

ИЗУЧЕНИЕ ТКАНЕВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТОВ АМИНОАМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА e_6 С НАНОЧАСТИЦАМИ БОРА

© 2016 г. А.Б. Воловецкий*, Н.Ю. Шилягина*, В.В. Дуденкова*, С.О. Пасынкова**, А.А. Игнатова**** *****, А.Ф. Мионов**, М.А. Грин**, В.И. Брегадзе***, А.В. Феофанов**** *****, И.В. Балалаева*, А.В. Масленникова* *****

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23;

**Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86;

***Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28;

****Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*****Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1;

*****Нижегородская государственная медицинская академия, 603005, Нижний Новгород, пл. Мина и Пожарского, 10/1

E-mail: voloveckiy91@gmail.com

Поступила в редакцию 09.11.15 г.

Бор-нейтронозахватная терапия, основанная на способности изотопа ^{10}B к захвату тепловых нейтронов, является одной из наиболее перспективных методик лучевой терапии. Высокое содержание и селективность накопления ^{10}B в опухолевой ткани являются наиболее важными условиями ее успешного проведения. Целью данного исследования были оценка биораспределения конъюгатов бис-дикарболлида кобальта с аминоксидными производными хлорина e_6 . Эксперименты проводились на мышах линии Balb/c с перевитой карциномой мышей СТ-26. Борсодержащие конъюгаты вводились в хвостовую вену в дозе 10 мг/кг. Накопление препаратов изучали методом лазерной сканирующей микроскопии. Возбуждение осуществлялось на длине волны 514 нм, регистрация сигнала – в диапазоне 560–710 нм с шагом 10 нм. Для оценки количества конъюгата рассчитывали интенсивность сигнала флуоресценции в изученных образцах. Через 3 ч после введения высокий уровень сигнала наблюдался в печени, селезенке и легких. Контраст накопления опухоль/мышца составил ~3. Исследование продемонстрировало перспективность использования борных производных хлорина e_6 для целей бор-нейтронозахватной терапии.

Ключевые слова: бор-нейтронозахватная терапия, хлорин e_6 , фотосенсибилизатор, лазерная сканирующая микроскопия.

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ), основанная на поглощении тепловых нейтронов атомами ^{10}B с последующим возникновением ядерной реакции, является одним из наиболее перспективных методов лучевой терапии злокачественных новообразований [1]. Для успешной реализации БНЗТ в клинической практике необходимо, чтобы разрабатываемые препара-

ты отвечали целому ряду требований [2,3], в том числе:

– селективное накопление препарата в опухоли, при соотношении концентрации ^{10}B в опухоли по отношению к нормальной ткани не менее, чем 3:1;

– достижение концентрации изотопа ^{10}B в опухоли, соответствующей 10^9 атомов в одной клетке или 20–35 мкг/г ткани опухоли;

– сохранение постоянной концентрации ^{10}B в опухоли в течение процедуры облучения;

Сокращение: БНЗТ – бор-нейтронозахватная терапия.

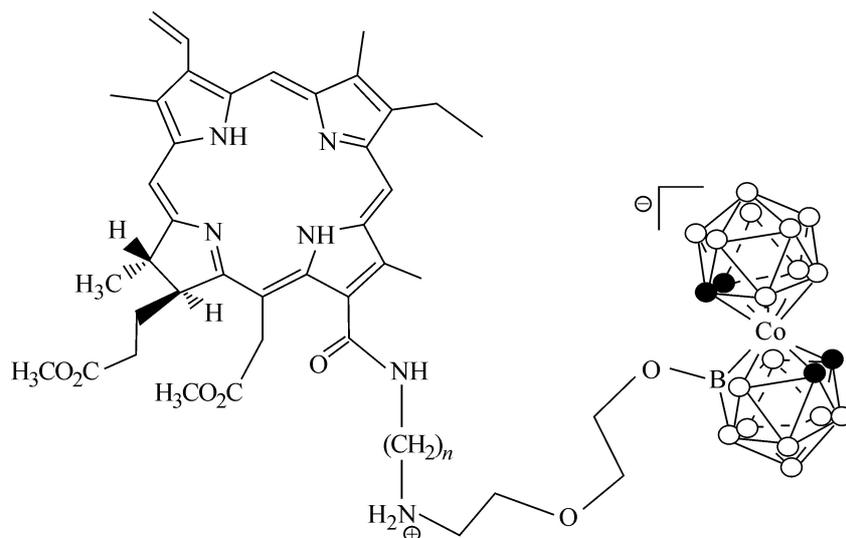


Рис. 1. Структурная формула конъюгатов бис-дикарболлида кобальта с аминоамидными производными хлорина e_6 (длина линкеров $n = 6; 8$). Черные шарики – C–H, белые шарики – B–H.

- низкая токсичность;
- возможность контроля содержания ^{10}B в тканях методами *in vivo*.

В качестве агентов, обеспечивающих направленную доставку бора в опухоль, исследуются предшественники нуклеиновых кислот, аминокислоты и пептиды, углеводы, акридины, различные полиамины, а также порфирины и фталоцианины [1–6]. В разработке борсодержащей части конъюгатов исследователи продвинулись от молекулярных групп, содержащих единственный атом ^{10}B , до разнообразных наночастиц, полиэдрических гидридов бора, содержащих 9 и более атомов ^{10}B , и нанотрубок нитрида бора [7–9].

Единственные разрешенные для клинического применения соединения (L-*p*-дигидроксипорфирилфенилаланин (boronophenylalanine, BPA) и динатриевая соль меркаптоундекагидро-κ-озо-додекабората (borocaptate, BSH)) не полностью отвечают данным критериям, поскольку обладают невысокой селективностью накопления в опухолевой ткани [3,9–11]. Таким образом, до сих пор не существует препарата, который бы полностью отвечал всем вышеуказанным требованиям.

В качестве перспективных агентов для БНЗТ рассматриваются борсодержащие производные порфиринов и их аналогов. Данный класс соединений представляет собой связанные через линкеры различной природы хлорин и борный полиэдр [13]. Порфирины и их борные производные представляют собой препараты «двойного назначения»: агенты доставки бора и фотосенсибилизаторы для фотодинамической те-

рапии. Представители данного класса соединений способны эффективно накапливаться в опухолевых клетках [14], а использование карборанов в качестве борного элемента в молекуле дает возможность увеличить концентрацию изотопа в опухоли и обеспечивает стабильность борной части [15].

Необходимо отметить, что исследование накопления борсодержащих соединений в опухолевой и нормальных тканях представляет собой достаточно сложную задачу, поскольку ^{10}B не является радиоактивным изотопом и не может быть использован в качестве радиоактивной метки. Способность конъюгатов порфиринов с наночастицами бора флуоресцировать открывает уникальную возможность прижизненного исследования процессов их распределения, накопления и выведения из организма методами оптического имиджинга [14,16].

Целью исследования было сравнение распределения конъюгатов наночастиц бора с аминоамидными производными хлорина e_6 с разной длиной аминоалкиламидного линкера в организме животных-опухоленосителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованные соединения. В работе исследованы конъюгаты бис-дикарболлида кобальта с аминоамидными производными хлорина e_6 (длина аминоалкиламидного линкера 6 и 8 атомов углерода), структура которых представлена на рис. 1 [17].

Животные и опухолевая модель. Эксперименты *in vivo* проводились с разрешения ло-

кального этического комитета. Исследования выполнены на мышах линии Balb/c (самки, масса 18–20 г), полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино, Московская область). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом дне. Для получения экспериментальных опухолей использовали линию мышинной карциномы толстой кишки СТ-26 (номер по каталогу ATCC® CRL-2638™). Выбор экспериментальной модели СТ-26 был обусловлен высокой васкуляризацией формирующейся опухоли [18].

Культивирование клеток проводили в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (NuClone, США), при 37°C и 5% CO₂, в культуральных флаконах площадью 75 см². На каждом этапе пассирования клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина-версена (ПанЭко, Россия). Субкультивирование выполняли через двое–трое суток по достижении культурой восьмидесятипроцентной конфлюентности [19].

Для получения экспериментальных опухолей животным подкожно в область бедра вводили суспензию 1 млн клеток СТ-26 в 100 мкл 10 мМ фосфатно-солевого буфера (ПанЭко, Россия). Эксперимент начинали на 9–10-е сутки после инъекции, когда диаметр опухолевого узла достигал 9 мм.

Конъюгаты растворяли в эмульсии кремофора EL и вводили в кровотоки в дозе 10 мг/кг (в каждой группе по три животных) через хвостовую вену. В контрольной группе (три животных) соединения не вводили. Через три часа после введения борсодержащих конъюгатов животных умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Для последующего микроскопического исследования получали образцы следующих органов и тканей: опухоль, поперечнополосатая мышца, кожа, печень, почки, селезенка, тонкий кишечник.

Приготовление образцов и микроскопическое исследование. Опухоль целиком препарировалась из окружающей ткани и рассекалась по продольной оси в плоскости, перпендикулярной поверхности бедра. Разрез мышцы бедра производили вдоль направления волокон, разрез почки – по сагиттальной плоскости органа. Продольные срезы печени, легкого и селезенки делали в толще этих органов. Микроскопический анализ образцов проводили непосредственно после их получения, без процедуры фиксации или заморозки.

Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Axiovert 200M LSM510 META (Carl Zeiss, Гер-

мания) с использованием масло-иммерсионного объектива Plan-Apochromat с увеличением 40× и числовой апертурой 1.3. Латеральное разрешение изображений составило 1024×1024 пикселя, размер пикселя 0,22 мкм. Флуоресценцию конъюгата возбуждали на длине волны 514 нм, сигнал регистрировали с помощью спектрального модуля META в диапазоне 560–710 нм с шагом 10 нм. Спектральная информация позволяла идентифицировать сигнал конъюгатов на фоне автофлуоресценции тканей. Все изображения получены при идентичных условиях.

Статистическая обработка данных. С помощью программного обеспечения микроскопа из полученного спектрального изображения выделяли канал, соответствующий принимаемому сигналу флуоресценции в диапазоне 650–693 нм. Используя программу ImageJ (версия 1.47v, National Institute of Health, США), определяли средний уровень флуоресцентного сигнала по площади каждого изображения исследованных образцов опухоли и нормальных тканей. Для каждого образца нормальных тканей анализировали от трех до пяти полей зрения. При изучении образцов опухолевой ткани случайным образом выбирали поля зрения из центральных и периферических участков опухолевого узла (не менее пяти полей зрения для каждого образца). Данные представлены как среднее значение сигнала в условных единицах ± стандартное отклонение для малых выборок. При сравнении значений использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий Даннета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые соединения характеризуются интенсивным поглощением в видимой области спектра с максимумами на длинах волн 405, 500 и 665 нм, что близко по значениям к максимумам полос поглощения хлорина e₆. Максимум флуоресценции регистрируется на длине волны 670 нм.

Ранее в экспериментах на культурах клеток аденокарциномы легкого человека было показано интенсивное поглощение конъюгатов хлорина e₆ с разной длиной линкера. Коэффициент накопления клетки/среда для конъюгата с линкером $n = 6$ достигал ~80, при этом существенное влияние на величину коэффициента оказывала длина аминоалкил-амидного линкера [14,15]. Этот результат позволяет предположить возможность достижения терапевтической дозы, необходимой для проведения БНЗТ, при высоком контрасте с нормальной тканью и низкой системной токсичностью *in vivo*.

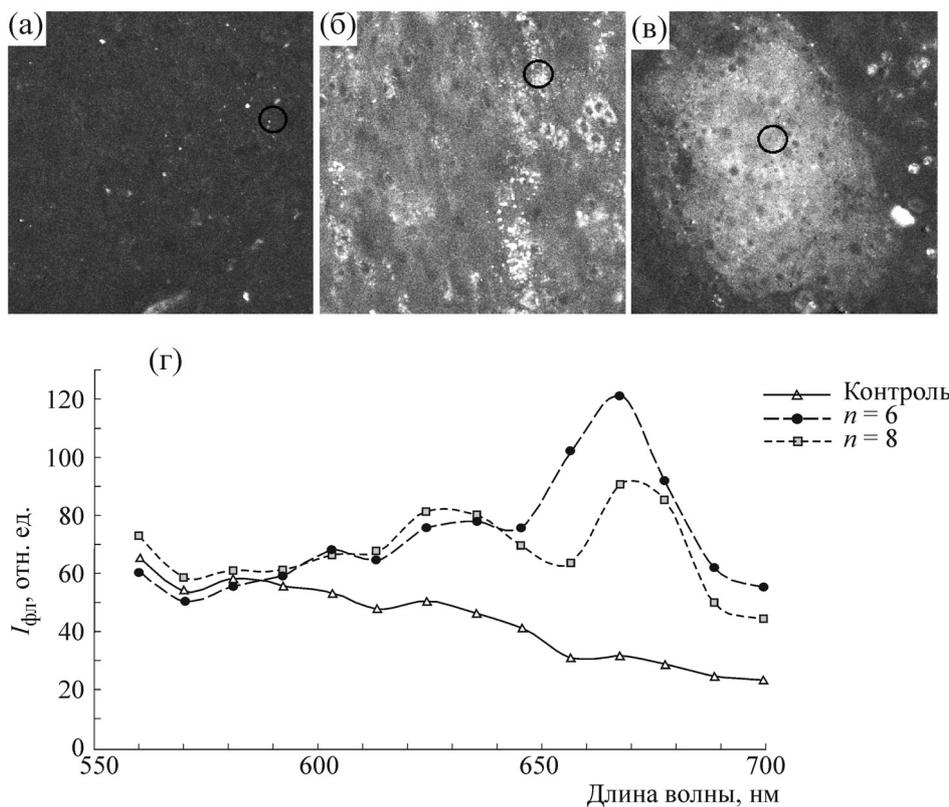


Рис. 2. Распределение флуоресценции в опухолевых тканях животных до (а) и через три часа после введения конъюгатов с линкерами $n = 6$ (б) и $n = 8$ (в) в дозе 10 мг/кг. Изображения получены методом конфокальной микроскопии на основе флуоресценции в диапазоне 650–693 нм. (г) – Спектры флуоресценции выделенных участков. Размер изображений – 225 × 225 мкм.

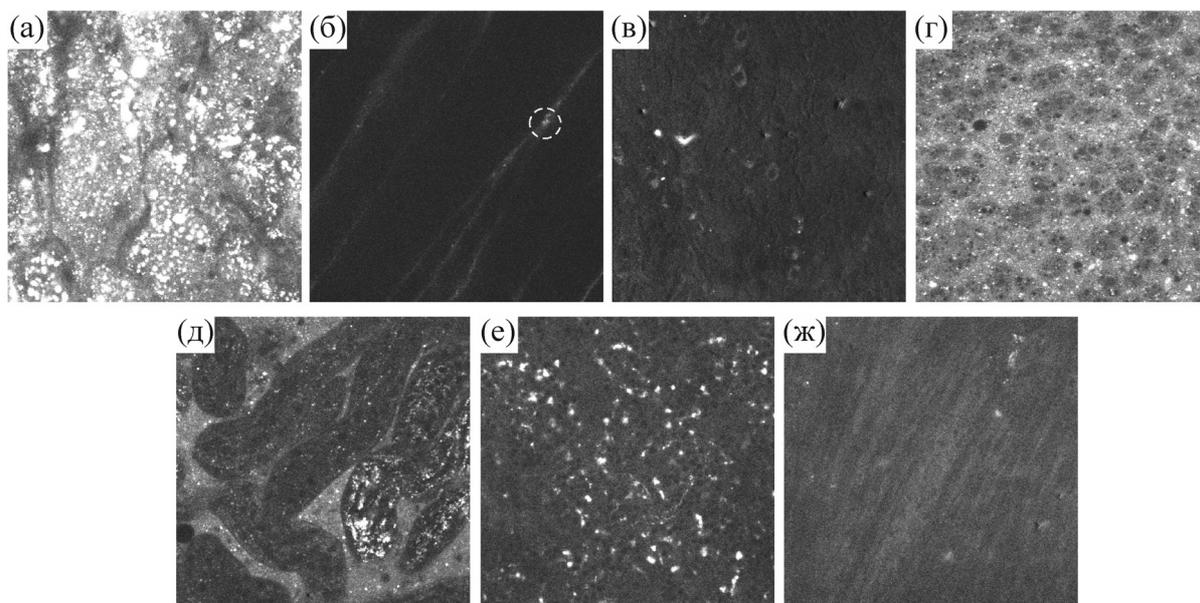


Рис. 3. Флуоресцентные изображения образцов тканей животного через три часа после введения конъюгата с линкером $n = 6$: (а) – опухоль; (б) – мышцы, пунктиром выделен сосуд; (в) – кожа; (г) – печень; (д) – почки; (е) – селезенка; (ж) – стенка тонкого кишечника. Изображения получены методом конфокальной микроскопии на основе флуоресценции в диапазоне 650–693 нм. Размер изображений – 225 × 225 мкм.

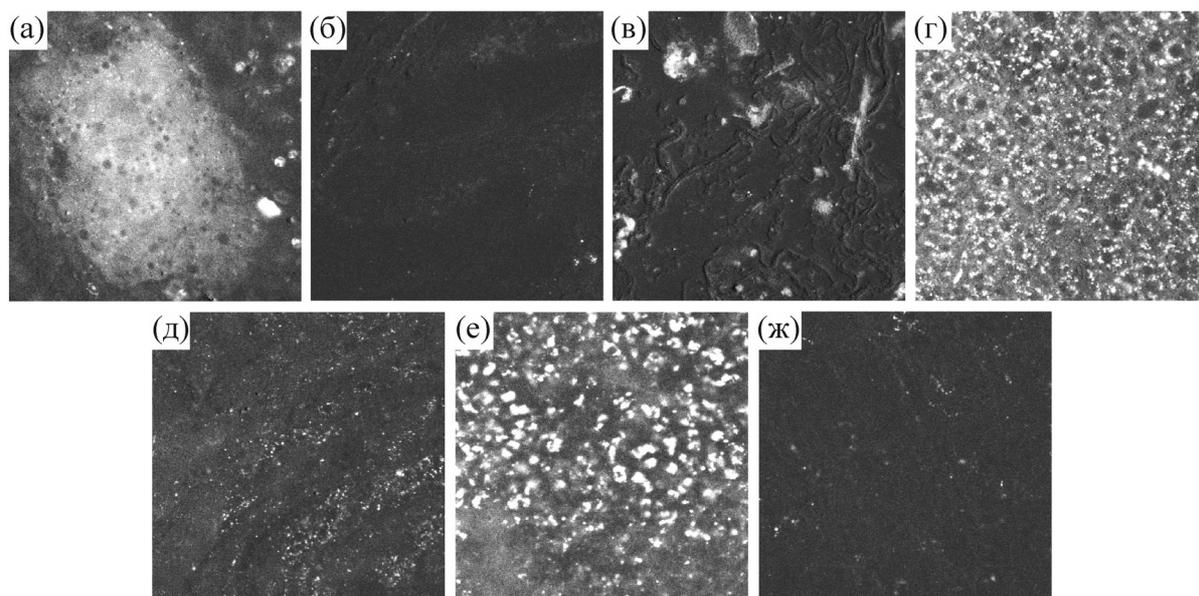


Рис. 4. Флуоресцентные изображения образцов тканей животного через три часа после введения конъюгата с линкером $n = 8$: (а) – опухоль; (б) – мышцы; (в) – кожа; (г) – печень; (д) – почки; (е) – селезенка; (ж) – стенка тонкого кишечника. Изображения получены методом конфокальной микроскопии на основе флуоресценции в диапазоне 650–693 нм. Размер изображений – 225 × 225 мкм.

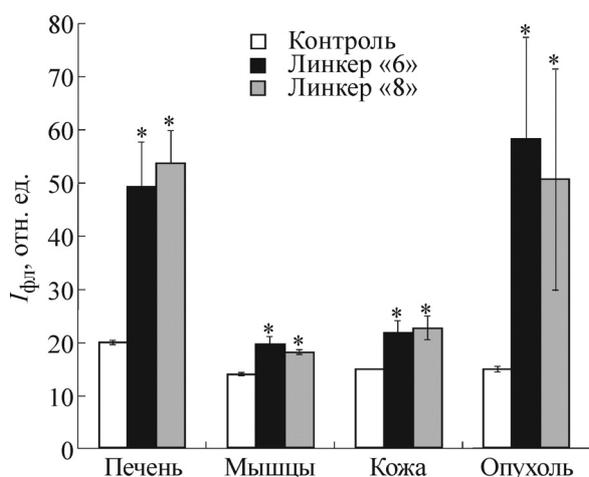


Рис. 5. Уровень сигнала флуоресценции образцов тканей животных в контрольной группе и группах с введением различных конъюгатов ($n = 6; 8$). Звездочкой отмечено статистически значимое отличие от контроля.

Было показано, что через три часа после инъекции конъюгатов в опухолевой ткани регистрировался интенсивный сигнал флуоресценции (рис. 2б,в). Максимум флуоресценции наблюдался на длине волны 665–670 нм (рис. 2г), что соответствует спектру исследуемых конъюгатов.

Характеристичный пик флуоресценции конъюгатов был обнаружен в большинстве ис-

следованных органов, при этом была отмечена значительная избирательность накопления соединения (рис. 3, 4). Высокий уровень накопления обоих конъюгатов был отмечен в печени, почках и селезенке (рис. 3г–е, 4г–е), что соответствует данным фармакокинетики, полученным для препаратов хлоринового ряда, и связано с морфофункциональными особенностями данных органов [20]. Сигнал конъюгатов в скелетных мышцах, а также в мышечных стенках полых органов (желудок, кишечник, сердце) был существенно ниже (рис. 3б,ж; 4б,ж). Кроме этого, было отмечено практически полное отсутствие накопления конъюгатов в образцах кожи и скелетных мышц (рис. 3б,в; 4б,в). Через три часа после инъекции значительное количество вещества оставалось в кровеносном русле и регистрировалось в крупных сосудах различных органов (для примера на рис. 3б показаны сосуды, питающие скелетную мышцу)

Количественный анализ уровня сигнала флуоресценции в образцах тканей позволил сравнить в них накопление конъюгатов с разной длиной линкера. Как показано на рис. 5, оба препарата показали сравнимо высокое накопление в опухолевой ткани относительно нормальных тканей (отношение уровня сигнала опухоль/мышца ~3). Важно отметить, что накопление препарата в печени не превышает таковое в опухолевой ткани модели колоректального рака.

Проведенное исследование показало, что изученные борсодержащие конъюгаты хлорина e_6 не имеют существенных различий в накоплении и биораспределении. Они в определенной мере отвечают тем требованиям, которые предъявляются к препаратам для БНЗТ [2,3]. В частности, соединения продемонстрировали способность к относительно селективному накоплению в опухоли с контрастом содержания препарата опухоль/нормальная ткань ~3:1. Препарат продемонстрировал низкое накопление в коже, что позволяет предположить низкую фототоксичность. Способность хлорина флуоресцировать позволит в дальнейшем проводить контроль содержания бора в тканях методами *in vivo*. Таким образом, данные свойства этой группы препаратов позволяют сделать вывод о перспективности их применения в качестве агентов доставки бора для БНЗТ. Следующим этапом работы будет более глубокое выявление различий в свойствах веществ, связанных с длиной аминокиламидного линкера, исследование фармакокинетики конъюгатов, анализ содержания бора в опухоли и нормальных тканях с целью разработки оптимальных режимов введения препарата и последующего радиационного воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало перспективность дальнейшей разработки конъюгатов наночастиц бора с аминокламидными производными хлорина e_6 в качестве агентов БНЗТ, обеспечивающих селективное накопление бора в опухолевой ткани. При этом не выявлено влияния длины аминокламидного линкера ($n = 6, 8$) на биораспределение соединений в тканях животных-опухоленосителей. В дальнейшем планируется разработка методик и режимов введения исследуемых соединений, обеспечивающих достижение в опухоли концентрации бора, достаточной для эффективного терапевтического воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 13-03-00577, № 14-02-00715).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. Б. Сиваев, В. И. Брегадзе и Н. Т. Кузнецов, Изв. РАН. Сер. хим. **8**, 1256 (2002).
2. В. Д. Розуменко, Украинский нейрохирургический журн. **3**, 4 (2001).
3. W. A. G. Sauerwein, A. Wittig, R. Moss, and Y. Nakagawa, *Neutron Capture Therapy – Principles and Applications* (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2012).
4. N. M. Goudgaon, G. F. El-Kattan, and R. F. Schinazi, *Nucleosides & Nucleotides* **13**, 849 (1994).
5. T. Sano, in *Advances in neutron capture therapy*. Vol. 2: *Chemistry and biology*, Ed. by B. Larsson, J. Crawford, and R. Weinreich (Elsevier Science, Amsterdam, 1997), p. 408.
6. Y. Yamamoto, J. Cai, H. Nakamura, et al., *J. Org. Chem.* **60**, 3352 (1995).
7. V. A. Brattsev, J. H. Morris, and G. H. Danilova, in *Boron Chemistry at the Beginning of the 21st Century*, Ed. by Yu. Bubnov (Editorial URSS, Moscow, 2003), p. 321.
8. D. A. Buzatu, J. G. Wilkes, D. Miller, et al., US Patent No. 7,824,660 (13 September 2011).
9. H. Yang, L. Jing, Y. Bando, et al., *J. Mater. Chem.* **20** (5), 1007 (2010).
10. Yu. N. Bubnov, *Boron Chemistry at the Beginning of the 21st Century* (Editorial URSS, Moscow 2003).
11. A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, et al., *Chem. Rev.* **98** (4), 1515 (1998).
12. I. A. Brattsev and J. H. Morris, in *Advances in neutron capture therapy*. Vol. 2: *Chemistry and biology*, Ed. by B. Larsson, J. Crawford, and R. Weinreich (Elsevier Science, Amsterdam, 1997), p. 51.
13. А. В. Феофанов, И. А. Лобанова, И. Б. Сиваев и др., Изв. РАН. Сер. хим. **1**, 215 (2010).
14. А. В. Efremenko, А. А. Ignatova, М. А. Grin, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **13** (1), 92 (2014).
15. А. В. Efremenko, А. А. Ignatova, М. А. Grin, et al., in *Current microscopy contributions to advances in science and technology*, Ed. by A. Méndez-Vilas (FORMATEX, Spain, 2012), pp. 84–90.
16. V. A. Ol'shevskaya, A. V. Zaytsev, A. N. Savchenko, et al., *Bull. Korean Chem. Society* **28** (11), 1910 (2007).
17. М. А. Grin, R. А. Titeev, D. I. Brittal, et al., *Mendeleev Communications* **21**, 84 (2011).
18. С. С. Кузнецов, Л. Б. Снопина, М. М. Карабут и др., *Современные технологии в медицине* **7** (3), 32 (2015).
19. Р. Я. Фрешни, *Культура животных клеток: практическое руководство* (БИНОМ. Лаборатория знаний, М., 2010).
20. A. Juzeniene, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **6** (2), 94 (2009).

Study of Tissue Distribution of Potential Agents for Boron Neutron Capture Therapy Using Boron Nanoparticle Conjugates of Chlorin e_6 Amino Amide Derivatives

A.B. Volovetskiy*, N.Y. Shilyagina*, V.V. Dudenkova*, S.O. Pasynkova**,
A.A. Ignatova**** ****, A.F. Mironov**, M.A. Grin**, V.I. Bregadze***,
A.V. Feofanov**** ****, I.V. Balalaeva*, and A.V. Maslennikova* ****

*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

**Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, prosp. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia

***Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia

****Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Mikluho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

*****Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119234 Russia

*****Nizhny Novgorod State Medical Academy, pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

Boron neutron capture therapy using the ability of the isotope ^{10}B to capture thermal neutrons is one of the most promising techniques in radiation therapy. Therefore, the high accumulation and selective delivery of ^{10}B into tumor tissue are the most important requirements to achieve its efficacy. This study objective was to evaluate biodistribution of conjugates of cobalt bis-dicarbollide with chlorin e_6 amino amide derivatives. Experiments were carried out on tumor-bearing Balb/c mice. Mice colon carcinoma CT-26 was used as a tumor model. Boron-containing conjugates were injected into the tail vein in a dose of 10 mg/kg. Conjugate accumulation in tumor tissue and organs was studied by laser scanning microscopy. Excitation was performed at the wavelength of 514 nm, the registered signals were in the range of 560–710 nm at intervals of 10 nm. The intensity of fluorescence signal of tissue samples was used to evaluate the amount of boron conjugate. In 3 hours after injection, a high level of fluorescence was observed in liver, spleen and lung. The contrast of muscle/tumor accumulation appears to achieve ~ 3 . The study demonstrated the application perspective of chlorin e_6 boron conjugates as agents in boron neutron capture therapy.

Key words: Boron neutron capture therapy, chlorin e_6 , photosensitizer, laser scanning microscopy