V.P. Polymeric Co-Delivery Systems in Cancer Treatment: An Overview on Component Drugs' Dosage Ratio Effect. *Molecules* 2019;24(6):1035. DOI: 10.3390/molecules24061035.
- Zhou L., Wang H., Li Y. Stimuli-Responsive Nanomedicines for Overcoming Cancer Multidrug Resistance. *Theranostics* 2018;8(4):1059–74. DOI: 10.7150/thno.22679.
- Li T., Yan L. Functional Polymer Nanocarriers for Photodynamic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)* 2018;11(4):133. DOI: 10.3390/ph11040133.
- Wang J.W., Xu J.H., Li J. et al. Improvement of the Antitumor Efficacy of Intratumoral Administration of Cucurbitacin Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres Incorporated in *In Situ*-Forming Sucrose Acetate Isobutyrate Depots. *J Pharm Sci* 2016;105(1):205–11. DOI: 10.1002/jps.24695.
- Mariana B.O., João F.M. Polymer-Based Microparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biotechnol Prog* 2011;27(4):897–912. DOI: 10.1002/btpr.618.
- Никифоров В.Н. Биомедицинские применения магнитных наночастиц. *Наука и технологии в промышленности* 2011;1:90–9. [Nikiforov V.N. Biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Nauka i tekhnologii v promyshlennosti* 2011;1:90–9. (In Russ.)].
- Wang Zh., Zhang F., Shao D. et al. Janus Nanobullets Combine Photodynamic Therapy and Magnetic Hyperthermia to Potentiate Synergetic Anti-Metastatic Immunotherapy. *Adv Sci* 2019;6(22):1901690. DOI: 10.1002/adv.201901690.
- Próspero A.G., Quini C.C., Bakuzis A.F. et al. Real-time *in vivo* monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry. *J Nanobiotechnology* 2017;15(1):22. DOI: 10.1186/s12951-017-0257-6.
- Thomasin C., Hô N.T., Merkle H.P., Gander B. Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. I. Overview and theoretical considerations. *J Pharm Sci* 1998;87(3):259–68. DOI: 10.1021/js970047r.
- Jabłczyńska K., Janczewska M., Kulikowska A., Sosnowski T.R. Preparation and characterization of biocompatible polymer particles as potential nanocarriers for inhalation therapy. *Int J Polymer Sci* 2015;22:1–8. DOI: 10.1155/2015/763020.

**Вклад авторов**

А.М. Мирошкина: получение экспериментальных данных, анализ полученных данных, написание текста рукописи;  
С.П. Кречетов: разработка дизайна исследования, получение экспериментальных данных, анализ полученных данных;  
Н.Л. Соловьева: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;  
И.И. Краснюк: разработка дизайна исследования.

**Authors contributions**

A.M. Miroshkina: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;  
S.P. Krechetov: research design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;  
N.L. Solovieva: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;  
I.I. Krasnyuk: research design development.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

А.М. Мирошкина / A.M. Miroshkina: <https://orcid.org/0000-0001-7028-0966>  
С.П. Кречетов / S.P. Krechetov: <https://orcid.org/0000-0003-2861-6010>  
Н.Л. Соловьева / N.L. Solovieva: <https://orcid.org/0000-0002-0781-7553>  
И.И. Краснюк / I.I. Krasnyuk: <https://orcid.org/0000-0003-4382-7377>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (договор № 02.G25.31.0001) в рамках реализации Постановления Правительства Российской Федерации от 09.04.2010 № 218.

**Financing.** The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (contract No 02.G25.31.0001) as part of the implementation of the Decree of the Government of the Russian Federation No 218 of 09.04.2010.

Статья поступила: 26.03.2021. Принята к публикации: 20.08.2021.

Article submitted: 26.03.2021. Accepted for publication: 20.08.2021.