

В. И. Иванова-Радкевич<sup>1, 2</sup>, В. М. Негримовский<sup>1</sup>, С. В. Барканова<sup>1</sup>,  
Е. А. Макарова<sup>1</sup>, В. Ф. Донягина<sup>1</sup>, Т. В. Плетенева<sup>2</sup>

## БИОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ

<sup>1</sup> ФГУП “ГНЦ “НИОПИК”, Москва, Россия;

<sup>2</sup> РУДН, Москва, Россия

Работа посвящена биокинетическим исследованиям фотодинамической активности новых фотосенсибилизаторов: производного тетраазахлорина — 2,3,3а,21а-тетрагидро-2-метил-3а,8,13,18-тетрафенил-5,10,15,20-тетрааза-1Н,22Н,24Н-пирроло[3,4-*b*]порфина, 2 дифторборильных замещенных комплексов 3,3'-дифенилазидиизоиндолилметенов: N,N-дифторборил-N-[3-(4-*трет*-бутилфенил)-2Н-изоиндол-1-ил]-N-[3-(4-*трет*-бутилфенил)-1Н-изоиндол-1-илиден]амина и N,N-дифторборил-1-[3-(4-метоксифенил)-2Н-изоиндол-1-ил]-N-[3-(4-метоксифенил)-1Н-изоиндол-1-илиден]амина, и сульфанилзамещенного фталоцианина — 1,8,15,22-тетракис(*трет*-бутилсульфанил)-29Н,31Н-фталоцианина. Установлена их выраженная фотодинамическая активность в отношении солидных форм асцитной карциномы Эрлиха и саркомы S-37 у мышей при внутривенном введении мицеллярных суспензий исследуемых соединений в водных растворах Кремофора EL и Проксанола 268. Сравнение констант скорости роста опухоли и периода достижения ее критического объема в опытных и контрольных группах свидетельствует о высокой фотодинамической активности синтезированных фотосенсибилизаторов.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, биокинетические исследования *in vivo*, опухоль Эрлиха, саркома S-37, тетраазахлорин, дифенилазидиизоиндолилметен, фталоцианин.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — относительно новое направление противоопухолевой терапии, основанное на избирательном накоплении в опухолевой ткани фотосенсибилизатора, который при локальном воздействии света определенной длины волны способен генерировать образование цитотоксических агентов, вызывающих повреждение структурных элементов опухолевой ткани [1, 2]. Успешное применение метода ФДТ для лечения злокачественных новообразований стимулировало поиск новых фотосенсибилизаторов с улучшенными свойствами [3]. Наиболее перспективны для ФДТ фотосенсибилизаторы с максимумом поглощения в области так называемого “терапевтического окна” (700 – 800 нм) с минимальным поглощением биологической ткани, что обеспечивает более глубокое проникновение в нее излучения и большую эффективность терапии [4, 5].

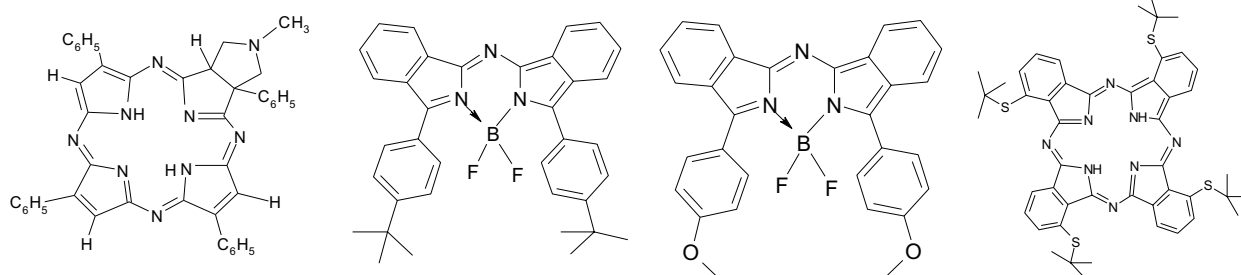
Цель работы — биокинетическая оценка противоопухолевой эффективности ФДТ с новыми фотосенсибилизаторами [6 – 8].

### Материалы и методы

Объектом исследования являлись образцы синтезированных во ФГУП “ГНЦ “НИОПИК” новых фотосенсибилизаторов [6 – 8] — производного тетраазахлорина (I), 2 дифторборильных замещенных комплексов 3,3'-дифенилазидиизоиндолилметенов (II и III) и сульфанилзамещенного фталоцианина (IV) (рис. 1).

Для проведения экспериментов *in vivo* были использованы мицеллярные растворы фотосенсибилизаторов в 4 % водных эмульсиях Кремофора EL и Проксанола 268. Все солубилизаты интенсивно поглощали свет в длинноволновой области видимого спектра (700 – 740 нм).

Изучение фотодинамической активности проводили на мышцах-самках линии СВА. В качестве экспериментальной опухолевой модели использовали солидные формы асцитной карциномы Эрлиха и саркомы S-37. Для прививки солидной опухоли разведенную асцитную жидкость, взятую от мыши-донора на 7-й день роста опухоли и содержащую  $\approx 5 \cdot 10^6$  опухолевых клеток, имплантировали подкожно на наружную поверхность бедра нижней правой конечности. На 7-й день роста солидной опухоли животных сенсибилизировали, т.е. однократно струйно в хвостовую вену вводили исследуемые солубилизаты. Облучение проводили на аппарате терапевтическом онкологическом для ФДТ АТО-1 (НПО “Полус”). С помощью светофильтров формировали спектр излучения, соответствующий максимумам поглощения исследуемых фотосенсибилизаторов в области 700 – 740 нм. Облучение сенсибилизированной опухоли проводили дистанционно через 0,5 или 24 ч после сенсибилизации. Плотность мощности облучения изменялась от 200 до 250 мВт/см<sup>2</sup>, световая доза — от 120 до 150 Дж/см<sup>2</sup>. Число животных в опытной и контрольной группах в среднем составляло 10 и 15 соответственно. Наблюдение за животными продолжалось в течение 20 – 25 сут



**Рис. 1.** Структурные формулы исследованных соединений: I — 2,3,3a,21a-тетрагидро-2-метил-3a,8,13,18-тетрафенил-5,10,15,20-тетрааза-1H,22H,24H-пирроло[3,4-b]порфин; II — N,N-дифторборил-N-[3-(4-*tert*-бутилфенил)-2H-изоиндол-1-ил]-N-[3-(4-*tert*-бутилфенил)-1H-изоиндол-1-илиден]амин; III — N,N-дифторборил-1-[3-(4-метоксифенил)-2H-изоиндол-1-ил]-N-[3-(4-метоксифенил)-1H-изоиндол-1-илиден]амин; IV — 1,8,15,22-тетракис(*tert*-бутилсульфанил)-29H,31H-фталочианин.

после лечения. День облучения считали начальным днем фотодинамического воздействия.

Контролем для оценки эффективности какого-либо воздействия на опухоль являлись нелеченые мыши-опухоленосители. Кроме того, проверялось влияние на рост опухоли фотосенсибилизаторов в максимальных из исследованных доз и светового излучения в используемых режимах.

Оценку противоопухолевого эффекта проводили по динамике изменения объема опухоли и значениям торможения роста опухоли (ТРО, %). Биологически значимым считали  $\text{ТРО} \geq 50\%$ . Объем опухоли ( $\text{см}^3$ ) рассчитывали по формуле (1):

$$V = \frac{\pi}{6} D_1 D_2 D_3, \quad (1)$$

где  $D_1$ ,  $D_2$  и  $D_3$  — 3 взаимно перпендикулярных диаметра опухоли (см).

Значения ТРО (%) рассчитывали по формуле (2):

$$\text{ТРО}(\%) = \left(1 - \frac{V_i}{V_k}\right) 100\%, \quad (2)$$

где  $V_i$  — объем опухоли ( $\text{см}^3$ ) у мыши в опытной группе,  $V_k$  — среднее значение объемов опухоли ( $\text{см}^3$ ) в контрольной группе нелеченых мышей-опухоленосителей.

Объемную долю опухоли от исходного объема ( $\alpha_V$ , %) вычисляли по формуле (3):

$$\alpha_V(\%) = \frac{V_i}{V_0} 100\%, \quad (3)$$

где  $V_i$  — объем опухоли в контрольный срок наблюдения;  $V_0$  — объем опухоли до облучения.

Определяли константы скорости первого порядка по прямым в полулогарифмических координатах  $\ln \alpha_V - t$  ( $r^2 \geq 0,9$ ), по которым оценивали скорость роста опухоли в разных группах животных.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета Statistica 6,0 (StatSoft, США). Для каждой выборки рассчитывали среднегрупповое значение параметра и значение стан-

дартного отклонения SD. Критерием сравнения отдельных выборок с целью оценки эффективности различных режимов воздействия на опухоль был выбран непараметрический критерий Манна-Уитни ( $p = 0,05$ ).

### Результаты и их обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что ни введение фотосенсибилизаторов в максимальных из исследованных доз, ни проведение облучения несенсибилизированных опухолей не приводило к биологически значимому торможению роста экспериментальных опухолей. Значения ТРО для указанных групп составляли  $\leq 21\%$  в течение периода наблюдения. Была обнаружена высокая фотодинамическая активность I в 4 % водном Кремофоре EL в отношении опухоли Эрлиха у мышей при введении в дозах 6,0, 3,0 и 1,0 мг/кг за 24 ч и в дозе 0,5 мг/кг за 0,5 ч до облучения. Значения ТРО в указанных группах составили 88–91, 77–95, 54–59 и 78–91 % соответственно.

Анализ биокинетических параметров роста опухоли показал, что во всех перечисленных режимах проведения ФДТ с I кинетика роста опухоли имела двухфазный характер. На начальных сроках наблюдения (10–15 сут) отмечено прекращение роста и частичная регрессия опухоли с уменьшением ее среднегруппового объема: константы скорости роста ( $k$ ,  $\text{сут}^{-1}$ ) имели значения  $(-0,168) \text{сут}^{-1}$ ,  $(-0,090 \pm 0,016) \text{сут}^{-1}$  и  $(-0,003 \pm 0,005) \text{сут}^{-1}$  при введении I в дозах 6,0, 3,0 и 1,0 мг/кг соответственно. Последующий рост опухоли характеризовался интервалом скорости в зависимости от дозы:  $k = (0,080 \pm 0,015) \div (0,155 \pm 0,012) \text{сут}^{-1}$ , тогда как для контрольной группы  $k = (0,090 \pm 0,004) \text{сут}^{-1}$ .

Выявленный временной показатель — 10–15-й день после первичной ФДТ, когда после заметного торможения начинался вторичный рост опухоли — свидетельствует о необходимости повторного проведения ФДТ для повышения эффективности лечения.

Кинетика роста солидной формы саркомы S-37 у мышей (рис. 2) демонстрирует высокую фотодинамическую активность мицеллярных растворов II, III и IV в 4 % водном Проксаноле 268. При этом фотодинами-

ческая активность II в дозах 5,0 и 1,0 мг/кг в показателях ТРО составила 86 – 98 и 64 – 81 % соответственно. Зарегистрировано биологически значимое подавление роста опухоли при введении III в дозах 7,0 и 1,4 мг/кг — ТРО равен 51 – 83 и 77 – 86 % соответственно. Обнаружена высокая противоопухолевая эффективность ФДТ с IV (доза 9,0 мг/кг, облучение через 24 ч после введения фотосенсибилизатора) ТРО  $\geq 88$  %.

В течение 10 сут после проведения ФДТ с II в дозе 5,0 мг/кг наблюдали частичную регрессию опухоли с уменьшением среднегруппового объема:  $k = -(0,139 \pm 0,081) \text{ сут}^{-1}$ . Но после 10 сут отмечен вторичный рост опухоли со скоростью, близкой к контрольной группе:  $k_{\text{оп}} = (0,236 \pm 0,092) \text{ сут}^{-1}$  и  $k_{\text{к}} = (0,266 \pm 0,021) \text{ сут}^{-1}$  соответственно.

Достижение терминальной фазы при росте опухоли в контроле происходит приблизительно на 10 сут при достижении так называемого “критического” объема опухоли. Экстраполируя линейную зависимость “ $\ln \alpha_V - t$ ” для роста опухоли в опытных группах, обнаружили, что для II в дозе 5,0 мг/кг время достижения критического объема значительно увеличивается и составляет 27 сут, что в 2,7 раза продолжительнее, чем в контрольной группе.

При снижении дозы II до 1,0 мг/кг на протяжении всего периода наблюдения было отмечено подавление роста опухоли без уменьшения ее среднего объема:  $k_{\text{оп}} = (0,062 \pm 0,016) \text{ сут}^{-1}$ ,  $k_{\text{к}} = (0,266 \pm 0,021) \text{ сут}^{-1}$  (см. рис. 2).

Аналогичная картина наблюдается и для III (доза 7,0 мг/кг). В течение 10 сут после проведения ФДТ наблюдается значительное подавление роста опухоли  $k_{\text{оп}} = (0,034 \pm 0,008) \text{ сут}^{-1}$ . Скорость последующего роста опухоли была ниже по сравнению с контрольной группой:  $k_{\text{оп}} = (0,200 \pm 0,025) \text{ сут}^{-1}$ ,  $k_{\text{к}} = (0,256 \pm 0,022) \text{ сут}^{-1}$ .

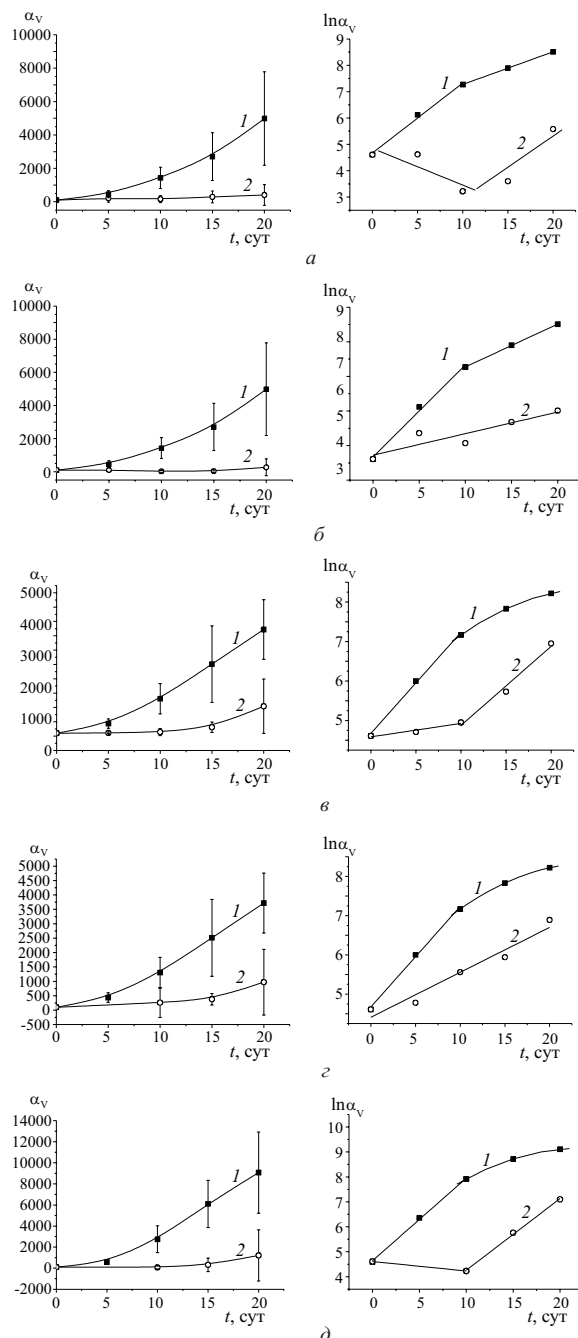
Для III при дозе 1,4 мг/кг скорость роста снижалась:  $k_{\text{оп}} = (0,124 \pm 0,014) \text{ сут}^{-1}$ , но в меньшей степени, чем для дозы 7,0 мг/кг. При этом период достижения критического объема опухоли возрастал в 2,2 – 2,4 раза по сравнению с контролем.

Для IV в дозе 9,0 мг/кг в течение 10 сут также наблюдали отрицательную корреляцию между сроком наблюдения и среднегрупповым объемом опухоли. Последующий рост опухоли происходил с достоверно меньшей скоростью по сравнению с контрольной группой:  $k_{\text{оп}} = (0,287 \pm 0,010) \text{ сут}^{-1}$ ,  $k_{\text{к}} = (0,331 \pm 0,011) \text{ сут}^{-1}$ . Время достижения критического объема опухоли превысило контроль в 2,3 раза.

Таким образом, анализ биокинетических параметров роста опухоли при проведении ФДТ с новыми фотосенсибилизаторами подтвердил высокую фотодинамическую активность исследуемых соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Ф. Странадко, *Лазерная мед.*, **6**(1), 4 – 8 (2002).



**Рис. 2.** Кинетика роста опухолей в арифметических ( $\alpha_V - t$ ) и полулогарифмических ( $\ln \alpha_V - t$ ) координатах для контрольной группы мышей-опухоленосителей (1) и в опытных группах после фотодинамической терапии (2): а — II в дозе 5,0 мг/кг за 24 ч до ФДТ; б — II в дозе 1,0 мг/кг за 24 ч до ФДТ; в — III в дозе 7,0 мг/кг за 0,5 ч до ФДТ; г — III в дозе 1,4 мг/кг за 0,5 ч до ФДТ; д — IV в дозе 9,0 мг/кг за 24 ч до ФДТ

- Z. Huang, *Technol. Cancer Res. Treat.*, **4**(3), 283 – 293 (2005).
- D. Y. Xu, *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, **4**, 13 – 25 (2007).
- A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, № 1, 279 – 293 (2004).
- A. Juzeniene and J. Moan, *Photodiagn. Photodynam. Ther.*, № 4, 3 – 11 (2007).
- С. В. Барканова, Г. И. Быстрицкий, Г. Н. Ворожцов и др., *Тетраазахлорины как фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии*, Патент РФ 2 278 119 (2006), *Бюл. изобрет.*, № 17 (2006).

7. С. В. Барканова, К. А. Волков, Г. Н. Ворожцов и др., *Алкил-тиозамещенные фталоцианины, их лекарственные формы и способ проведения фотодинамической терапии*, Патент РФ 2 340 615 (2008), *Бюл. изобрет.*, № 34 (2008).
8. Заявка № 2008100241 от 14.01.2008 г. на Патент "N,N'-дифторборильные комплексы N-(3-арил-2H-изоиндол-1-ил)-N-

(3-арил-1H-изоиндол-1-имиден)аминов и способ их получения".

Поступила 30.03.09

## BIOKINETIC INVESTIGATION OF THE PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF NEW PHOTOSENSITIZERS

V. I. Ivanova-Radkevich<sup>1</sup>, V. M. Negrimovskii<sup>1</sup>, S. V. Barkanova<sup>1</sup>, E. A. Makarova<sup>1</sup>, V. F. Donyagina<sup>1</sup>, and T. V. Pleteneva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Organic Semiproducts and Dyes, State Scientific Center, Moscow, 123995 Russia

<sup>2</sup> Department of Medicine, Russian University of Peoples Friendship, Moscow, 117198 Russia

The results of *in vivo* biokinetic investigation of the photodynamic activity of a series of new photosensitizers, including a tetraazachlorine derivative (2,3,3a,21a-tetrahydro-2-methyl-3a,8,13,18-tetraaryl-5,10,15,20-tetraaza-1H,22H,24H-pyrrolo[3,4-b]porphine), two difluoroboryl-substituted complexes of diphenylazadiisindolymethene (N,N-difluoroboryl-N-[3-(4-tert-butylphenyl)-2H-isoindol-1-yl])-N-[3-(4-tert-butylphenyl)-1H-isoindol-1-ylidene]amine and N,N-difluoroboryl-1-[3-(4-methoxyphenyl)-2H-isoindol-1-yl])-N-[3-(4-methoxyphenyl)-1H-isoindol-1-ylidene]amine), and sulfanyl-substituted phthalocyanine (1,8,15,22-tetrakis(tert-butylsulfanyl)-29H,31H-phthalocyanine) are reported. Upon intravenous injection in the form of micellar suspensions in 4% aqueous solutions of Cremophor EL and Proksanol 268, the compounds under consideration exhibit pronounced photodynamic activity in mice bearing solid form of Ehrlich tumor and sarcoma S-37. A comparison of the tumor growth rate and the time to attaining a critical tumor volume in the test and control groups shows evidence for a high photodynamic activity of the new photosensitizers.

**Key words:** Photodynamic therapy, photosensitizer, biokinetic study *in vivo*, Ehrlich tumor, sarcoma S-37, tetraazachlorine, diphenylazadiisindolymethene, phthalocyanine.