

# ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ И СЕЛЕКТИВНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ТЕТРА-3-ФЕНИЛТИОФТАЛОЦИАНИНА ГИДРОКСИАЛЮМИНИЯ НА ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЯХ МЫШЕЙ ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ПЕРЕВИВКИ

Г.А. Меерович<sup>1,2</sup>, Л.М. Борисова<sup>3</sup>, А.П. Будько<sup>3</sup>, М.П. Киселева<sup>2</sup>, Л.Л. Николаева<sup>2,5</sup>,  
И.Г. Меерович<sup>4</sup>, А.В. Ланцова<sup>3</sup>, С.В. Чернова<sup>5</sup>, Н.А. Оборотова<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт общей физики им. А.М. Прохорова» РАН; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское ш., 31;

<sup>3</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

<sup>4</sup>ФИЦ биотехнологии РАН; Россия, 119071 Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2;

<sup>5</sup>ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)» Минздрава России;  
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Геннадий Александрович Меерович [meerovich@mail.ru](mailto:meerovich@mail.ru)

**Введение.** Настоящая работа посвящена исследованию уровня и селективности накопления в опухоли инфракрасного фотосенсибилизатора (ФС) тетра-3-фенилтиофталлоцианина гидроксиалюминия в липосомальной лекарственной форме по отношению к нормальным тканям.

**Цель исследования** — изучение уровня и селективности накопления ФС на опухолевых моделях мышей при внутримышечной и подкожной перевивке с целью выбора оптимального способа перевивки и сроков начала проведения фотодинамической терапии.

**Материалы и методы.** В работе использовали перевиваемые опухоли мышей: солидные варианты карциномы Эрлиха (ELD) и саркомы S-37, эпидермоидную карциному легкого Льюис (Lewis lung carcinoma, LLC) и аденокарциному толстой кишки (АКАТОЛ). Исследование провели на половозрелых иммунокомпетентных мышцах-гибридах (CBA × C57Bl/6)F1, (C57Bl/6 × DBA/2)F1 и мышцах линий C57Bl/6 и BALB/c. Для оценки уровня липосомальной лекарственной формы ФС в тканях применяли спектрально-флуоресцентный метод.

**Результаты.** Карциному Эрлиха (ELD) для обеспечения высокого накопления ФС целесообразно перевивать внутримышечно. Через 5 ч после введения концентрация ФС в опухоли составляет более 7 мг/кг, индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, равен 3. На саркоме S-37 при подкожной перевивке высокая концентрация ФС в ткани опухоли наблюдается через 5 ч после введения и составляет 5,4 мг/кг, индекс селективности накопления достигает 4,3. LLC целесообразно перевивать внутримышечно. Через 5 ч после введения концентрация ФС в опухоли составляет более 7,5 мг/кг, индекс селективности накопления превышает 4. На АКАТОЛ при внутримышечной перевивке через 7 ч после введения концентрация ФС в опухоли составляет 6,8 мг/кг, индекс селективности накопления — около 2.

**Выводы.** Липосомальная лекарственная форма ФС при внутривенном введении селективно накапливается в ткани опухоли. Полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать способ перевивки представленных опухолевых моделей мышей при исследованиях ФС.

**Ключевые слова:** фотосенсибилизатор, опухоль, накопление, селективность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-74-79

## STUDY OF LEVEL AND SELECTIVITY OF LIPOSOMAL FORM OF PHOTSENSITISER HYDROXYALUMINIUM TETRA-3-PHENYLTHIOPHTHALOCYANINE ACCUMULATION ON TRANSPLANTABLE MICE TUMOR MODELS AT DIFFERENT WAYS OF TRANSPLANTATION

G.A. Meerovich<sup>1,2</sup>, L.M. Borisova<sup>3</sup>, A.P. Bud'ko<sup>3</sup>, M.P. Kiseleva<sup>2</sup>, L.L. Nikolaeva<sup>2,5</sup>,  
I.G. Meerovich<sup>4</sup>, A.V. Lantsova<sup>3</sup>, S.V. Chernova<sup>5</sup>, N.A. Oborotova<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>Prokhorov General Physics Institute, RAS; 38 Vavilova St., Moscow 119991, Russia;

<sup>2</sup>National Research Nuclear University "MEPhI", 31 Kashirskoe Sh., Moscow 15409, Russia;

<sup>3</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

<sup>4</sup>Research Center of Biotechnology RAS; 33 Bldg. 2 Leninskiy Ave, Moscow 119071, Russia;

<sup>5</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia;  
8 Bldg. 2 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

**Background.** Current work is devoted to the study in vivo of concentration and selectivity of accumulation of infrared photosensitizer (PS) hydroxyaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine in liposomal form in intramuscularly and subcutaneously transplanted mice tumor models in comparison to normal tissues.

**Objective:** to study the level and selectivity of accumulation of hydroxyaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine liposomal form on mice tumor models in order to optimize the transplantation approach and the starting of photodynamic treatment.

**Materials and methods.** A range of transplantable mice tumors was used in the study: solid carcinoma Ehrlich (ELD) and solid sarcoma S-37, epidermoid Lewis lung carcinoma (LLC) and colon adenocarcinoma (AKATOL). For the assessment of concentration of PS in tissues was evaluated by fluorescence spectroscopy in vivo.

**Results.** The optimum transplantation approaches were shown to be as follows. Solid carcinoma Ehrlich (ELD) provided the highest accumulation of PS when transplanted intramuscularly. Five hours after administration concentration of PS in tumor achieves more than 7 mg/kg, with selectivity in comparison to normal tissue 3 : 1. The maximum concentration of PS in sarcoma S-37 was observed with subcutaneous transplantation, achieving at 5 h after administration the value of 5.4 mg/kg with selectivity of accumulation 4.3 : 1. Both LLC and AKATOL showed optimum results with intramuscular transplantation. Maximum concentration of PS in LLC was observed 5 h after administration, achieving 7.5 mg/kg with selectivity exceeding 4. Concentration of photosensitizer in AKATOL 7 h post administration achieved 6.8 mg/kg with selectivity about 2.

**Conclusions.** Liposomal form of PS with intravenous administration selectively accumulates in tumors. The obtained experimental data allows to recommend the method of listed tumors models transplantation for the studies of PS.

**Key words:** photosensitizer, tumor, accumulation, selectivity

## Введение

Липосомальные лекарственные формы (ЛЛФ) фотосенсибилизаторов (ФС) позволяют использовать новые эффективные гидрофобные и гидрофильные субстанции, повысить селективность накопления ФС в опухоли и эффективность фотодинамической терапии (ФДТ), уменьшить побочные эффекты (фототоксичность) за счет понижения терапевтической дозы [1].

Объектом настоящей работы является ЛЛФ ФС на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия со спектральным максимумом поглощения при длине волны 717 нм [2].

Избирательность противоопухолевого действия при ФДТ обусловлена селективностью накопления ФС в опухоли по сравнению с окружающими тканями и направленным лазерным облучением патологической зоны. ФДТ характеризуется многофакторным влиянием на компартменты опухоли. Фотодинамическое воздействие на опухоль является комплексным вследствие интеграции множественных противоопухолевых ответов. В ряде исследований [3–5] показано, что фотодинамическое воздействие может оказывать как прямое (непосредственное) воздействие на клетки опухоли, вызывая их некроз и апоптоз, так и опосредованное, приводя к нарушению кровотока в сосудах и капиллярах опухоли и вызывая их тромбоз или приводя к геморрагиям. Доминирование того или иного механизма действия связано со свойствами ФС и в значительной мере зависит от режима облучения и временного интервала между внутривенным (в/в) введением ФС и началом облучения. Продолжительность временного интервала между введением ФС и облучением при ФДТ влияет на целый ряд процессов накопления ФС в патологическом очаге, влияние

которых разнонаправленно связано с эффективностью ФДТ. Значительная часть ФС при увеличении этого интервала захватывается органами, богатыми клетками системы мононуклеарных фагоцитов, и/или выводится из организма. С другой стороны, посредством экстравазации через дефектные сосуды происходит накопление в опухоли загруженного в липосомы ФС, длительно циркулирующего в крови. Таким образом, продолжительность временного интервала между введением ФС и началом проведения облучения влияет на проникновение липосом с ФС в клетки опухоли за счет эндоцитоза и, соответственно, на эффективность ФДТ. Это делает актуальным научно обоснованный выбор оптимального интервала времени между введением ФС и началом облучения, при котором терапевтическая эффективность ФДТ будет максимальной.

**Цель настоящего исследования** — изучение на перевиваемых опухолях мышей динамики и селективности накопления ЛЛФ ФС в опухоли по отношению к нормальным тканям для оптимального выбора способа перевивки и сроков начала проведения ФДТ.

## Материалы и методы

Лиофилизат ЛЛФ ФС, содержащий 1,5 мг тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия во флаконе, редиспергировали водой для инъекций в объеме 5,8 мл на флакон, при этом концентрация ФС в дисперсии составила 0,25 мг/мл. После регидратации лиофилизата образовалась дисперсия липосом с размером частиц около 180 нм [6, 7], которую вводили мышам однократно струйно в хвостовую вену в дозе 6 мг/кг массы тела мышей на 6-е сутки после перевивки опухолей.

Исследование проводили на половозрелых иммунокомпетентных мышах-гибридах (CBA × C57Bl/6)F1, (C57Bl/6 × DBA/2)F1 и мышах линий C57Bl/6 и BALB/c с массой тела 20–22 г из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных содержали на брикетированном корме, с постоянным доступом к воде. Все эксперименты осуществляли согласно этическим аспектам проведения исследований на биомоделях и лабораторных животных, принятым в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [8].

Для исследования использовали перевиваемые опухоли мышей: солидные варианты карциномы Эрлиха (ELD) и саркомы S-37, эпидермоидную карциному легкого Льюис (Lewis lung carcinoma, LLC) и аденокарциному толстой кишки (АКАТОЛ).

В связи с тем, что выбранные экспериментальные опухолевые модели в соответствии с их морфологическим происхождением различаются по специфике роста и степени васкуляризации, для каждой модели использовали 2 способа перевивки: подкожно (п/к) и внутримышечно (в/м).

Карциному Эрлиха (ELD) и саркому S-37 перевивали мышам в правую голень в/м по 0,1 мл и п/к по 0,05 мл асцитной жидкости, содержащей  $10^6$  опухолевых клеток при разведении в среде 199. Исследование и поддержание штамма проводили на самках мышей-гибридов (CBA × C57Bl/6)F1 и (C57Bl/6 × DBA/2)F1 соответственно. Штаммы поддерживали внутрибрюшинной перевивкой асцитной жидкости по 0,3 мл в разведении 1 : 10 средой 199.

LLC для исследования перевивали самцам мышей-гибридов (C57Bl/6 × DBA/2)F1. Штамм поддерживали в/м перевивкой опухолевого материала в бедро на мышах-самках линии C57Bl/6.

АКАТОЛ перевивали в область голени самкам мышей линии BALB/c. Штамм поддерживали путем п/к перевивки опухолевого материала в бок мышам-самкам этой же линии.

Для перевивки LLC и АКАТОЛ опухолевую ткань измельчали ножницами до однородной консистенции, добавляли среду 199 до необходимого соотношения и перевивали мышам по 0,05 и 0,1 мл полученной суспензии, что составляет 15 мг опухолевой массы, п/к и в/м соответственно [9].

Исследования по накоплению ФС в опухолях для каждой модели проводили одновременно на 2 отдельных группах с перевивкой п/к и в/м. Результаты усредняли и анализировали по группам. Исследование динамики накопления и селективности ФС при 2 способах перевивки позволит сравнить их и выбрать оптимальный для дальнейших исследований.

В опытах использовали 3-ю генерацию каждой из опухолей. В опытные группы включали по 5 животных.

Оценку уровня и селективности накопления ФС в опухоли по сравнению с нормальной тканью осуществляли спектрально-флуоресцентным методом с использованием спектроанализатора ЛЭСА-01-Биоспек («Биоспек», Россия). Перед исследованием у всех животных был удален шерстный покров с кожи над опухолью и, соответственно, с контралатерального опухоли участка нормальной ткани. Флуоресценцию тканей вызывали с помощью лазерного излучения с длиной волны 632,8 нм и регистрировали в спектральном диапазоне волн 700–760 нм. С целью достижения достоверных результатов при регистрации флуоресценции проводили по 3–6 точечных измерений на опухоли и нормальной ткани. Полученную спектральную информацию обрабатывали с использованием программного обеспечения UnoMomento («Биоспек», Россия) и вычисляли индекс флуоресценции – величину, полученную при делении (нормировке) интегральной интенсивности флуоресцентной полосы (спектральный диапазон интегрирования 700–760 нм) на мощность возбуждающего флуоресценцию лазерного излучения.

Для количественной оценки концентрации ФС в тканях проводили калибровку спектроанализатора с использованием моделирующих фантомов – водных дисперсий с разными концентрациями ЛЛФ ФС, содержащих 1,5 % масс Липофундина МСТ/ЛСТ (Lipofundin MCT/LCT). Оптические свойства таких дисперсий достаточно близки к оптическим свойствам биоткани, что позволяет повысить точность калибровки [10].

Селективность накопления ФС оценивали по соотношению между концентрацией ФС в опухоли и в нормальной ткани [11].

### Результаты и обсуждение

Анализ зависимости индекса флуоресценции ЛЛФ ФС от концентрации ФС показывает, что эта зависимость линейна до значения 0,01 мг/мл. Полученные данные позволяют для фиксированных условий исследования (геометрии опыта и настройки аппаратуры) оценить среднюю концентрацию ФС в биотканях по индексу флуоресценции (приняв плотность биоткани равной плотности воды 1 кг/л) и рассчитать его по формуле

$$C = 0,7 \times I_{\text{пр}},$$

где  $C$  – средняя концентрация ФС в биотканях (мг/кг),  $I_{\text{пр}}$  – индекс флуоресценции ФС.

### Карцинома Эрлиха (ELD)

ЛЛФ ФС селективно накапливается в опухоли как при в/м, так и при п/к перевивке. Через 5 ч после введения обеспечивается высокое накопление ФС: среднее значение концентрации ФС во в/м перевитых опухолях превышает 7 мг/кг, что в 1,6 раза выше

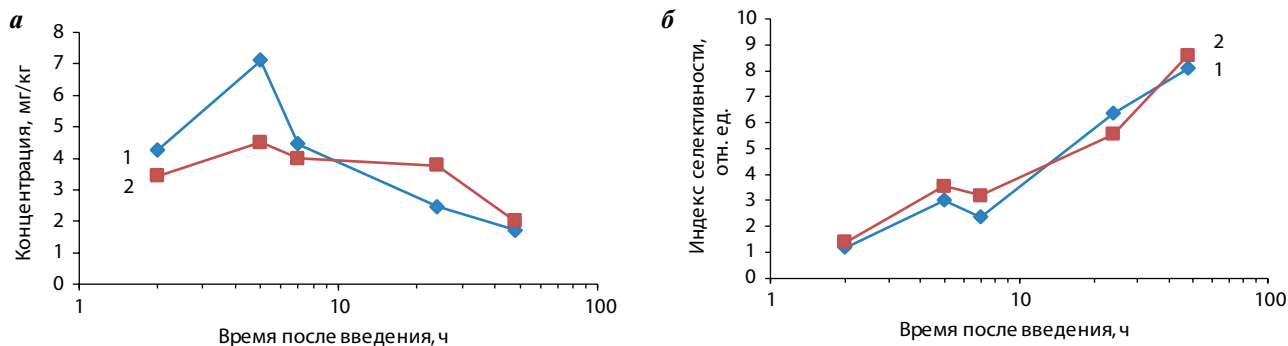


Рис. 1. Концентрация (а) и индекс селективности накопления (б) ЛЛФ ФС в карциноме Эрлиха (ELD) при в/м (1) и п/к (2) перевивке

среднего значения концентрации в п/к перевитых опухолях (рис. 1). Индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, близок к 3 как при в/м, так и при п/к перевивке. Таким образом, для исследований ФДТ целесообразно использовать в/м перевитую солидную карциному Эрлиха (ELD), начиная облучение через 5 ч после в/в введения ЛЛФ ФС. Результаты исследования показывают, что концентрация ФС в опухоли при в/м перевивке быстро снижается, через 10 ч после введения уменьшаясь в 2 раза по сравнению с максимальным значением. В п/к перевитых опухолях концентрация ФС снижается медленнее: через 24 ч только на 15 %. Поскольку концентрация ФС в нормальной ткани уменьшается быстрее, значение индекса селективности к этому моменту превышает 6.

#### Саркома S-37

ЛЛФ ФС селективно накапливается в опухоли как при в/м, так и при п/к перевивке. При п/к перевивке через 5 ч после введения ФС среднее значение его концентрации в п/к перевитых опухолях достигает 5,3 мг/кг, в 1,8 раза превышая среднее значение концентрации, достигаемое во в/м перевитых опухолях через 7 ч после введения (рис. 2). Индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, при п/к перевивке составляет 4,4, при в/м перевивке — не более 2. Таким образом, для исследований ФДТ целесообразно использовать

п/к перевитую саркому S-37, начиная облучение через 5 ч после в/в введения ЛЛФ ФС.

#### Эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC)

ЛЛФ ФС селективно накапливается в опухоли как при в/м, так и при п/к перевивке. При в/м перевивке через 7 ч после введения средняя концентрация ФС во в/м перевитых опухолях составляет 5,3 мг/кг, что в 1,5 раза больше максимального значения средней концентрации, достигаемого в п/к перевитых опухолях (рис. 3). Индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, близок к 4 как при в/м, так и при п/к перевивке. Результаты исследования также показывают, что концентрация ФС в опухоли при в/м перевивке уменьшается в 3–4 раза по сравнению с максимальным значением уже через 24 ч после введения ЛЛФ ФС.

#### Аденокарцинома толстой кишки (АКАТОЛ)

ЛЛФ ФС селективно накапливается в опухоли как при в/м, так и при п/к перевивке. Через 7 ч после введения ФС средняя концентрация ФС во в/м перевитых опухолях составляет 6,8 мг/кг, при п/к перевивке значение концентрации ФС в опухоли в 1,5 раза меньше (рис. 4). Индекс селективности накопления в опухоли по отношению к нормальной ткани в обоих случаях близок к 2. Через 24 ч после введения концентрация ФС во в/м перевитой опухоли составляет 5 мг/кг, в п/к перевитой — около 6 мг/кг, значения индекса селективности накопления — 5,2

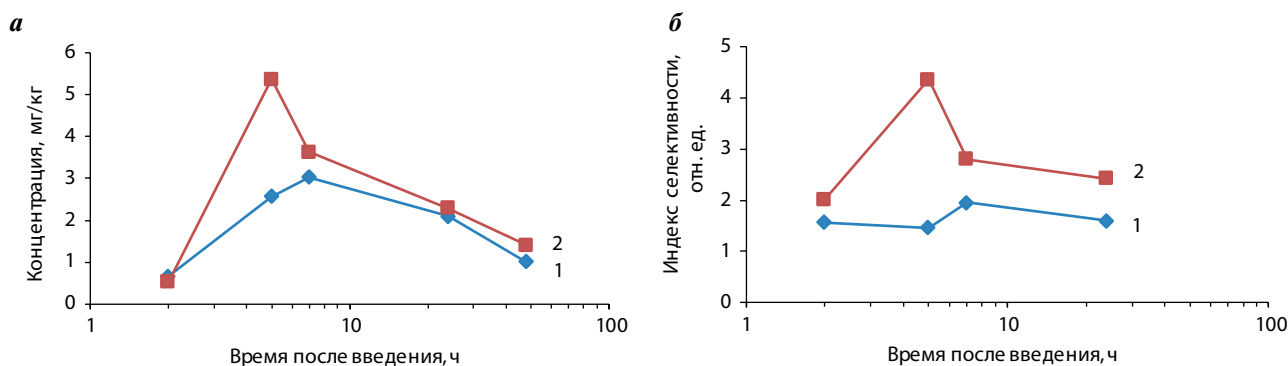


Рис. 2. Концентрация (а) и индекс селективности накопления (б) ЛЛФ ФС в саркоме S-37 при в/м (1) и п/к (2) перевивке

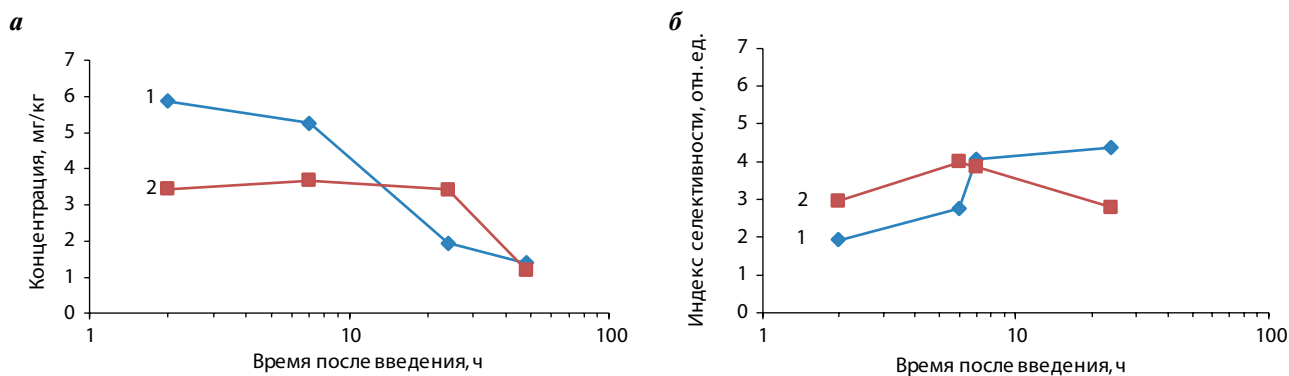


Рис. 3. Концентрация (а) и индекс селективности накопления (а) ЛЛФ ФС в LLC при в/м (1) и п/к (2) перевивке

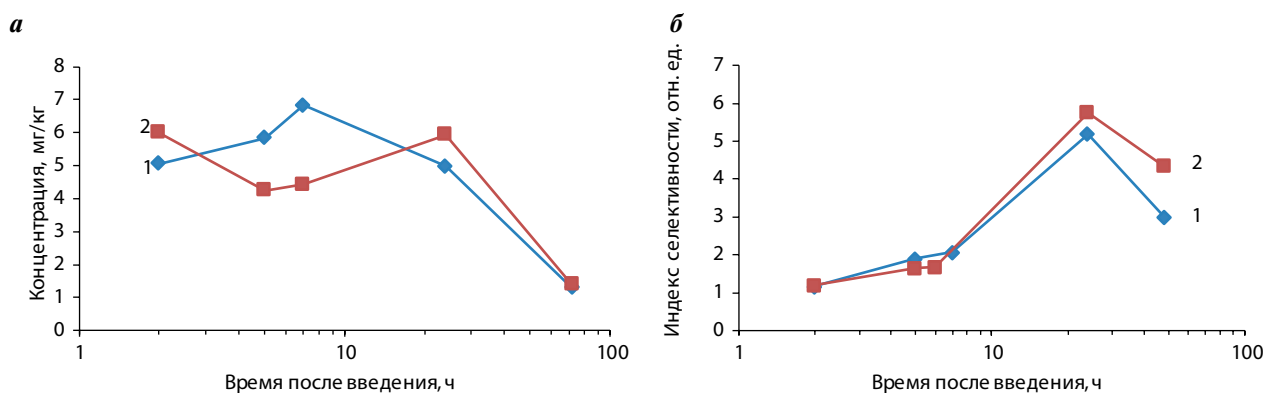


Рис. 4. Концентрация (а) и индекс селективности накопления (б) ЛЛФ ФС в АКАТОЛ при в/м (1) и п/к (2) перевивке

и 5,8 соответственно. Через 72 ч после введения концентрация ФС уменьшается более чем в 4 раза.

### Выводы

Спектрально-флуоресцентные исследования на опухолевых моделях мышей показывают, что изучаемый ФС в ЛЛФ при в/в введении селективно накапливается в опухоли.

Сравнение результатов исследований по группам показывает, что:

- солидную карциному Эрлиха (ELD) для обеспечения высокого накопления ФС целесообразно перевивать в/м — в этом случае через 5 ч после введения концентрация ЛЛФ ФС в опухоли составляет  $>7$  мг/кг, в 1,6 раза превышая соответствующее значение при п/к перевивке, а индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, равен 3;
- в саркоме S-37 наиболее высокая концентрация ЛЛФ ФС при п/к перевивке достигается через 5 ч после введения и составляет 5,3 мг/кг, более чем в 1,7 раза превышая соответствующее значение при в/м перевивке, а индекс

селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, достигает 4,3;

- LLC целесообразно перевивать в/м. При этом обеспечивается высокое накопление ЛЛФ ФС: через 7 ч после введения средняя концентрация ФС во в/м перевитых опухолях составляет 5,3 мг/кг, в 1,5 раза превышая соответствующее значение при п/к перевивке, а индекс селективности близок к 4;
- в АКАТОЛ при в/м перевивке средняя концентрация ЛЛФ ФС в опухоли через 7 ч после введения составляет 6,8 мг/кг, при п/к перевивке — в 1,5 раза меньше. Индекс селективности накопления в обоих случаях близок к 2. Через 24 ч после введения концентрация ФС во в/м перевитой опухоли составляет около 5 мг/кг, в п/к перевитой — около 6 мг/кг, при этом индекс селективности накопления равен 5,2 и 5,8 соответственно.

Полученные результаты позволяют выбрать оптимальный способ перевивки опухоли для экспериментальных исследований ФС на опухолевых моделях мышей и определить сроки начала проведения ФДТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 14.N08.12.0074).



## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Оборотова Н.А. Липосомальные системы доставки лекарственных веществ: свойства и технологические особенности получения. *Биофармацевтический журнал* 2014;6(4):3–13.
2. Барышников А.Ю., Борисова Л.М., Ворожцов Г.Н. и др. Фотосенсибилизатор, липосомальная форма фотосенсибилизатора и способ проведения фотодинамической терапии. Патент РФ № 2257898 от 10.08.2005.
3. Kogan E.A., Meerovich G.A., Torshina N.L. et al. Systemic estimation of the effect of photodynamic therapy of cancer. *Proc SPIE* 1997;3191. DOI: 10.1117/12.297803.
4. Meerovich G.A., Stratonnikov A.A., Loschenov V.B. et al. Different pathways of tumor damage due to PDT: the influence of parameters of laser irradiation. *Proc SPIE* 2001;4156. DOI: 10.1117/12.413726.
5. Meerovich G.A., Stratonnikov A.A., Loschenov V.B. et al. Influence of parameters of laser irradiation on the mechanisms of tumor damage due to PDT. *Proc SPIE* 2001;4248. DOI: 10.1117/12.424441.
6. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Полозкова А.П. и др. Эффективность липосомальной системы доставки гидрофобного противоопухолевого фотосенсибилизатора Тиосенса. *Российские нанотехнологии* 2015;10(5–6): 136–43. DOI: 10.1134/S1995078015030143.
7. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A. et al. Thiosens liposomal dosage form technology development and photodynamic efficiency assessment. *J Drug Deliv Sci Tech* 2014;24(4):315–9. DOI: 10.1016/S1773-2247(14)50068-8.
8. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и лабораторных животных. *Качественная клиническая практика* 2002;1:58–61.
9. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Голдина, А. Кляйна. М.: Медицина, 1980. С. 71–112.
10. Savel'eva T.A., Ryabova A.V., Andreeva I.V. et al. Combined spectroscopic method for determining the fluorophore concentration in highly scattering media. *Bulletin of the Lebedev Physics Institute* 2011;38(11):334–8. DOI: 10.3103/S1068335611110042.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и Ко, 2012. 664 с.