

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ
І РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО**

ШТОНЬ ІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК: 616–006.04:620.3:615.277.3

**ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА
ЗА ФОТОДИНАМІЧНОЇ ПРОТИПУХЛИННОЇ ТЕРАПІЇ
(експериментальне дослідження)**

14.01.07 – онкологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Науковий керівник - доктор біологічних наук, професор
Гамалея Микола Федорович,
завідувач відділу біологічних ефектів іонізуючого та неіонізуючого випромінювання
Інституту експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук, професор
Орел Валерій Еммануїлович,
завідувач науково-дослідної лабораторії
медичної фізики та біоінженерії
Національного інституту раку МОЗ України;

- доктор медичних наук
Баглій Євген Ананійович,
завідувач лабораторії канцерогенезу, тератогенезу та
токсикології репродуктивної функції ДП "Науковий
центр превентивної токсикології, харчової та
хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя
Міністерства охорони здоров'я України".

Захист відбудеться 6 липня 2016 р. о 13 год 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий «__» червня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Л. М. Шлапацька

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Фотодинамічна терапія (ФДТ) — сучасний метод лікування хворих на злоякісні новоутворення, що швидко розвивається і успішно застосовується у багатьох країнах світу (Agostinis P. et al., 2011; Parita K. et al., 2016). Цей метод ґрунтується на введенні в організм із пухлиною нетоксичного фарбника – фотосенсибілізатора (ФС), який досить швидко виводиться із нормальних тканин, але вибірково затримується у пухлинній тканині. При наступному опроміненні пухлини лазерним світлом відповідної довжини хвилі у присутності молекулярного кисню утворюються його активні форми (синглетний кисень та вільні радикали), які пошкоджують пухлинні клітини (Huang Z., 2005).

Головними перевагами ФДТ перед класичними методами лікування (хіміо- і променевою терапією) є мала травматичність, можливість багаторазового застосування без значної шкоди для організму і ефективність по відношенню до пухлин різного гістогенезу (Allison R.R., 2014). Тим не менш, ФДТ має певні недоліки, головним з яких є її поверхнева дія, оскільки світло видимого діапазону спектра, що активує ФС, проникає у біологічні тканини на глибину до 1 см. Крім того, недостатня вибірковість накопичення ФС у пухлині може призводити до ризику фототоксичного ураження шкіри. Подолання цих недоліків може бути досягнуто з урахуванням напрацювань в галузі нанотехнологій. Одним із головних результатів масштабних досліджень у цьому напрямку стало з'ясування базових властивостей наноструктур і визначення доцільності їх використання. Безумовно, перспективним на сьогодні є застосування наноматеріалів у медицині для створення нових протипухлинних засобів. Особливе місце серед них займають препарати, до складу яких входять наночастинки (НЧ) золота (Hamblin M.R. et al., 2015). Надзвичайно важливими характеристиками для їх медичного застосування є біосумісність та відносна нетоксичність (Хлебцов Н.Г., Дыкман Л.А. и др., 2010). При використанні НЧ в якості носія ліків, їх комплексування з біологічно-активними молекулами обумовлено наявністю у структурі останніх тіольних та аміногруп, здатних забезпечити приєднання до поверхні НЧ золота. Дана особливість дозволяє НЧ золота бути поєднаними із різноманітними речовинами, включаючи фотосенсибілізатори (Alexis F. et al., 2010; Calixto G.M. et al., 2016; Chatterjee D.K. et al., 2008; Nair L.V. et al., 2015). Зв'язування протипухлинних препаратів із наноносієм знижує ймовірність швидкого руйнування препаратів на шляху до пухлини, а також зменшує їх токсичність по відношенню до нормальних тканин. Здатність НЧ золота проникати крізь фенестрований ендотелій пухлинних судин забезпечує більшу вибірковість накопичення препарату в пухлині (Cheng Y. et al., 2010).

На даний час активно розробляються нові препарати для ФДТ, сконструйовані шляхом комплексування ФС з НЧ золота різної форми та розмірів, з метою їх подальшого застосування у клінічній практиці (Demberelnyamba D. et al., 2008; Lucky S.S. et al., 2015; Meyers J.D. et al., 2015; Deng X. et al., 2016). Представлена робота спрямована на вивчення фотодинамічної дії ФС хлорину еб у складі композиту з НЧ золота різних типів та розмірів, що створює підґрунтя для отримання ефективних наноконкомпозитних препаратів для ФДТ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу було виконано у рамках планових науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України за темами: 2.2.5.333 “Розробка та апробація нанотехнологічних підходів до підвищення ефективності фотодинамічної терапії пухлин” (2010–2012рр., № державної реєстрації 0109U007153), 2.2.5.371 “Протипухлинна фотодинамічна активність композитних фотосенсибілізаторів на основі плазмонно-резонансних наночастинок” (2013–2015 рр., № державної реєстрації 0112U004714) та в рамках комплексного проекту “Взаємодія наноструктурних матеріалів з нормальними та пухлинними клітинами, розробка методів доставки, безпека їх використання” цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України “Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнології” (2010–2014 рр., № державної реєстрації 0110U005553).

Мета дослідження. Підвищити ефективність фотодинамічної терапії пухлин шляхом модифікації фотосенсибілізатора хлорину еб наночастинками золота.

Задачі дослідження.

1. Проаналізувати фізико-хімічні особливості золотовмісних нанокompозитних фотосенсибілізаторів та їх компонентів, визначити активність генерації ними синглетного кисню.
2. Порівняти темнову цитотоксичність наночастинок золота та їх взаємодію з нормальними та злоякісно трансформованими лімфоцитами людини в умовах *in vitro*.
3. Оцінити фотоцитотоксичність отриманих нанокompозитних фотосенсибілізаторів на лініях клітин Namalwa, MT-4, Jurkat та мононуклеарах периферичної крові донорів.
4. Визначити протипухлинну фотодинамічну активність нанокompозитних фотосенсибілізаторів у тварин із перещепленою карциномою легень Льюїс.
5. Вивчити комбіновану фотодинамічну та фототермічну дію нанокompозиту нанострижнів золота із хлорином еб на лініях клітин Namalwa та MT-4.
6. Дослідити модифікуючий вплив сироваткового альбуміну на фотодинамічну активність нанокompозитів на лініях клітин Namalwa та MT-4.
7. Порівняти ефективність традиційного та скануючого режимів фотодинамічної терапії мишей із карциномою легень Льюїс.

Об'єкт дослідження: композити фотосенсибілізатора хлорину еб з наночастинками золота та їх модифіковані варіанти; лінії клітин злоякісно трансформованих лімфоцитів людини Namalwa, MT-4 та Jurkat; карцинома яєчників людини A2780; мононуклеари периферичної крові донорів; карцинома легень Льюїс.

Предмет дослідження: протипухлинна ефективність фотодинамічної терапії з використанням в якості фотосенсибілізуючого агента композитів хлорину еб з наночастинками золота.

Методи дослідження: спектрофото- та спектрофлуориметричні; біохімічні; культури клітин; світлова, темнопольна, електронна мікроскопія; методи експериментальної онкології; методи фотодинамічної та фототермічної протипухлинної терапії з використанням лазерного обладнання; статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі дістали подальшого розвитку питання підвищення ефективності ФДТ шляхом застосування композитних фотосенсибілізаторів, створених на основі хлорину еб та НЧ золота.

Досліджено фізико-хімічні та біологічні властивості оригінальних композитів хлорину еб та НЧ золота сферичної, сфероподібної, стрижневидної та призмоподібної форм. Встановлено, що для створення композитів доцільно використовувати наносфери з діаметром 15 нм, нанострижні розміром 41x10 нм, нанопризми, наноболонки золота, сфероподібні НЧ золота, а також НЧ альбуміну, які не проявляють темної цитотоксичності у терапевтичних концентраціях. Застосування НЧ золота з діаметром 5 нм та нанострижнів золота, стабілізованих бромідом цетилтриметиламонію, в якості носіїв лікарських препаратів ускладнено через їх токсичність.

В системі *in vitro* проведено скринінг наночастинок золота різних розмірно-геометричних параметрів на здатність підвищувати фотодинамічну протипухлинну активність фотосенсибілізатора хлорину еб. Найвища ефективність фотодинамічного впливу виявлена при застосуванні композиту хлорину еб з наносферами (15 нм), стабілізованими полівінілпіролідом.

Отримано пріоритетні дані щодо високої протипухлинної фотодинамічної активності нового композитного фотосенсибілізатора на основі наночастинок золота, стабілізованих декстран-поліакриламідним співполімером.

Вперше в дослідженнях *in vitro* встановлено адитивний ефект при комбінованому фотодинамічному (опромінення лазером з $\lambda=658$ нм) та фототермічному (опромінення лазером з $\lambda=810$ нм) впливі на клітини з використанням нетоксичних плазмонно-резонансних нанострижнів золота.

Вперше встановлена протипухлинна фотодинамічна активність композитних фотосенсибілізаторів на основі наночастинок золота та перехресно зв'язаних наночастинок альбуміну, яка зростає при збільшенні відсоткового складу зшитих амінокислот у НЧ альбуміну.

Уточнено наукові дані про протипухлинну та антиметастатичну дію ФДТ із застосуванням хлорину еб та доведена підвищена здатність нанокompозитів хлорину еб з наносферами (15нм), стабілізованими полівінілпіролідом, нанопризмами та сфероподібними НЧ золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером, у порівнянні з вихідним ФС, гальмувати ріст експериментальних пухлин.

Практичне значення роботи. В системах *in vitro* та *in vivo* доведено переваги застосування нанокompозитів хлорину еб з наночастинками золота різних форм та розмірів порівняно із вільним фотосенсибілізатором при фотодинамічному опроміненні. Це підтверджується достовірним зростанням: фотоцитотоксичного впливу *in vitro*; протипухлинної дії та, за умов застосування сфероподібних НЧ золота, тенденції до збільшення антиметастатичного ефекту *in vivo*.

У дослідженнях *in vitro* встановлено можливість підвищення протипухлинної ефективності нанокompозитного ФС на основі плазмонно-резонансних нанострижнів золота шляхом комбінації фотодинамічного та фототермічного впливу на клітини.

Модифіковано і апробовано в експериментальній системі *in vivo* метод ФДТ шляхом застосування скануючого режиму лазерного опромінення пухлин, який

забезпечує флуоресцентне визначення наявності ФС у пухлинній тканині з наступним опроміненням тільки тих її зон, які накопичили ФС. За цих умов протипухлинна ефективність скануючого та безперервного режимів опромінення є однаковою, проте при безперервному режимі середня доза опромінення у десятки разів є більшою, ніж при скануючому.

Отримані результати досліджень можуть слугувати підґрунтям для розробки нових, більш ефективних варіантів ФДТ з урахуванням унікальних транспортних та оптичних властивостей НЧ золота, які входять до складу запропонованих композитних фотосенсибілізаторів.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є закінченим самостійно виконаним дослідженням автора. Дисертантом здійснено пошук та аналіз літературних джерел за темою дисертації, написано огляд літератури. Автором самостійно в системі *in vitro* вивчено фізико-хімічні властивості, темнову цитотоксичність та фотодинамічну активність наночастинок та їх композитів із хлорином еб, проведено дослідження взаємодії наночастинок золота з нормальними та злоякісно трансформованими клітинами. У системі *in vivo* здобувачем самостійно визначено фотодинамічну активність нанокompозитів. Автором самостійно проведено статистичну обробку та узагальнення результатів досліджень, сформульовано висновки по дисертаційній роботі. Формулювання мети та задач, розробка методології експериментальних досліджень, обговорення та інтерпретація результатів проводились спільно з науковим керівником. Всі результати, представлені у дисертації, отримані при безпосередній участі здобувача. У працях, написаних у співавторстві, реалізовано наукові ідеї дисертанта.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації представлені та обговорені на: міжнародній літній школі “Nanotechnology: from fundamental research to innovations” (Буковель, 2012), науково-практичному семінарі з міжнародною участю “Экспериментальные и клинические аспекты фотодинамической терапии” (Черкаси, 2013), Другому україно-шведському симпозиумі «Translational oncology: old and new paradigms» (Київ, 2013), IX міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Київ, 2013), науково-практичній школі «Об'єднані метою. Експериментальна онкологія для практичної медицини» (Київ, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 30 наукових праць, зокрема 8 із 11 статей у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України, 5 з яких входять до наукометричних баз, 19 тез у матеріалах вітчизняних та міжнародних конференцій, конгресів та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 160 сторінках комп'ютерного тексту і складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, 4-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних джерел літератури, який включає 191 посилання, у тому числі 187 зарубіжних авторів. Дисертаційна робота ілюстрована 54 рисунками та 6 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. Експериментальні дослідження *in vitro* виконані на лініях клітин Namalwa (лімфома Беркитта), MT-4 та Jurkat (Т-клітинний лейкоз), A2780 (карцинома яєчників), а також на мононуклеарах периферичної крові донорів і перитонеальних макрофагах мишей. Дослідження *in vivo* проведено на мишах лінії C57Bl/6 із перещепленою карциномою легень Льюїс (LLC). Лінії клітин та штам пухлини було одержано з «Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин» ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Мишей лінії C57Bl/6 віком 2-2,5 міс., масою 18-23 г отримували із розплідника віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Всі дослідження з лабораторними тваринами проводили відповідно до вимог регіонального Комітету з біоетики щодо поводження з піддослідними тваринами та з дотриманням правил роботи з ними у лабораторних умовах.

Методи експериментальної онкології. Лінії клітин лімфоцитарного походження культивували у поживному середовищі RPMI 1640 (Sigma Aldrich, США) з додаванням 10% ембріональної сироватки телят (ETC; Biowest, Франція), клітини A2780 – у середовищі DMEM із додаванням 15% ETC. Культивування ліній клітин проводили у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C за загальноприйнятою методикою. Для підтримання штаму LLC клітини інокулювали мишам лінії C57Bl/6 у кількості 1,0 x 10⁶ клітин у 0,1 мл розчину Хенкса.

Джерела лазерного випромінювання. Для фотодинамічного впливу *in vitro* та *in vivo* використовували напівпровідникові лазери Ліка-Терапевт та Ліка-Хірург (ПМВП “Фотоніка Плюс”, Черкаси) з $\lambda=658$ нм, для гіпертермії – лазер з $\lambda=810$ нм. ФДТ у скануючому режимі проводили із застосуванням запатентованої установки (ПМВП “Фотоніка Плюс”, Черкаси, патент України №89226) з додатковим діагностичним лазерним модулем ($\lambda=405$ нм), оптичними фільтрами та цифровою камерою із програмним забезпеченням на базі пакету «ControlS».

Використані фотосенсибілізатори. У якості ФС використано хлорин еб (Santa Cruz Biotechnology, США) та його водорозчинну форму у вигляді молекулярного комплексу з полівінілпіролідом – офіційний препарат Фотолон (РУП «Белмедпрепарати», Білорусь).

Використані наноматеріали. Наноматеріали, використані у роботі, представлено у табл. 1.

Створення нанокмпозитних фотосенсибілізаторів. Стокові розчини фотосенсибілізаторів отримували безпосередньо перед створенням композитів. Для цього гідрофобний хлорин еб (1 мг) попередньо розчиняли у 100 мкл диметилсульфоксиду та поступово додавали 900 мкл розчину Хенкса; до гідрофільного Фотолону (1 мг) одразу додавали 1 мл розчину Хенкса. Композит фотосенсибілізатора із колоїдним розчином наночастинок отримували при постійному струшуванні при t 20-24 °С, враховуючи необхідне масове співвідношення компонентів (від 1:5 до 1:100 залежно від типу наночастинок та задач експерименту), та інкубували протягом 5 хвилин. У дослідженнях отримані наносистеми використовували одразу після їх створення.

Наноматеріали, використані у дослідженнях

Форма	Середній розмір, нм	Стабілізатор	Автор/виробник
Наночастинки золота			
Сфери	5	-	Sigma Aldrich, США
Сфери	15	Полівінілпіролідон	Інститут нанотехнологічної індустрії Відкритого міжнародного університету розвитку людини «Україна», м. Київ, (к.х.н. О.Б. Щербаков)
Сфероподібні	15-17	Декстран-поліакриламідний співполімер	Лабораторія інформаційних систем на основі мономерів і полімерів кафедри хімії високомолекулярних сполук Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченка (д.х.н. Н.В. Куцевол)
Стрижні	62x25	Бромід цетилтриметил-амонію	Sigma Aldrich, США
Стрижні	41x10	Нетоксичний полімер	Sigma Aldrich, США
Призми	88	Полісахариди хлорели	Лабораторія біоколоїдної фізики і гліконаносинтезу Інституту біоколоїдної хімії ім.Ф.Д.Овчаренка НАН України (к.х.н. В.Р. Естрела)
Нанооболонки золота з магнетитовим ядром (FeFe ₂ O ₄ &Au ⁰)	20-100	-	Відділ фізико-хімічної геомеханіки Інституту біоколоїдної хімії ім.Ф.Д.Овчаренка НАН України (д.х.н. О.М. Лавриненко)
Наночастинки альбуміну			
Сфери із різним відсотковим складом зшитих амінокислот	125-150	-	Відділ фізико-хімічних механізмів сорбційної детоксикації ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України (д.б.н. В.В. Сарнацька)

Дослідження властивостей нанокompatитних фотосенсибілізаторів та їх компонентів. Спектральні характеристики розчинів нанокompatитів та їх компонентів визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND-1000 та спектрофлуориметра NanoDrop ND-3300 (NanoDrop, США), а також спектрофотометра Agilent-8453 (Agilent Technologies, США).

Продукцію синглетного кисню нанокompatитами встановлювали за допомогою специфічного індикатора продукції синглетного кисню Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) (Molecular Probes, США). Реєстрацію флуоресценції SOSG проводили на спектрофлуориметрі NanoDrop ND-3300 при $\lambda_{\text{ex}}=460-650$ нм і комбінованому рідері Synergy HT (BioTek, США).

Здатність клітин *in vitro* накопичувати наночастинки проводили після їх інкубації з НЧ у середовищі RPMI-1640 з/без ЕТС за допомогою темнопольної мікроскопії (для наночастинок зі світловідбиваючими гранями), чи світлової мікроскопії (для наночастинок, що мають тенденцію до агрегації). Візуалізацію наночастинок альбуміну, кон'югованих з FITC, проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа MC 300 FX (Infinitive, Австрія) при збільшенні $\times 400$.

Оцінку темної цитотоксичності наночастинок та нанокompatитів проводили методом серійних розведень.

Проведення фотодинамічного впливу in vitro. Клітини інкубували у розчині Хенкса з фотосенсибілізатором чи його нанокompatитом, що містив таку ж кількість фотосенсибілізуючого препарату протягом 1,5 год, після чого клітини тричі відмивали і опромінювали лазерним світлом ($\lambda=660$ нм) при щільності потужності $0,5-1,1$ мВт/см² та дозі 1 Дж/см². Після фотодинамічного впливу клітини переносили у поживне середовище та інкубували протягом 18-20 год при 37°C. Життєздатність клітин визначали за допомогою МТТ тесту, а підрахунок живих/мертвих клітин – після їх фарбування трипановим синім.

Для проведення фотодинамічної терапії 5×10^5 клітин LLC перещеплювали у подушечку задньої кінцівки тварин. Терапію починали після утворення видимого пухлинного вузла діаметром 3-5 мм (10-12 доба після перещеплення). Для цього фотосенсибілізатор або його нанокompatит, що містив таку ж кількість хлорину еб, вводили тваринам внутрішньовенно за 1 годину до опромінення пухлин напівпровідниковим лазером ($\lambda=660$ нм, доза – 50-150 Дж/см² залежно від тривалості опромінення, щільність потужності 50 мВт/см²).

Визначення показників росту та метастазування пухлин після фотодинамічної терапії. Вимірювання трьох взаємно перпендикулярних діаметрів пухлинного вузла проводили кожні 2-3 доби після проведення терапії, після чого вираховували об'єм та гальмування росту пухлин.

Рівень метастатичного ураження легень тварин із LLC визначали на 14-16 добу після закінчення терапії за кількістю та загальним об'ємом легневих метастазів.

Вивчення розподілу нанокompatитного фотосенсибілізатора у нормальних та пухлинній тканинах. Накопичення фотосенсибілізуючих речовин у пухлині та нормальних тканинах оцінювали за рівнем флуоресценції фарбника з використанням спектрометричного методу. Для цього пухлину, печінку, нирки, селезінку та шкіру тварин після заморожування у рідкому азоті гомогенізували,

осаджували в метанольно-водному розчині, після чого проводили аналіз супернатантів. Крім того, визначали концентрацію фотосенсибілізатора у крові.

Методи статистичного аналізу даних. Вірогідність відмінностей між показниками оцінювали, використовуючи *t*-критерій Стьюдента та One-Way ANOVA за допомогою програми OriginLab. Достовірними вважали відмінності з вірогідністю не менше 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення фізико-хімічних властивостей нанокompatитів золота та їх компонентів. Для більшості НЧ золота максимум спектра поглинання виявлявся у зеленій області (520-575 нм). Виключення становили нанооболонки золота з магнетитовим ядром, для яких характерною особливістю була наявність максимуму в фіолетовій області спектра (380 ± 20 нм). Крім того, для нанострижнів золота показано присутність другого максимуму поглинання у червоній-ближній інфрачервоній області спектра (для НЧ 62×25 нм – 650 нм, 41×10 нм – 808 нм), розташування якого залежить від співвідношення довжини нанострижня та його поперечного діаметра (Huang X. et al., 2010). Розміщення максимуму поглинання у зеленій області спектра у великій мірі залежить від розміру НЧ чи їх агрегатів: чим більшим є їх діаметр, тим у більш довгохвильову область зміщується пік. Тому вимірювання спектра абсорбції, завдяки простоті виконання, можна вважати експрес-тестом для контролю стабільності колоїдних розчинів НЧ золота. Максимум флуоресценції всіх НЧ золота, за виключенням нанострижнів, знаходився в області 580-600 нм.

З використанням індикатора SOSG нами виявлено зниження продукції синглетного кисню композитами хлорину еб з нанопризмами, нанооболонками та сфероподібними НЧ, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером, відносно вихідного хлорину еб. Причому ефект збільшувався зі зростанням вмісту НЧ у композиті. Так, наприклад, флуоресценція SOSG у розчинах, що містили 1 мкг/мл хлорину еб та 20, 100 чи 200 мкг/мл нанопризм золота, після опромінення зразків лазером ($\lambda = 660$ нм, доза – 1 Дж/см^2) зменшувалась відносно показника вільного ФС на 19,9%, 27,3% та 35,5% відповідно. Виключенням став композит наносфер золота (15 нм), стабілізованих полівінілпіролідом, з Фотолоном, що крім хлорину еб містив у своєму складі цей же полімер. За рахунок формування товстого шару полівінілпіролідону між НЧ та ФС, передача енергії від хлорину еб до НЧ вірогідно не відбувалась, і, відповідно, продукція синглетного кисню залишалась на такому ж рівні, що і у вихідного ФС. Це підтверджувалось наявністю лише незначної зміни спектра поглинання хлорину еб при формуванні композиту з даними наносферами золота, що виражалась у зміщенні довгохвильового максимуму на 9 нм. Відмітимо, що нанострижні золота (62×25 нм) самостійно індукували невелику кількість синглетного кисню: значення флуоресценції SOSG були співставними з такими для 1 мкг/мл хлорину еб при його опроміненні на порядок меншими дозами світла. Варто зазначити, що продукція синглетного кисню нанокompatитом не корелює з його фотодинамічною активністю, адже при нековалентній взаємодії хлорин еб здатний переходити з нанокompatиту у гідрофобні мембрани клітин, після чого відбувається активація його світлом. Більш того, блокування продукції

синглетного кисню фотосенсибілізатора до його потрапляння у пухлинну клітину зменшує його «фотовицвітання» та сприяє більшій селективності дії препарату.

Високу здатність до взаємодії з хлорином еб мали сфероподібні НЧ золота, стабілізовані декстран-поліакриламідним співполімером. Так, показано, що у зразках, які містили НЧ золота та хлорин еб у масовому співвідношенні 10:1, після осадження при 12 тис. об/хв. впродовж 15 хв в абсорбційному спектрі супернатантів не виявлено максимумів поглинання, характерних для ФС чи НЧ золота. Крім того, у композиті з даними наночастинками для хлорину еб стабільно спостерігалось батохромне зміщення довгохвильового максимуму поглинання з 646 нм до 680 нм, що також свідчило про взаємодію молекули ФС із НЧ золота.

Про взаємодію компонентів композиту хлорину еб з наночастинками альбуміну свідчило зміщення максимуму флуоресценції ФС у більш довгохвильову область з 660 до 671 нм.

Оцінка темної цитотоксичності наночастинок та їх взаємодії з клітинами. При вивченні темної цитотоксичності НЧ золота на лініях клітин лімфоїдного походження (MT-4 і Namalwa) показано, що наносфери золота діаметром 15 нм, стабілізовані полівінілпіролідом, проявили слабку токсичність (до 12% мертвих клітин) навіть у концентрації 250 мкг/мл, що на порядок перевищує концентрації для композитів, використаних при фотодинамічному пошкодженні клітин. Іншим авторам також не вдалось виявити цитотоксичність НЧ золота діаметром 15 нм (Pan Y. et al., 2007). У наших дослідженнях не було зареєстровано темної цитотоксичності й для нанопризм (концентрація 100 мкг/мл) та нанооболонки золота (концентрація 40 мкг/мл). Зазначимо, що визначити IC_{50} для цих НЧ виявилось неможливим через їх невисоку концентрацію після синтезу, а концентрування даних НЧ осадженням чи випарюванням розчину може призводити до їх агрегації. Натомість, IC_{50} для НЧ золота діаметром 5 нм складала 20 мкг/мл. Coradeghini зі співавт. (2013) показано, що такі НЧ проникають у клітину і призводять до формування автофагосом та пошкодження цитоскелету. Тому, незважаючи на більші значення співвідношення площі поверхні до загальної маси таких НЧ, що дає змогу транспортувати велику кількість молекул, їх використання в якості носіїв лікарських препаратів ускладнене. Нами виявлено, що нанострижні золота (62x25 нм) також є токсичними, $IC_{50}=7,5$ мкг/мл. Темнова цитотоксичність для НЧ іншого розміру (41x10 нм) у діапазоні концентрацій 1-20 мкг/мл не була встановлена. Зазначимо, що вагому роль у токсичності нанострижнів золота має не розмір, а наявність у розчині залишків необхідного для їх синтезу токсичного бромиду цетилтриметиламонію, який у другому зразку даного типу НЧ після їх синтезу був заміщений на нетоксичний полімер. Це підтверджується тим, що по відношенню до клітин Namalwa токсичність нанострижнів вдалось знизити (з 34,4% до 18,3% мертвих клітин) при додаванні в інкубаційне середовище 10% ЕТС, що, імовірно, приводило до взаємодії бромиду цетилтриметиламонію з сироватковим альбуміном та формування білкової корони навколо НЧ. Однак, за присутності в інкубаційному середовищі ЕТС, Фотолон виявляв на 40,0% меншу фотодинамічну активність, у порівнянні з такою, якщо в культуральне середовище не додавали ЕТС. Помірно токсичними виявились сфероподібні НЧ

золота, стабілізовані декстран-поліакриламідним співполімером: при концентрації 5 мкг/мл виявлено 16,0% мертвих клітин МТ-4, а при зменшенні концентрації вдвічі загибель клітин не спостерігали.

У подальших дослідженнях нами було вивчено акумуляцію нанопризм золота у нормальних та злякано трансформованих лімфоцитах людини. Візуалізацію взаємодії нанопризм золота, покритих шаром полісахариду, з поверхнею клітин ліній Namalwa та МТ-4 проводили за допомогою темнопольної мікроскопії, що стало можливим завдяки наявності у НЧ світловідбиваючих граней. Контакт нанопризм з мембраною клітин був стійким за умов триразового відмивання клітин. На поверхні нормальних лімфоцитів НЧ не агрегували навіть при їх високих концентраціях в інкубаційному середовищі (100 мкг/мл). При вивченні взаємодії агрегатів нанооболонки золота з клітинами за допомогою світлопольної мікроскопії для них також показано накопичення на поверхні клітин лінії МТ-4 та відсутність такого на нормальних лімфоцитах людини. Нами встановлено, що моноцити людини та перитонеальні макрофаги миші проявляли фагоцитуючі властивості по відношенню до нанопризм та нанооболонки золота. На таку вибірковість взаємодії НЧ із клітинами, крім стабілізуючого колоїд полімеру, розміру, форми та поверхневого заряду НЧ, може впливати також склад поверхневої мембрани клітин (Sezgin E. et al., 2008). У дослідженнях інших авторів було показано, що фагоцитуючі клітини здатні інтерналізувати НЧ золота (Krpetic Ž. et al., 2010). Варто зазначити, що для фотодинамічної терапії достатнім є накопичення фотосенсибілізатора вже на поверхневій мембрані клітин, що дає змогу використовувати з цією метою наночастинки великого діаметра, які гірше проникають у клітину, але здатні переносити на своїй поверхні значну кількість молекул препарату.

Нами досліджено темнову цитотоксичність НЧ альбуміну із різним відсотковим складом зшивки амінокислот та НЧ золота, покритих альбуміном. Було показано, що такі НЧ є нетоксичними по відношенню до нормальних і злякано трансформованих клітин навіть при їх високих концентраціях в інкубаційному середовищі (1 мг/мл). Крім того, на відміну від нативного альбуміну, дані НЧ (частинки зі 100% зшивкою лізину) активно абсорбуються на поверхні клітин МТ-4, причому максимум накопичення припадає на 4 годину інкубації.

Фотодинамічна активність наноконкомпозитів золота з хлорином еб у дослідженнях *in vitro*. При вивченні фотоцитотоксичності композитів хлорину еб у формі Фотолону з наносферами золота ($d=15$ нм) на лініях клітин Namalwa, МТ-4 та Jurkat показано, що активність ФС у наноконкомпозиті збільшується в 3,0; 4,4 та 1,8 рази відповідно (табл. 2). В ефективному наноконкомпозиті масове співвідношення хлорину еб до НЧ золота відрізнялось не менше, ніж на порядок (0,2 мкг/мл хлорину еб та 10 мкг/мл золота). Маса однієї НЧ золота діаметром 15 нм, припускаючи, що вона сферична, складає близько $3,41 \times 10^{-17}$ г, а молекулярна маса хлорину еб – 596,67. Отже, на одну НЧ золота припадає близько 10^3 молекул ФС. Враховуючи, що хлорин еб розташовується у товстому шарі полімеру, ці дані характеризують високу здатність наносфер до транспортування хлорину еб.

Фотодинамічна активність нанокompозитів *in vitro*

Тип наночастинок	Найбільш ефективне масове співвідношення хлорин е6:НЧ	Зміна фотодинамічної активності нанокompозиту відносно вихідного ФС	Лінії клітин
Наносфери золота (15 нм)	1:50	↑ 3,0	Namalwa
		↑ 4,4	MT-4
		↑ 1,8	Jurkat
		↑ 1,15	A2780
Нанопризми золота	1:50	↑ 1,64	Namalwa
Нанооболонки золота	1:40	↓ 0,39	MT-4
НЧ золота, стабілізовані декстран-поліакриламідним співполімером	1:10	↑ 1,95	MT-4
НЧ альбуміну (100% зшивка)	1:40	↑ 1,22	MT-4
НЧ альбуміну (20% зшивка)	1:40	↓ 0,59	MT-4
Нанопризми золота, покриті альбуміном	1:40	↑ 1,3	Namalwa
		↑ 1,33	MT-4

Примітка: ↑ – збільшення у N разів; ↓ – зменшення у N разів.

Зазначимо, що чутливість нормальних лімфоцитів людини до фотодинамічного впливу після їх преінкубації з Фотолоном чи його нанокompозитом була однаковою, що свідчить про слабку взаємодію даних клітин з НЧ золота. Дослідження Liptrott N.J. зі співавт. (2014) також свідчать про слабку взаємодію лімфоцитів, виділених із периферичної крові здорових донорів, із наносферами золота, покритими розгалуженим полімером.

Результати вивчення фотодинамічної активності хлорину е6 (0,3 мкг/мл) на лініях клітин Namalwa (суспензійний характер росту клітин) та A2780 (ріст клітин в моношарі) свідчать про зниження фотодинамічної активності ФС: для клітин Namalwa вона складала $31,0 \pm 1,7\%$, а для клітин A2780 – $17,2 \pm 0,2\%$. Відповідно, фотодинамічна активність композиту хлорину е6 з наносферами золота була більшою за таку для вільного ФС лише в 1,15 рази при використанні клітин A2780. Вищу чутливість суспензійних культур відносно моношарових до фотодинамічного впливу показано Masutani зі співавт. (1995) при використанні в якості фотосенсибілізатора похідного бензопорфірину. Однією з причин різної ефективності ФС для цих двох типів культур може бути різний рівень оксигенації клітин під час фотодинамічного впливу (Weston M.A. et al., 2014).

При вивченні фотодинамічної активності композиту хлорину е6 з нанопризмами золота на лінії клітин Namalwa показано, що жоден нанокompозит з різним співвідношенням компонентів не виявляв зниженої, відносно вихідного

хлорину еб, фотодинамічної активності. Більш того, при співвідношенні ФС:нанопризми золота – 1:50 (0,2 мкг/мл Фотолону та 10 мкг/мл наночастинок золота) було зареєстровано підвищення активності композиту в 1,6 рази. У дослідженнях на нормальних лімфоцитах людини підвищення активності хлорину еб у композиті із нанопризмами золота зареєстровано не було.

Результати вивчення фотодинамічної активності композитів хлорину еб з нанооболонками золота на клітинах лінії МТ-4 свідчать про її обернену залежність від вмісту НЧ у композиті. Зважаючи на ці результати, а також отримані дані щодо взаємодії даних НЧ з ФС (блокування продукції синглетного кисню) та їх здатності накопичуватись на поверхні клітин МТ-4, можна припустити, що нанооболонки золота, синтезовані без стабілізатора, не вивільняють молекули ФС у пухлинну клітину, таким чином перешкоджаючи її фотопшкодженню. Ці дані свідчать про необхідність наявності у нанокompозиті для фотодинамічного пошкодження клітин додаткового фактора, наприклад, полімера, що збільшить відстань між молекулами ФС та поверхнею НЧ.

Високу фотодинамічну активність мав композит на основі сфероподібних НЧ золота, стабілізованих оригінальним декстран-поліакриламідним співполімером (2,5 мкг/мл НЧ золота та 0,25 мкг/мл хлорину еб). Особливість цього полімера полягає у наявності гідрофобних кишень для інтерналізації хлорину еб. Загибель клітин МТ-4, інкубованих з нанокompозитом, після лазерного опромінення у два рази ($p < 0,05$) перевищувала таку для клітин, інкубованих з вільним хлорином еб (рис. 1). Варто зазначити, що НЧ золота в даному композиті відіграють ключову роль, так як сам полімер не підвищував ефективність фотодинамічного впливу хлорину еб на клітини МТ-4.

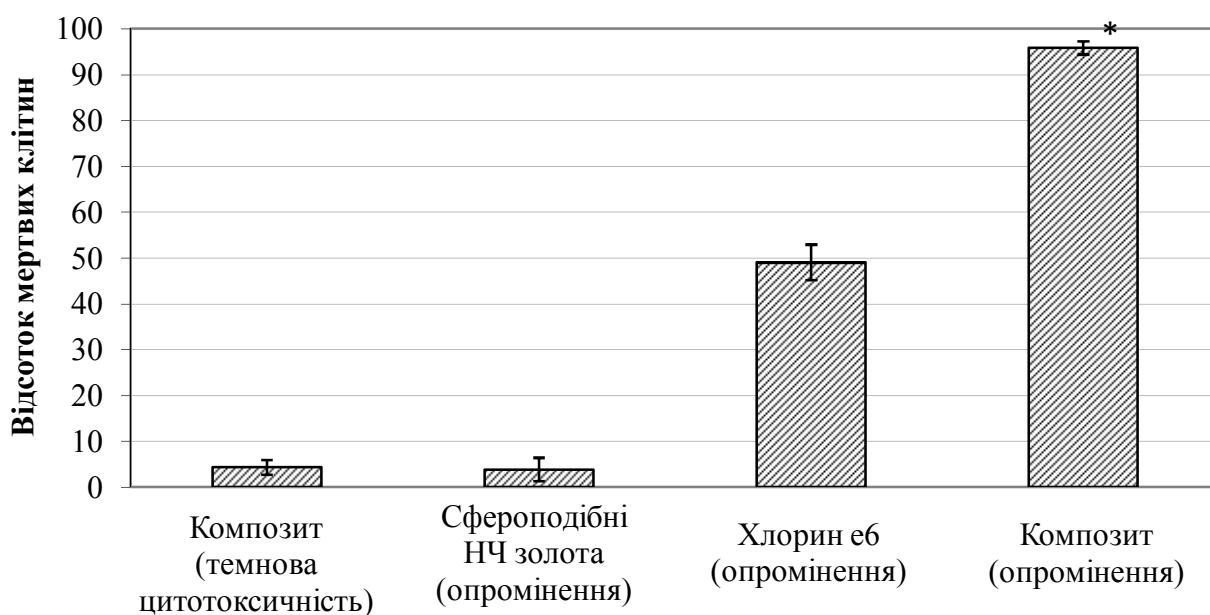


Рис. 1. Фотодинамічна активність хлорину еб у композиті зі сфероподібними наночастинками золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером (культура клітин МТ-4).

Примітка. * – $p < 0,05$ у порівнянні із показниками у зразках, що інкубували за тих же умов із вільним ФС.

При вивченні фотодинамічної активності композитів хлорину еб із НЧ альбуміну (0,2 мкг/мл фотосенсибілізатора і 20 мкг/мл білка) показано, що загибель клітин МТ-4 підвищувалася зі зростанням відсоткового складу зшитих амінокислот у НЧ, що входять у композит. Так, при використанні НЧ альбуміну зі 100% та 200% зшивкою амінокислот, фотодинамічна активність композиту підвищувалась на $22,3 \pm 5,0\%$ відносно активності вихідного ФС. Присутність у інкубаційному середовищі крім ФС нативного альбуміну закономірно знижувала ефективність фотодинамічного впливу на $34,7 \pm 4,5\%$ відносно активності вільного ФС. При вивченні фотодинамічної активності композиту хлорину еб із нанопризмами золота, покритих шаром зшитих молекул альбуміну на клітинах ліній Namalwa та МТ-4, встановлено, що кількість мертвих клітин статистично достовірно перевищувала таку для клітин обох культур, інкубованих лише з вільним ФС на $28,1 \pm 5,0\%$.

Фотодинамічна активність нанокompозитних фотосенсибілізаторів у дослідженнях *in vivo*. Нанокompозити, що проявили високу фотоцитотоксичність *in vitro* (на основі наносфер, нанопризм та сфероподібних наночастинок золота), було використано для вивчення їх фотодинамічних ефектів у мишей із перещепленою LLC. Для цього було вивчено динаміку накопичення хлорину еб та його нанокompозиту у пухлині та нормальних тканинах мишей. Нами зареєстровано стрімке зростання концентрації хлорину еб як самостійно, так і в складі композиту з наносферами золота у печінці, нирках, селезінці і пухлині з максимумом накопичення через 1-2 години після введення ФС, (табл. 3) що узгоджується з даними літератури (Shliakhtsin S. V. et al., 2009). При цьому накопичення у пухлинній тканині хлорину еб у складі нанокompозиту перевищувало таке для вільного ФС. У крові спостерігається різке падіння інтенсивності флуоресценції і, відповідно, концентрації ФС внаслідок його накопичення у тканинах. Слід зазначити, що, на відміну від ФС першого покоління, хлорин еб та його нанокompозити не накопичуються у шкірі і, відповідно, не викликають по відношенню до неї тривалої фототоксичності.

Таблиця 3

Флуоресценція хлорину еб самостійно та у складі нанокompозиту із наносферами золота у нормальних та пухлинній тканинах мишей через годину після їх введення

Тканина	Флуоресценція хлорину еб, відн. од.	
	ФС	Нанокompозит
Кров	492,0 ± 18,5	398,0 ± 21,4
Печінка	635,3 ± 53,2	826,7 ± 28,4
Нирки	567,0 ± 35,3	768,3 ± 23,3
Селезінка	390,7 ± 27,6	537,0 ± 15,1
Пухлина	767,7 ± 24,4	998,0 ± 51,2

При вивченні фотодинамічної протипухлинної активності композитів хлорину еб, що містили наносфери золота, показано, що на 9-10 добу після проведення ФДТ гальмування росту пухлин у групі тварин, котрій вводили нанокompозит, складало $56,9 \pm 11,0\%$ відносно групи тварин, що отримували лише хлорин еб, і $85,1 \pm 4,0\%$ відносно контрольної. Причому середня тривалість життя мишей, що отримали ФДТ з даним нанокompозитом, у два рази перевищувала середню тривалість життя тварин, яким була проведена фотодинамічна терапія з вільним ФС. В аналогічних дослідженнях, проведених із використанням композиту хлорину еб з нанопризмами золота, встановлено гальмування росту пухлин на 11 добу після ФДТ у групі тварин, яким вводили нанокompозит, на $69,5 \pm 9,1\%$ відносно контрольної і на $51,9 \pm 14,2\%$ відносно групи тварин, яким вводили хлорин еб. При ФДТ з використанням композиту, що містив сфероподібні НЧ золота, стабілізовані декстран-поліакриламідним співполімером, показано, що максимальне гальмування росту пухлин спостерігалось на 10-ту добу після ФДТ із композитом і становило $71,7 \pm 8,0\%$ відносно контрольних показників та $57,1 \pm 14,2\%$ відносно групи тварин, якій перед опроміненням вводили хлорин еб (рис. 2).

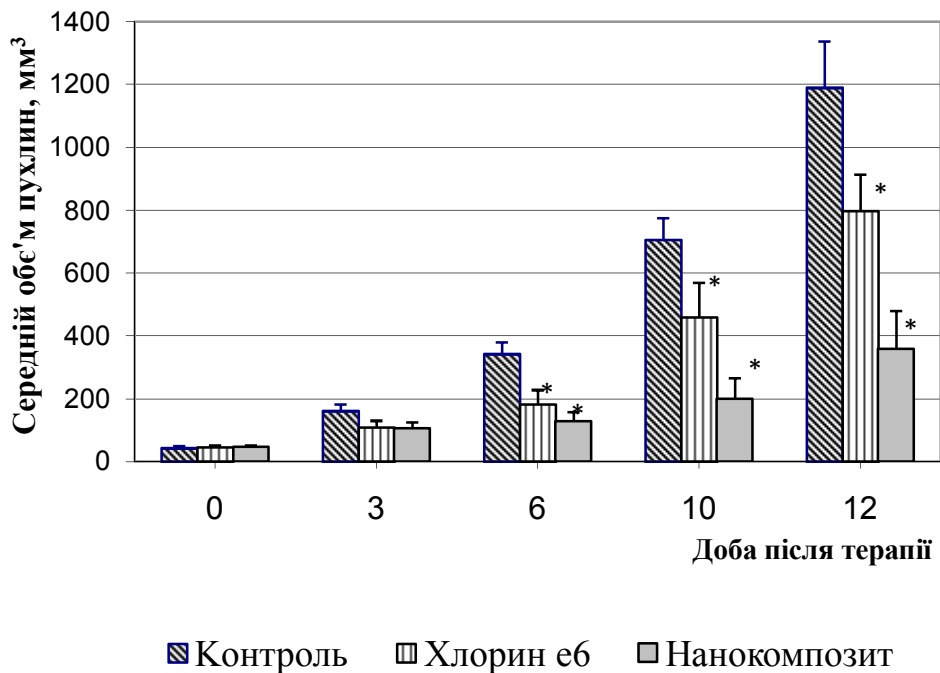


Рис. 2. Фотодинамічний вплив на ріст карциноми мишей Льюїс із застосуванням хлорину еб та його композиту зі сфероподібними НЧ золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером.

Примітка. * – $p < 0,05$ у порівнянні із показниками контролю.

Антиметастатична активність ФДТ показана при використанні різних ФС (Bicalho L.S. et al., 2013; Rocha L.V. et al., 2015), у тому числі і хлорину еб (Wang P. et al., 2015). Нами виявлено, що кількість метастазів LLC та їх об'єм на 16-ту добу після ФДТ з хлорином еб ($21,0 \pm 4,7$; $54,8 \pm 23,9$ мм³ відповідно) або його нанокompозитом зі сферо подібними НЧ золота ($18,2 \pm 5,4$; $50,0 \pm 26,2$ мм³) була статистично достовірно меншою, у порівнянні з тваринами, що не отримували ФДТ

($38,4 \pm 5,3$ та $128,2 \pm 23,4$ мм³). Крім того, ці показники в групі тварин, яким перед лазерним опроміненням вводили наноккомпозит, проявляли тенденцію до зменшення відносно таких у групі тварин, яким вводили лише хлорин еб. Варто зазначити, що введення тваринам наноккомпозитів без наступного лазерного опромінення не впливало на ріст та метастазування LLC (кількість метастазів – $36,0 \pm 7,1$; об'єм метастазів – $89,6 \pm 26,4$ мм³).

Підвищення фотодинамічної активності золотовмісних наноккомпозитів шляхом зміни фізико-технічних умов опромінення.

Застосування подвійного (двохвильового) лазерного збудження золотовмісних наноккомпозитів. Перспективним напрямком розвитку фотодинамічної терапії є її поєднання з лазерною гіпертермією за рахунок використання у композиті НЧ із довжиною хвилі поверхневого плазмонного резонансу в ближній інфрачервоній області спектра (Gao L. et al., 2012; Seo S.-H. et al., 2014). Довгохвильовий максимум поглинання використаних в даному дослідженні нетоксичних нанострижнів золота (41×10 нм) становив 810 нм. Нами були використані нанострижні золота, які здатні не лише доставляти ФС, а і поєднувати фотодинамічне та фототермічне пошкодження клітин. Для цього клітини ліній Namalwa та МТ-4, інкубовані з наноккомпозитом, опромінювали не лише лазером із $\lambda=658$ нм, а й лазером з $\lambda=810$ нм. При комбінованій дії опромінення клітин проводили послідовно: спочатку червоним, потім – інфрачервоним світлом. Параметри опромінення для обох лазерів були однаковими: доза випромінювання – 1 Дж/см² при щільності потужності $1,1$ мВт/см². Опромінення нанострижнів на довжині хвилі їх максимуму поглинання призводить до розігріву НЧ, внаслідок чого пошкоджуються розташовані поблизу клітин чи, у випадку інтерналізації НЧ, їх органели (Huff T.V. et al., 2007; Zhang Z. et al., 2013). В результаті проведення такого опромінення встановлено адитивний ефект при пошкодженні пухлинних клітин *in vitro* у порівнянні з фотодинамічним чи гіпертермічним впливом окремо. При застосуванні тільки фотодинамічного впливу або тільки фототермічного спостерігалась загибель, відповідно, $27,1 \pm 2,9\%$ та $34,6 \pm 4,3\%$ клітин лінії Namalwa. При використанні наноккомпозиту та комбінованого світлового впливу кількість мертвих клітин Namalwa становила $81,0 \pm 1,0\%$. Така ж тенденція встановлена при застосуванні фотодинамічного, фототермічного і комбінованого впливу на клітини лінії МТ-4 ($37,3 \pm 4,7\%$, $33,5 \pm 6,4\%$ та $87,7 \pm 1,0\%$ відповідно).

Оптимізація параметрів лазерного опромінення при ФДТ. В експериментах *in vitro* ми дослідили вплив щільності потужності ($0,6$; $1,1$ та $1,6$ мВт/см²) на загибель клітин Namalwa при одній і тій же дозі опромінення (1 Дж/см²). Через 20 год після опромінення встановлено зменшення кількості мертвих клітин внаслідок фотодинамічного впливу зі збільшенням щільності потужності світла ($68,2\%$, $36,3\%$ та $16,2\%$ мертвих клітин відповідно). Дана закономірність починає відслідковуватись уже через 30 хв після опромінення. Ці результати, безперечно, достовірні для діапазону щільностей потужності та доз опромінення, при яких спостерігається «вигорання» ФС. Одержані в експериментах *in vitro* дані використано нами при розробці методики опромінення мишей з перещепленою LLC, зокрема при підборі оптимальної щільності потужності світла для опромінення пухлин ($45-50$ мВт/см²). Іншими авторами також було показано, що найбільша

затримка росту пухлини спостерігалась при невеликій щільності потужності опромінення, а саме при 50 мВт/см^2 (Baran T.M. et al., 2012).

Використання скануючого режиму лазерного опромінення при фотодинамічній протипухлинній терапії. Ефективність фотодинамічної терапії залежить не тільки від обраної дози лазерного випромінювання, але і від вмісту в пухлинній тканині фотосенсибілізатора, що обумовлює фотохімічне пошкодження тканини. Тому, принциповим недоліком сучасної техніки проведення фотодинамічної терапії є відсутність безпосереднього контролю за вмістом ФС у пухлині в ході проведення лікувальної процедури. Нами була поставлена мета по розробці метода оптико-механічного моніторингу наявності фарбника у пухлині в момент опромінення. У запропонованому методі одночасно реалізуються задачі, спрямовані на недопущення опромінення зон пухлини при недостатньому вмісті у них фотосенсибілізатора. Для цього нами був розроблений скануючий прилад, принцип дії якого полягає в опроміненні пухлини лазерним променем малої потужності та малого поперечного перерізу (1 мм), який переміщується покровоно по обраній зоні з визначеною затримкою у кожній точці (20 мілісекунд). При вивченні ефективності ФДТ з використанням даного приладу, тварин з LLC опромінювали паралельно у скануючому або безперервному режимах. В обох варіантах дотримувались однакових умов і параметрів опромінення (довжина хвилі, щільність потужності та час опромінення). В результаті, при щільності потужності 50 мВт/см^2 та тривалості опромінення 50 хв, гальмування росту пухлин на 10-ту добу після ФДТ у групі, опроміненій у скануючому режимі, складало $33,1 \pm 5,2\%$, а у безперервному – $53,0 \pm 1,6\%$, хоча доза опромінення за безперервного режиму (150 Дж/см^2) перевищувала в 400 разів таку при скануючому режимі ($0,375 \text{ Дж/см}^2$).

Оскільки при даному методі опромінення сканування відбувається в межах прямокутника, в який вписується подушечка задньої кінцівки тварини з пухлиною, досить великий відсоток випромінювання не потрапляє на об'єкт. Крім того, такий варіант проведення ФДТ не враховує нерівність границь пухлини та перепади концентрації ФС у різних її ділянках впродовж опромінення. Тому, на базі скануючого приладу було розроблено лікувально-діагностичну систему, яка забезпечувала флуоресцентне визначення наявності ФС у тканині в ході проведення процедури опромінення. Для збудження флуоресценції ФС було встановлено додатковий лазерний модуль із довжиною хвилі 405 нм. Реєстрацію флуоресценції проводили камерою на базі ПЗЗ-матриці, обробку зображення та визначення зон опромінення реалізували завдяки оптичним фільтрам та розробленому програмному забезпеченні на базі пакету «ControLS». Завдяки даній системі відбувалось опромінення лише тих зон пухлини, в яких було зареєстровано флуоресценцію ФС. Дані експерименти проводили також при використанні композиту ФС зі сфероподібними НЧ золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером. Інтенсивність флуоресценції пухлини до початку лазерного опромінення при введенні тварині нанокompозиту була вищою, ніж для вільного ФС, що свідчило про краще накопичення у пухлині ФС у складі композиту (рис. 3).

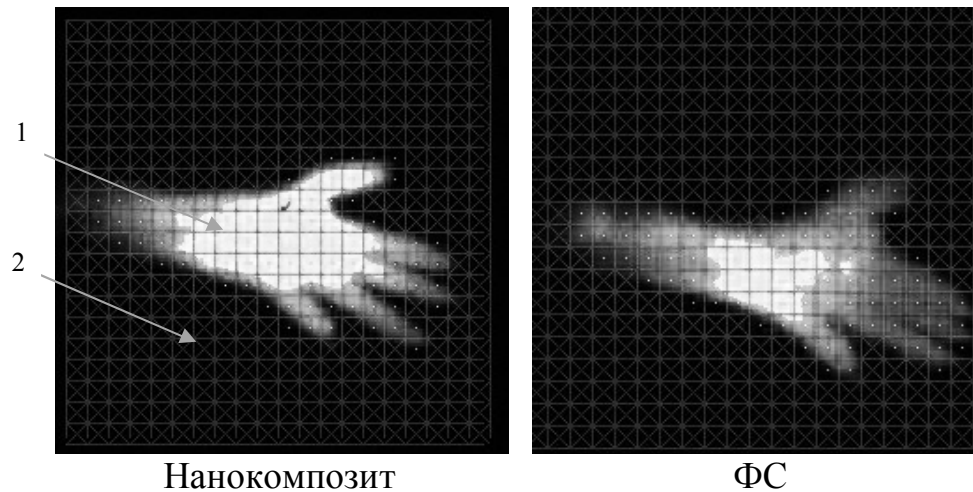


Рис. 3. Флуоресценція подушечки задньої кінцівки миші після введення ФС чи його композиту з наночастинками золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером.

1 – автоматично виділена зона флуоресценції для подальшого сканування лазером;
2 – зона без флуоресценції.

Доза опромінення при скануючому режимі залежала від загальної кількості точок, визначених за флуоресценцією, і коливалась від 0,7 до 3,2 Дж/см². На 11-ту добу гальмування росту пухлин у тварин, що були опромінені у скануючому режимі, становило 54,1±10,5%, а при безперервному режимі – 55,3±3,5%. Отже, отримані результати практично не відрізнялись, хоча середня доза опромінення за скануючого режиму була в 45 разів менша. При порівнянні ефективності нанокомпозиту і вільного хлорину еб за опромінення тварин у скануючому режимі показано, що у тварин, яким вводили нанокомпозит, гальмування росту пухлин складало майже 10% відносно групи, якій вводили лише ФС. Хоча дана різниця є на грані статистичної достовірності, спостерігається тенденція до підвищеної активності нанокомпозиту, що може покращити результати при подальшому вдосконаленні опромінення у скануючому режимі.

Таким чином, в результаті проведених експериментальних досліджень *in vitro* та *in vivo* показано підвищення ефективності фотодинамічного опромінення при застосуванні наночастинок золота у складі композитів із фотосенсибілізатором хлорином еб.

ВИСНОВКИ

Розробка підходів до підвищення ефективності методів лікування онкологічних хворих становить одну з найактуальніших проблем сьогочасної медико-біологічної науки. Фотодинамічна терапія пухлин є перспективним методом, що має низку переваг перед традиційними методами лікування, відрізняючись селективністю, малою травматичністю та відсутністю серйозних побічних реакцій. Проте, слабе проникнення світлового (лазерного) випромінювання у глибину тканин обмежує практичне застосування фотодинамічної терапії невеликими (до 1 см) і розташованими на поверхні пухлинами. Ці обмеження вдається суттєво зменшити шляхом використання сучасних здобутків нанотехнологій. Зокрема,

нанорозмірні частинки сприяють збільшеному накопиченню у пухлині фарбників-фотосенсибілізаторів, що робить чутливими до фотодинамічного впливу навіть глибоко розташовані ділянки пухлини.

Дана робота спрямована на вивчення можливості застосування наночастинок золота, здатних не тільки підвищувати транспортування фотосенсибілізатора у пухлину, але й посилювати фотодинамічний ефект світла на пухлинні клітини завдяки унікальним оптичним властивостям цих наночастинок.

1. Встановлено, що для більшості використаних у дослідженнях НЧ золота максимум спектра поглинання розташований в зеленій області – 520-575 нм (за виключенням нанооболонки та нанострижнів золота), а флуоресценції – в області 580-600 нм. При взаємодії хлорину еб зі сфероподібними НЧ золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером, відбувається батохромне зміщення довгохвильового максимуму спектра поглинання на 34 нм, а при взаємодії ФС з наносферами золота – на 9 нм. Компоненти композиту хлорину еб взаємодіють з НЧ альбуміну, про що свідчить зміщення максимуму флуоресценції ФС у більш довгохвильову область (з 660 нм до 671 нм). Здатність до генерації синглетного кисню нанокompозитом зі сфероподібними НЧ золота, а також композитами з нанопризмами та нанооболонками золота у модельних розчинах обернено корелює зі зростанням вмісту НЧ золота.

2. З'ясовано, що наносфери (15 нм), сфероподібні НЧ, нанострижні (41x10 нм), нанопризми і нанооболонки золота, а також НЧ альбуміну в терапевтичних концентраціях не проявляють темнову цитотоксичність, тоді як наночастинки золота діаметром 5 нм та нанострижні (62x25 нм), стабілізовані бромідом цетилтриметиламонію, є токсичними. Показано зниження токсичності НЧ золота за присутності в інкубаційному середовищі ембріональної сироватки телят.

3. За допомогою темнопольної та світлової мікроскопії виявлено вибіркoвість взаємодії нанопризм та нанооболонки золота з поверхнею клітин ліній Namalwa та МТ-4 і відсутність такої з нормальними лімфоцитами людини. Показана здатність моноцитів людини та перитонеальних макрофагів миші фагоцитувати ці НЧ золота. На відміну від нативного альбуміну, НЧ альбуміну здатні абсорбуватись на поверхні клітин МТ-4 з максимумом накопичення на 4 годину інкубації.

4. Встановлено по відношенню до злoякісно трансформованих клітин людини лімфоїдного походження збільшення фотодинамічної активності композитів хлорину еб з наносферами (15нм), стабілізованими полівінілпіролідом, нанопризмами та сфероподібними НЧ золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером, порівняно із вільним фотосенсибілізатором, у 1,6-4,4 рази. Найвищу чутливість до фотодинамічного впливу виявлено у клітин ліній Namalwa та МТ-4 після їх преінкубації зі сферичними наночастинками золота ($d=15\text{нм}$), стабілізованими полівінілпіролідом (зростання загибелі клітин у 3,0 та 4,4 рази відповідно). При вивченні фотодинамічної активності композитів хлорину еб з нанооболонками золота показано її обернену залежність від вмісту НЧ у композиті.

5. Виявлено, що композити хлорину еб з наносферами (15нм), стабілізованими полівінілпіролідом, нанопризмами та сфероподібними НЧ золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером, мають високу протипухлинну фотодинамічну активність *in vivo*: найвища серед апробованих

нанокомпозитів протипухлинна фотодинамічна дія (зменшення об'єму пухлини до двох разів) встановлена у тварин із перещепленою карциномою Льюїс при застосуванні композиту зі сферичними наночастинками. Показано антиметастатичну дію ФДТ з використанням хлорину еб та тенденцію до її зростання при комплексуванні ФС зі сфероподібними НЧ золота.

6. Використання композиту хлорину еб з плазмонно-активними нанострижнями золота *in vitro* дозволяє підвищити ефективність фотодинамічного впливу (опромінення із $\lambda=658$ нм) шляхом його комбінації з фототермічним впливом (опромінення із $\lambda=810$ нм).

7. Охарактеризовано модифікуючу дію нативного сироваткового альбуміну людини й альбумінових наночастинок на протипухлинну фотодинамічну активність хлорину еб та його нанокомпозитів *in vitro*. Показано, що загибель клітин після фотодинамічного впливу підвищується зі зростанням відсоткового складу зшитих амінокислот у НЧ альбуміну, що входять у композит.

8. Застосування системи реєстрації флуоресценції ФС у пухлині з наступним опроміненням тільки тих її зон, які накопичують ФС, обумовлювала однакову протипухлинну ефективність скануючого та безперервного режимів лазерного опромінення, в той час як середня доза при безперервному режимі опромінення була у 45 разів більшою, ніж при скануючому режимі.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Photodynamic Activity of Nanogold-Doped Fotolon: Free Radicals Versus Singlet Oxygen / N. Gamaleia, G. Dolinsky, E. Shishko, A. Shcherbakov, A. Usatenko, I. Shton, P. Yermak // Forum Immun. Dis. Ther. – 2011. – Vol. 2, № 3. – P. 237-246. (*Особистий внесок здобувача: участь у визначенні фотодинамічної активності композиту «наносфери золота-хлорин еб» in vitro; порівнянні рівнів продукції синглетного кисню композитом та вільним фотосенсибілізатором; аналізі отриманих результатів; написанні та оформленні статті*).
2. Фотодинамічна активність сенсибілізатора другого покоління Фотолону (хлорину еб) та його золотого нанокомпозиту: досліді *in vitro* та *in vivo* / М.Ф. Гамалія, Є.Д. Шишко, І.О. Штонь, В.В. Холін, О.Б. Щербаков, О.В. Усатенко // Фотобіол. Фотомед. – 2012. – Т. 9, № 1,2. – С. 99-103. (*Особистий внесок здобувача: визначення фотодинамічної активності композиту «наносфери золота-хлорин еб» in vivo на карциномі легень Льюїс, аналіз отриманих результатів; участь у написанні та оформленні статті*).
3. Плотность мощности лазерного излучения как фактор решающего значения при ФДТ / Е.Д. Шишко, И.А. Штонь, В.В. Холин, Н.Ф. Гамалея // Фотобіол. Фотомед. – 2014. – Т. 11, № 1-2. – С. 68-75. (*Особистий внесок здобувача: участь у визначенні впливу щільності потужності лазерного опромінення на ефективність фотодинамічної терапії in vitro, аналіз отриманих результатів; участь у написанні та оформленні статті*).
4. Photodynamic responsiveness of human leukemia Jurkat/A4 cells with multidrug resistant phenotype / A.A. Philchenkov, E.D. Shishko, M.P. Zavelevich, L.M. Kuiava, K. Miura, D.Yu. Blokhin, I.O. Shton, N.F. Gamaleia // Exp. Oncol. – 2014. – Vol. 36, No. 4. –

- P. 241-245. (*Особистий внесок здобувача: участь у визначенні фотодинамічної активності композиту наночастинок золота з фотосенсибілізатором хлорином еб, аналіз отриманих результатів; участь у написанні та оформленні статті*)
5. Дослідження та розробка нових методів проведення фотодинамічної терапії з використанням лазерного випромінювання / С.В. Павлов, С.Є. Тужанський, В.В. Холін, О.М. Чепурна, В.С. Войцехович, О.С. Камінський, А.М. Сахно, В.Д. Попов, С.О. Магдебурга, І.О. Штонь, М.Ф. Гамалія // Фотобіол. Фотомед. – 2014. – №1-2. – С. 101-104 (*Особистий внесок здобувача: перевірка ефективності розробленого скануючого лазерного приладу для фотодинамічної терапії пухлин in vivo, аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформленні статті*)
6. Підвищення ефективності фотодинамічної терапії шляхом вибіркового лазерного сканування пухлини, залежно від наявності флуоресценції / О.М. Чепурна, І.О. Штонь, С.В. Павлов, С.Є. Тужанський, А. Утрерас, В.С. Войцехович, В.Д. Попов, Є.В. Каптановський, В.В. Холін, М.Ф. Гамалія. // Фотобіол. Фотомед. – 2014. – № 3-4. – С. 109-114. (*Особистий внесок здобувача: визначення накопичення фотосенсибілізатора в пухлині in vivo та перевірка ефективності розробленого скануючого лазерного приладу для фотодинамічної терапії пухлин, аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформленні статті*)
7. Gamaleia N.F. Gold mining for PDT: Great expectations from tiny nanoparticles / N.F. Gamaleia, I.O Shton // Photodiagnosis Photodyn. Ther. – 2015. – № 12. – P. 221-231. (*Особистий внесок здобувача: збір та аналіз даних, участь у написанні та оформленні статті*).
8. Photodynamic therapy with laser scanning mode of tumor irradiation / O. Cherpurna, I. Shton, V. Kholin, V. Voytsehovich, V. Popov, S. Pavlov, N. Gamaleia, W. Wójcik, M. Zhassandykyzy // Proc. International Society for Optics and Photonics. Optical Fibers and Their Applications. – 2015. – Vol. 9816. – P. 1-4. (*Особистий внесок здобувача: визначення in vivo ефективності фотодинамічної терапії із використанням скануючого чи безперервного лазерного опромінення пухлин; аналіз отриманих результатів; участь у написанні та оформленні статті*).
9. Chlorin e6 combined with albumin nanoparticles as a potential composite photosensitizer for photodynamic therapy of tumors. / I.O. Shton, V.V. Sarnatskaya, I.V. Prokopenko, N.F. Gamaleia // Experimental oncology. — 2015. — Vol. 37, №4. — P. 250–254. (*Особистий внесок здобувача: спектральна характеристика композиту хлорину еб з наночастинами альбуміну; визначення цитотоксичності та фотодинамічної активності композиту in vitro; визначення взаємодії нанокмозиту з клітинами в культурі; аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті*).
10. Розробка і перша апробація нового варіанту методу фотодинамічної терапії пухлин із застосуванням лазерного скануючого пристрою / О.М. Чепурна, І.О. Штонь, В.С. Войцехович, В. В. Холін, Р.У. Ровіра, О. С. Камінський, М. Ф. Гамалія // Оптико-електронні інформаційно-енергетичні технології. – 2014. – Т. 27, № 1. – С. 128-131. (*Особистий внесок здобувача: апробація розробленого скануючого лазерного приладу для фотодинамічної терапії пухлин in vivo, аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформленні статті*)
11. Реалізація модифікованої фотодинамічної терапії з вибірконим лазерним скануванням пухлини залежно від наявності флуоресценції / О.М. Чепурна,

І.О. Штонь, С.В. Павлов, С.Є. Тужанський, А. Утрерас, В.С. Войцехович, В.Д. Попов, Є.В. Каптановський, В.В. Холін // Вісн. Національного університету України "Київський політехнічний інститут". Серія приладобудування. – 2015. – Т. 2, № 50. – С. 146-155. (*Особистий внесок здобувача: перевірка ефективності розробленого скануючого лазерного приладу для фотодинамічної терапії пухлин in vivo, аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформленні статті*).

12. Нанотехнологические подходы к повышению эффективности фотодинамической терапии опухолей (ФДТО): новые композитные фотосенсибилизаторы (ФС) на основе наночастиц благородных металлов / Н.Ф. Гамалея, Г.А. Долинский, И.В. Прокопенко, Е.Д. Шишко, И.А. Штонь, Т.С. Завадская, П.В. Ермак, А.Б. Щербаков, А.В. Усатенко, Е.Н. Лавриненко, В.В. Холін // Материалы VII съезда онкологов и радиологов стран СНГ, 5-7 сентября 2012. – Республика Казахстан, Астана, 2012. – С. 493.

13. Shton I.A. Nanocomposite of colloid gold with photosensitizer Fotolon as a potent drug in two-step cancer therapy / I.A. Shton, N.F. Gamaleia // Thesis of International Summer School for young scientists Nanotechnology: from fundamental research to innovations, August 26 - September 2, 2012. – Ukraine, Bukovel, 2012. – P. 19.

14. Штонь І.А. Усилення ефективності фотодинамічної терапії з допомогою наночастиць золота / І.А. Штонь // Матеріали XXXVIII Міжнародної науково-практичної конференції «Застосування лазерів в медицині та біології», 3-6 жовтня 2012 р. – Україна, Ялта, 2012. – С. 134-135.

15. Штонь І.О. Пошук нових схем застосування композиту наночастиць золота з фотосенсибілізатором для протипухлинної терапії / І.О. Штонь // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Youthnanobiotech-2012» 15-16 травня 2012 р. – Україна, Київ. – Укр. наук.-мед. молод. журн. – 2012. – № 2. – С. 123.

16. Шишко Е.Д. Вивчення фотодинамічної активності наноконкомпозитів порфіринових сполук з колоїдним золотом у досліджах *in vitro* та *in vivo*. / Е.Д. Шишко, І.О. Штонь. // Матеріали науково-практичного семінару з міжнародним участям «Експериментальні та клінічні аспекти фотодинамічної терапії», 15-16 березня, 2013 р. – Україна, Черкаси, 2013. – С. 93-94.

17. Gold nanoprisms as potential delivery agents for PDT photosensitizers / I. Shton, P. Yermak, A. Chevichalova, V. Estrela-Llopis, N. Gamaleia // Abstracts of The Second Ukrainian-Swedish Workshop «Translational oncology: old and new paradigms» May 20-21, 2013. – Ukraine, Kyiv. – Exp. Oncol. – 2013. – Vol. 35, № 2. – P. 147-148.

18. Фотодинамічна терапія експериментальних опухолей з використанням композиту Фотолон та нанопризм золота / І.А. Штонь, А.В. Чевичалова, В.Р. Естрела-Льопіс, Н.Ф. Гамалея // Матеріали XXXIX Міжнародної науково-практичної конференції «Застосування лазерів в медицині та біології», 22-24 травня, 2013 р. – Україна, Харків, 2013. – С. 135-136.

19. Штонь І.О. Наночастинки золота – агенти потенціювання протипухлинної ефективності фотодинамічної терапії / І.О. Штонь // Матеріали ІХ міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 16-19 квітня 2013 р. – Україна, Львів, 2013. – С. 462-463.

20. Штонь І.О. Взаємодія нанопризм золота з нормальними та малігнізованими лімфоцитами людини / І.О. Штонь, П.В. Єрмак, О.В. Чевичалова // Матеріали

науково-практичної конференції з міжнародною участю «Youth nanobiotech - 2013. Молодіжний форум з нанобіотехнологій», 22-23 травня, 2013 р. – Україна, Київ. – Укр. наук.-мед. молод. журн. – 2013. – № 3. – С. 49.

21. Фотодинамическая эффективность композита препарата «Фотолон» с нанопризмами золота / И.А. Штонь, А.В. Чевичалова, В.Р. Эстрела-Льопис, Н.Ф. Гамалея // Материалы XXXX Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», 2-5 октября 2013 г. – Украина, Ялта, 2013. – С. 168-169.

22. Штонь І.О. Застосування для фотодинамічної терапії фотосенсибілізатор-комплексаних наночастинок альбуміну / І.О. Штонь, В.В. Сарнацька, М.Ф. Гамалія // Материалы XXXXI Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», 28-31 мая, 2014г. – Украина, Харьков, 2014. – С. 43-44.

23. Апробація на експериментальній пухлинній моделі скануючого лазерного приладу для фотодинамічної терапії / О.М. Чепурна, І.О. Штонь, В.С. Войцехович, В.В. Холін, М.Ф. Гамалія // Материалы XXXXI Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», 28-31 мая, 2014г. – Украина, Харьков, 2014. – С. 40-42.

24. Shton I.A. Enhancement of chlorin e6-derived photosensitizer Photolon antitumor efficacy by its conjugation with gold nanoprisms / I.A. Shton, V.R. Estrela-Llopis, N.F. Gamaleia // Thesis of International Summer School «Nanotechnology: from fundamental research to innovations», August 23 - 30, 2014. – Ukraine, Yaremche-Lviv, 2014. – P. 60.

25. Підсилення фотодинамічного впливу на пухлинні клітини *in vivo* за допомогою золото-полімерних наноконкомпозитів / І.О. Штонь, Є.Д. Шишко, В.А. Чумаченко, Н.В. Куцевол, М.Ф. Гамалія // Матеріали XXXXII Міжнародної науково-практичної конференції «Застосування лазерів у медицині та біології», 11-13 грудня, 2014.– Україна, Яремче, 2014. – С. 117-118.

26. Сарнацкая В.В. Усиление фотодинамической активности фотосенсибилизатора Фотолона наночастицами сывороточного альбумина человека / В.В. Сарнацкая, И.О. Штонь, Н.Ф. Гамалея // Материалы научно-практической конференции «Внедрение современных инновационных технологий при малоинвазивных лазерных вмешательствах: клинические, экономические и технические аспекты», 28-29 ноября, 2014. – Украина, Черкассы. – Лазерная хирургия. – 2014. – С. 139-142.

27. Можливості моніторингу оксигенації пухлинної тканини методом спектроскопії зворотнього дифузного відбиття світла / О.М. Чепурна, І.О. Штонь, В.С. Войцехович, В.В. Холін, С.В. Павлов // Материалы XLIII Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», 27-30 мая, 2015. – Украина, Харьков, 2015. – С.153-155.

28. Branched copolymers dextran-graft-polyacrylamide as nanocarriers for delivery of gold nanoparticles and photosensitizers to tumor cells / V.A. Chumachenko, N.V. Kutsevol, I.O. Shton, E.D. Shishko, N.F. Gamaleia // Thesis of International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2015), 26-29 August 2015. – Ukraine, Lviv, 2015. – P. 381.

29. Визначення динаміки накопичення фотосенсибілізатора хлорину е6 в пухлині методом волоконно-оптичної флуоресцентної спектроскопії / О.М. Чепурна, І.О.

Штонь, В.С. Войцехович, В.В. Холін, С.В. Павлов // Материалы XLIII Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», 27-30 мая, 2015. – Украина, Харьков, 2015. – С.156-158.

30. Nanosystems for delivery of gold nanoparticles and photosensitizers to tumor cells / V.A. Chumachenko¹, I.O. Shton, E.D. Shishko, N.V. Kutsevol, N.F. Gamaleia // Thesis of Ukrainian-German symposium on physics and chemistry of nanostructures and on nanobiotechnology, 21-25 September, 2015. – Ukraine, Kyiv, 2015. – P. 254.

АНОТАЦІЯ

Штонь І.О. Ефективність застосування наночастинок золота за фотодинамічної протипухлинної терапії (експериментальне дослідження). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ – 2016.

Дисертація присвячена вивченню *in vitro* та *in vivo* композитів хлорину еб з наночастинками (НЧ) золота різних розмірно-геометричних параметрів (наносфер, сфероподібних НЧ, наноболонок, нанопризм та нанострижнів) у якості фотосенсибілізаторів при фотодинамічному впливі.

Показано, що при взаємодії хлорину еб зі сфероподібними НЧ золота відбувається батохромне зміщення довгохвильового максимуму спектра поглинання на 34 нм, а при взаємодії ФС з наносферами золота – на 9 нм. Здатність до генерації синглетного кисню нанокompозитом зі сфероподібними НЧ золота, а також композитами з нанопризмами та наноболонками золота у модельних розчинах обернено корелювала із зростанням вмісту НЧ золота. За допомогою темнопольної мікроскопії виявлено агрегацію нанопризм та наноболонок золота на поверхні клітин ліній Namalwa та МТ-4 і відсутність такої взаємодії з нормальними лімфоцитами людини. Встановлено збільшення фотодинамічної активності композитів хлорину еб з наносферами (15нм), нанопризмами та сфероподібними НЧ золота порівняно із вільним фотосенсибілізатором у 1,6-4,4 рази по відношенню до зляккісно трансформованих ліній клітин людини лімфоїдного походження. Виявлено, що композити хлорину еб з наносферами (15нм), стабілізованими полівінілпіролідом, нанопризмами та сфероподібними НЧ золота, стабілізованими декстран-поліакриламідним співполімером, мають високу протипухлинну фотодинамічну активність *in vivo*: найвища серед апробованих нанокompозитів протипухлинна фотодинамічна дія встановлена у мишей із перещепленою карциною Льюїс при застосуванні композиту зі сферичними та сфероподібними НЧ золота.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, наночастинки золота, хлорин еб, нанокompозит, синглетний кисень, клітинні лінії трансформованих лімфоцитів людини, карцинома мишей Льюїс.

АННОТАЦИЯ

Штонь И.А. Эффективность применения наночастиц золота при фотодинамической противоопухолевой терапии (экспериментальное исследование). – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.07 – онкология. – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев – 2016.

Диссертация посвящена изучению *in vitro* и *in vivo* композитов хлорина еб с наночастицами (НЧ) золота различных размерно-геометрических параметров (наносфер, сфероподобных НЧ, нанооболочек, нанопризм и наностержней) в качестве фотосенсибилизаторов при фотодинамическом влиянии.

При изучении физико-химических характеристик нанокompозитов и их компонентов установлено, что для большинства используемых в исследованиях НЧ золота максимум спектра поглощения расположен в зеленой области - 520-575 нм (исключая нанооболочки и наностержни), а флуоресценции - в области 580-600 нм. При взаимодействии хлорина еб со сфероподобными НЧ золота, стабилизированными декстран-полиакриламидным сополимером, происходит bathochromное смещение длинноволнового максимума поглощения красителя на 34 нм, а при взаимодействии ФС с наносферами золота – на 9 нм. Также показано, что компоненты композита хлорина еб взаимодействуют с НЧ альбумина, о чем свидетельствует смещение максимума флуоресценции ФС в более длинноволновую область (с 660 нм до 671 нм). При изучении в модельных растворах генерации синглетного кислорода нанокompозитами, содержащими сфероподобные НЧ золота, нанопризмы или нанооболочки золота, показано, что она обратно коррелирует с ростом содержания в композите НЧ золота.

При изучении темновой цитотоксичности НЧ золота *in vitro* установлено, что наносферы (15 нм), сфероподобные НЧ, наностержни (41x10 нм), нанопризмы и нанооболочки золота, а также НЧ альбумина в терапевтических концентрациях не приводят к гибели клеток линий МТ-4 и Namalwa. В то же время, наночастицы золота диаметром 5 нм ($IC_{50} = 20$ мкг/мл) и наностержни (62x25 нм), стабилизированные бромидом цетилтриметиламмония ($IC_{50} = 7,5$ мкг/мл) проявляли токсичность. Снижение токсического влияния НЧ золота на клетки показано при добавлении в инкубационную среду эмбриональной сыворотки телят.

При изучении взаимодействия НЧ золота с клетками обнаружено агрегацию нанопризм и нанооболочек золота на поверхности клеток линий Namalwa и МТ-4, и отсутствие такого взаимодействия с нормальными лимфоцитами человека. Показана способность моноцитов человека и перитонеальных макрофагов мыши фагоцитировать эти НЧ золота. Было также показано, что, в отличие от нативного альбумина, НЧ альбумина способны абсорбироваться на поверхности клеток МТ-4 с максимумом накопления через 4 часа инкубации.

При изучении *in vitro* фотодинамической активности композитов хлорина еб с наносферами (15 нм), нанопризмами и сфероподобными НЧ золота, стабилизированными декстран-полиакриламидным сополимером, установлено ее увеличение по сравнению с активностью свободного фотосенсибилизатора, в 1,6-4,4 раза. Наивысшую среди испытанных композитов чувствительность к фотодинамическому влиянию обнаружено у клеток линий Namalwa и МТ-4 после их

преинкубации со сферическими наночастицами золота ($d=15$ нм), стабилизированными поливинилпирролидоном (рост гибели клеток по отношению к активности свободного красителя в 3,0 и 4,4 раза, соответственно).

Противоопухолевая фотодинамическая эффективность наноконпозитов, проявивших высокую фотосенсибилизацию *in vitro* была подтверждена на мышах с перевитой карциномой легких Льюис. Самым активным (уменьшение объема опухоли до двух раз) оказался композит со сферическими НЧ золота. Показано антиметастатическое действие ФДТ с использованием хлорина е6 ($p<0,05$) и тенденцию к ее дополнительному росту при комплексировании ФС со сфероподобными НЧ золота.

Использование композита хлорина е6 с плазмонно-активными наностержнями золота *in vitro* позволило повысить эффективность фотодинамического воздействия (облучение с $\lambda=658$ нм), путем его комбинации с фототермическим влиянием (облучение с $\lambda=810$ нм).

Охарактеризовано модифицирующее действие нативного сывороточного альбумина человека и альбуминовых наночастиц на противоопухолевую фотодинамическую активность хлорина е6 и его наноконпозитов *in vitro*. Показано, что гибель клеток после фотодинамического воздействия повышается с ростом процентного состава сшитых аминокислот в НЧ альбумина, входящих у композит.

Применение сканирующего режима лазерного облучения и системы регистрации флуоресценции ФС в опухоли с последующим облучением только тех ее зон, которые накапливают краситель, обуславливала одинаковую противоопухолевую эффективность сканирующего и непрерывного режимов, при уменьшении дозы сканирующего облучения в среднем в 45 раз.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, наночастицы золота, хлорин е6, наноконпозит, синглетный кислород, клеточные линии трансформированных лимфоцитов человека, карцинома мышей Льюис.

SUMMARY

Shton I.O. Efficacy of gold nanoparticles application for anticancer photodynamic therapy (experimental research). – Manuscript.

Thesis for the candidate of biological sciences degree in speciality 14.01.07 – oncology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv – 2016.

The thesis is devoted to the *in vitro* and *in vivo* study of chlorin e6 composites with gold nanoparticles (NPs) of different geometry and aspect ratios (nanospheres, spherical-like nanoparticles, nanoshells, nanoprisms and nanorods) as photosensitizers for antitumor photodynamic therapy.

It was shown that the chlorin e6 interaction with spherical-like gold NPs led to bathochromic shift of its long wavelength absorption maximum of about 34 nm, and chlorine e6 interaction with gold nanospheres – of 9 nm. Singlet oxygen generation rate of photosensitizer composites with spherical-like gold NPs, gold nanoshells and nanoprisms in model solutions inversely correlated with gold content in composite. Gold nanoprisms and nanoshells aggregated on the surface of cell lines Namalwa and MT-4 and did not interact with normal human lymphocytes. *In vitro* photodynamic activity of chlorin e6 composites with gold nanospheres (15nm), nanoprisms and spherical-like gold NPs

increased 1,6-4,4 times comparatively to free photosensitizer activity. It was revealed that chlorine e6 composites with nanospheres (15nm), spherical-like gold NPs and nanoprisms possessed high antitumor photodynamic activity *in vivo* on mice with transplanted Lewis lung carcinoma. The highest antitumor photodynamic activity among tested preparations was established with the use of composite photosensitizers that comprised spherical or spherical-like gold NPs.

Key words: photodynamic therapy, gold nanoparticles, chlorin e6, nanocomposite, singlet oxygen, transformed human lymphocyte cell lines, Lewis lung carcinoma.