УДК 535+543.4
DOI: https://doi.org/10.17721/3041-1491/2024.11-35

Павло ВІРИЧ[1], канд. біол. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0002-1463-1992
e-mail: sphaenodon@ukr.net

Наталія КУЦЕВОЛ[1], д-р хім. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0002-1468-4111
e-mail: kutsevol@ukr.net

Олег ЄЩЕНКО[1], д-р фіз.-мат. наук, проф.
ORCID ID: 0000-0001-8927-5673
e-mail: oleg.yeshchenko@knu.ua

Віталій СМОКАЛ[1], канд. хім. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0001-6832-8625
e-mail: vitalii.smokal@knu.ua

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

МУЛЬТИКОМПОНЕНТНА НАНОСИСТЕМА ДЛЯ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ПРОТИПУХЛИННОЇ ТЕРАПІЇ

Вступ. ***Фотодинамічна терапія – це малоінвазивний метод лікування пухлин, заснований на використанні фотосенсибілізуючих молекул (ФС), які генерують активні форми кисню (АФК) у тканинах після збудження червоним або інфрачервоним світлом.***

Методи. ***Методами абсорбційної та фотолюмінесцентної спектроскопії визначено оптимальні концентрації компонентів, які здатні посилювати утворення АФК.***

Результати. ***Було отримано та випробувано фотосистему третього покоління з покращеними фотосенсибілізуючими властивостями. Вона являє собою багатокомпонентну наносистему полімер / наночастинки золота / темопорфін. Динамічне світлорозсіювання підтверджує нівелювання агрегаційних процесів у водних розчинах порівняно з індивідуальним темопорфіном.***

Висновки. ***Доведено, що комбінація темпорфіну з наночастинками золота, інкорпорованими в полімерну матрицю, може значно посилити ефект генерації АФК за рахунок поверхневого плазмонного резонансу наночастинок золота. Потрійна наносистема може бути рекомендована для тестування in vitro на ракових клітинах при опроміненні світлом малої потужності (λ = 660 нм) з метою подальшого використання у фотодинамічній терапії.***

Ключові слова: ***полімерний наноносій, наносистема, наночастинки золота, темопорфін, фотодинамічна терапія.***

Вступ

Фотодинамічна терапія (ФДТ) – сучасний, малоінвазивний, перспективний метод лікування для широкого спектра онкологічних захворювань (Niculescu, & Grumezescu, 2021, p. 3626). ФДТ заснована на взаємодії світла та фотосенсибілізатора (ФС), що призводить до утворення цитотоксичних АФК, які пошкоджують ракові клітини, ініціюючи апоптоз, некроз або аутофагію (Correia et al., 2021, p. 1332). ФДТ має перевагу над класичними методами

© Вірич Павло, Куцевол Наталія, Єщенко Олег, Смокал Віталій, 2024

хіміотерапії в онкології внаслідок зменшення побічних ефектів на здорові тканини (Correia et al., 2021, p. 1332). Основним обмеженням використання ФС у лікуванні раку є їх невибіркове накопичення в нецільових тканинах, низька стабільність, схильність до агрегації у водних розчинах і темнова цитотоксичність (Correia et al., 2021, p. 1332). На разі однією з основних вимог до систем, які використовуються у ФДТ, є селективна акумуляція в тканинах-мішенях та максимуми оптичного поглинання в діапазоні фототерапевтичного вікна (650–850 нм), а також метаболізація до нетоксичних продуктів на виведення їх з організму (Hamidi et al., 2020, p. 411). Стратегія інкапсуляції та застосування наноносіїв дозволяє покращити біосумісність та селективність систем ФДТ, а також посилити фототерапевтичні ефекти (Li, Lee, & Yoon 2018, p. 1174). Такі підходи також покращують стабільність і гідрофільність нанопрепаратів, зменшують побічні ефекти, допомагають підтримувати постійну швидкість доставки ФС, забезпечують цільову доставку ліків до пухлинних клітин і обмежують темнову токсичність (Setaro et al., 2022, p. 282; Gualdesi et al., 2021, p. 108856).

У цьому дослідженні ми синтезували трикомпонентний нанокомпозит на основі зіркоподібного полімерного наноносія з інкапсульованими наночастинки золота (Au НЧ), і ФС темопорфіном. Темопорфін є однією з небагатьох молекул ФС, схвалених для медичних випробувань у кількох європейських країнах (Baskaran, Lee, & Yang, 2018, p. 25). У роботі досліджено оптичні властивості наносистеми та розглянуто механізми посилення фотоефектів при ФДТ.

Методи

Усі хімічні речовини для синтезу полімерних наноносіїв і металовмісних полімерних наносистем були придбані в Merck (Мюнхен, Німеччина) і використані без додаткового очищення.

Полімерний наноносій. Зіркоподібний кополімер Декстран-ко-Поліакриламід в аніонній формі (Д-g-ПААан) використовували як наноносій і матрицю для приготування наносистеми. Д-g-ПАА в неіонній формі був синтезований методом радикальної прищепленої кополімеризації (Kutsevol et al., 2012, p. 82). Молекулярні параметри кополімеру, визначені методом гель-проникної хроматографії: M_w = 2,15Д10^6 г/моль, Rz = 85 нм, M_w/M_n = 1,72. Потім зразок Д-g-ПАА омилювали для отримання кополімеру в аніонній формі, ступінь перетворення амідних груп у карбоксилатні за 30 хв гідролізу становив 36 % (Kutsevol et al., 2014, p. 12).

Приготування наносистеми. Д-g-ПААан / AuНЧ: 1 г Д-g-ПААан протягом 20 хв. Потім додавали 0,4 мл 0,1 М $NaBH_4$ і перемішували ще 20 хв. Темопорфін / Д-g-ПААан / AuНЧ: розчин темопорфіну в ДМСО (C = 0,003 мг/мл) додавали до вихідного розчину Д-g-ПААан / AuНЧ для отримання бажаних концентрацій і перемішували 20 хв. Процедуру проводили безпосередньо перед дослідженням наносистем.

Розмірні характеристики. Дослідження зразків методом динамічного розсіювання світла (ДРС) проводили за допомогою аналізатора розміру частинок NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments, США), оснащеного

лазером 532 нм. Розсіяне світло вимірювали під кутом 173° (зворотне розсіювання). Зразки витримували за 25 °С упродовж 5 хв перед вимірюванням для досягнення рівноваги. П'ятнадцять кореляційних кривих для кожного зразка були оброблені алгоритмом регуляризованого сингулярного розкладу. У результаті отримано гідродинамічний розподіл частинок за розмірами досліджуваних контрольних зразків та наносистем різного складу.

Оптичні характеристики. Спектри поглинання та фотолюмінесценції (ФЛ) вимірювали на спектрофотометрі Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies Inc.) та спектрофлуорофотометрі Shimadzu RF-6000 (Shimadzu Corp.), відповідно. ФЛ збуджувалася довжиною хвилі 423 нм. Спектри вимірювали за кімнатної температури впродовж 2 год після змішування розчину темопорфіну в ДМСО з водою та водними розчинами Д-g-ПААан і Д-g-ПААan / AuНЧ із 15-хвилинними інтервалами.

Вивчення генерації АФК in situ. Зразки темопорфіну (7,2 мкг/мл), Д-g-ПААан / AuНЧ (72 мкг/мл) і Д-g-ПААан / AuНЧ / темопорфіну (7,2 мкг/мл темопорфіну +72 мкг/мл D-g-PAAan / AuНЧ) готували у фізіологічному розчині. АФК вимірювали за допомогою модифікованого методу Daliang (Daliang et al., 2021, p. 129878). Далі 3 мл кожного розчину додавали до 2',7'-дихлорофлуоресцеїну (Sigma, США) для виявлення АФК. Кінцева концентрація дихлорофлуоресцеїну становила 15×10^{-6} М. Розчини опромінювали світлом $\lambda = 660$ нм (100 мДж/с), доза опромінення 30 Дж/мл. Вимірювання флуоресценції проводили відразу після закінчення опромінення світлом. Використовували спектрофлуорофотометр Shimadzu RF-6000 із програмним забезпеченням LabSolutions. Флуоресценцію реєстрували за 525 нм зі збудженням 488 нм. Флуоресценцію зразків оцінювали в умовних одиницях. Під час експерименту всі зразки перебували в однакових умовах. Повторність досліджень була шестикратною.

Результати

AuНЧ були синтезовані в полімерній матриці (Chumachenko et al., 2016, p. 379). Цей метод синтезу дозволяє точно контролювати діаметр НЧ і їхній розподіл за розмірами. До утвореної наносистеми додавали фотосенсибілізатор темопорфін безпосередньо перед тестуванням. У розчині темопорфіну, який готували додаванням у воду розчину темопорфіну в ДМСО, чітко видно утворення агрегатів з радіусами 145 нм і приблизно 10 мкм (рис. 1а, пунктирна лінія) унаслідок поганого розчинення темопорфіну у воді.

Розподіл наночастинок за розмірами для кон'югатів темопорфін / Д-g-ПААан і темопорфін / Д-g-ПААан / AuНЧ показує зникнення агрегатів темопорфіну, які були в розчині темопорфіну без полімеру (рис. 1 а-б). Розподіл розмірів систем темопорфін / Д-g-ПААан і Д-g-ПААан / AuNPs / темопорфін нагадує характерну криву розподілу незаряджених полімерів. Цей ефект є результатом взаємодії поліелектроліт–темопорфін. AuНЧ не відіграють істотної ролі в цьому процесі. Радіуси кон'югатів темопорфін / Д-g-ПААан і темопорфін / Д-g-ПААан / AuНЧ становлять 110 нм і 90 нм, відповідно.

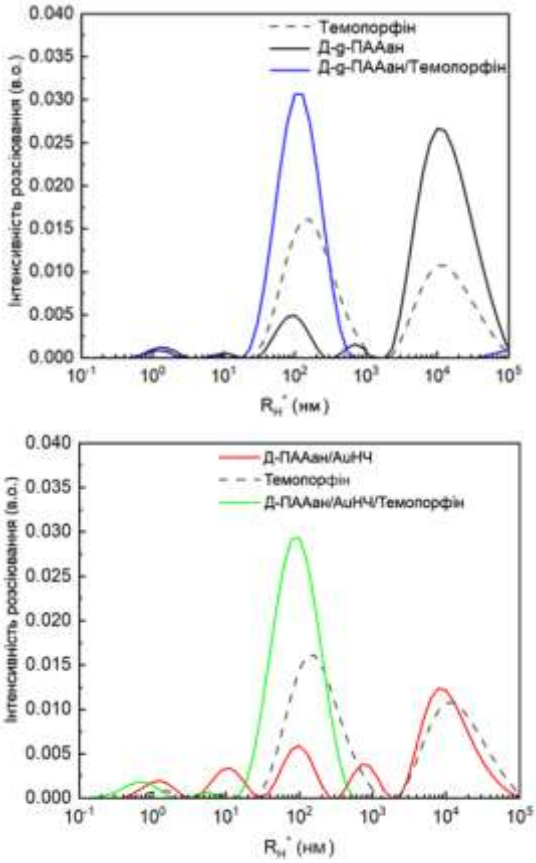


Рис. 1. Розподіл частинок за розміром, отриманий за допомогою ДРС для наногібридних систем Д-g-ПААан:
а) бінарна система темопорфін / Д-g-ПААан і контрольні зразки:
Д-g-ПАА; темопорфін;
б) темопорфін / Д-g-ПААан / АuНЧ та контрольні зразки:
Д-g-ПАА / АuНЧ; темопорфін

Спектри фотолюмінесценції (ФЛ) темопорфіну у воді, наносистем темопорфін / Д-g-ПААан і темопорфін / Д-g-ПААан / АuНЧ представлено на (рис. 2). Спектр темопорфіну у воді має структуру, типову для порфіринів (Aslanoglu et al., 2020, p. 16956; Gierlich et al., 2021, p. e20210024). У спектрі спостерігаються два піки: короткохвильовий (653 нм) і довгохвильовий (715 нм). Ці піки відповідають переходам S1(0)→S0(0) і S1(0) →S0(1) від основного коливального рівня 1-го збудженого π-електронного стану до основного та 1-го збудженого коливального рівня основного π-електронного стану молекули ФС, відповідно. Інтенсивність піку за 615 нм чистого темопорфіну досить низька, але зростає, коли темопорфін зв'язується з полімером. Це є додатковим аргументом на користь нашого висновку про зв'язування молекул темопорфіну з полімером.

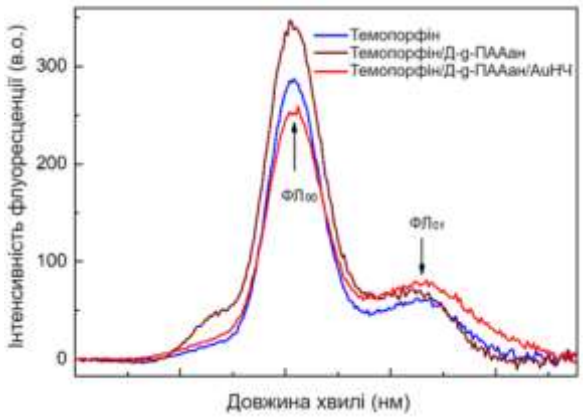


Рис. 2. Спектри ФЛ темопорфіну у воді та водних розчинах темопорфін / Д-g-ПААан і темопорфін / Д-g-ПААан / АuНЧ при збудженні 423 нм. Концентрації компонентів: темопорфін – 0,72 мкг/мл, золото і полімер – 7,2 мкг/мл

Проведено дослідження генерації АФК в умовах опромінення наносистеми Д-g-ПААан / АuНЧ/ темопорфін та контрольних систем світловим опромінення, як при ФДТ (λ = 660 нм) (Zhou et al., 2016, p. 6597). Не було виявлено жодних статистично значущих відмінностей у рівнях АФК після опромінення світлом 660 нм контрольних розчинів (фізіологічний розчин та Д-g-ПААан / АuНЧ) (рис. 3). Рівні АФК зросли в ~3 рази для розчину темопорфіну та ~5 разів для потрійного нанокомпозиту Д-g-ПААан / АuНЧ / темопорфін порівняно з контрольними зразками.

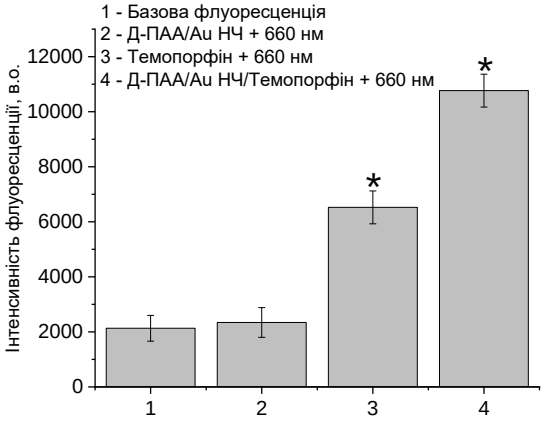


Рис. 3. Рівень АФК для фізіологічного розчину (контроль), Д-g-ПААан / АuНЧs (72 мкг/мл), темопорфіну (7,2 мкг/мл) і Д-g-ПААан / АuНЧ / темопорфін (72 мкг/мл Д-g-ПААан / АuНЧ, 7,2 мкг/мл темопорфін) після опромінення світлом 660 нм (M±SD; *n* = 6, тест Краскела–Уолліса, **p* < 0,05)

Отримані результати підтверджують фотодисоціацію темопорфіну та утворення вільних радикалів після опромінення світлом 660 нм. Інкапсуляція АuНЧ і темопорфіну в полімерній матриці Д-g-ПААан посилює утворення АФК.

Дискусія і висновки

Показано ефективність потрійної системи, що містить зіркоподібний полімер декстран-поліакриламід з інкорпорованим темопорфіном і наночастинками золота для генерації активних форм кисню при збудженні червоним світлом (λ = 660 нм). Дослідження оптичних властивостей і наявності агрегаційних процесів у наносистемі методами динамічного розсіювання світла та спектроскопії поглинання / емісії дозволили виявити особливості механізму збудження та оптимізувати склад наносистеми для досягнення максимальної ефективності при використанні ФДТ. Показано, полімерна матриця стабілізує наносистему та попереджає агрегацію, а також сприяє взаємодії між фотосенсибілізатором і наночастинками де відбувається обмін енергією зі збільшенням генерації АФК. Розроблена система готова для досліджень *in vitro* в умовах ФДТ відносно клітин раку.

Внесок авторів: Павло Вірич – дослідження генерації АФК, аналіз одержаних даних; Наталія Куцевол – валідація даних, концептуалізація, методологія; Олег Ещенко – спектроскопічні дослідження, написання – перегляд і редагування; Віталій Смокал – написання – перегляд і редагування.

Подяки, джерела фінансування. Цю роботу виконано в рамках проєкту Міністерства освіти і науки України "Полімерні системи та нанокомпозити для оптоелектроніки" (№ 0124U001177).

Список використаних джерел

Aslanoglu, B. et al. (2020). Optical properties of photodynamic therapy drugs in different environments: The paradigmatic case of temoporfin. *Phys. Chem. Chem. Phys*., 22, 16956–16964. https://doi.org/10.1039/D0CP02055A

Baskaran, R., Lee, J., & Yang, S.-G. (2018). Clinical development of photodynamicagents and therapeutic applications. *Biomater. Res.*, 22, 25. https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z

Correia, J.H., Rodrigues, J.A., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (2021). Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*, 13, 1332. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332

Chumachenko, V.A. et al. (2016). Copolymers Dex-tran-Graft-Polyacrylamide as Nanocarriers for Delivery of Gold Nanoparticles and Photosensitizers to Tumor Cells. In Nano-physics, Nanophotonics, Surface Studies, and Applications. *Springer*, 183, 379–390. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30737-4_32

Daliang, Y. et al. (2021). Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. *Sens. Actuators B. Chem*., 339, 129878. https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129878

Gierlich, P. et al. (2021). One-photon and two-photon photophysical properties of tetrafunctionalized Temoporfin (mTHPC) derivatives as potential agents for two-photon induced photodynamic therapy. *ChemPhotoChem,* 6(4), e202100249. https://doi.org/10.1002/cptc.202100249

Gualdesi, M.S. et al. (2021). New poly(acrylamide) nanoparticles in the development of third generation photosensitizers. *Dye. Pigment.*, 184, 108856. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108856

Hamidi, A., Shamlouei, H.R., Maleki, A., & Goodajdar, B.M. (2020). Improving the Optical Properties of Porphyrin Ring with Different Substitutions: As Candidate Using in Photosensitizer. *Int. J. Nanoelectron. Mater.*, 13, 411–420.

Kutsevol, N., Bezugla, T., Bezuglyi, M., & Rawiso, M. (2012). Branched Dextran-graft-Polyacrylamide Copolymers as Perspective Materials for Nanotechnology. *Macromol. Symp*., 317, 82–90. https://doi.org/10.1002/masy.201100087

Kutsevol, N., Bezuglyi, M., Rawiso, M., & Bezugla, T. (2014). Star-like Destran-graft-(polyacrylamide-co-polyacrylic acid) Copolymers. *Macromol. Symp.*, 335, 12–16. https://doi.org/10.1002/masy.201200115

Li, X., Lee, S., & Yoon, J. (2018). Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 47, 1174–1188. https://doi.org/10.1039/C7CS00594F

Niculescu A.G., & Grumezescu, A.M. (2021). Photodynamic Therapy – An Up-to-Date Review. *Appl. Sci*., 11, 3626. https://doi.org/10.3390/app11083626

Setaro, F. et al. (2020). Amphiphilic phthalocyanines in polymeric micelles: A supramolecular approach toward efficient third-generation photosensitizers. *J. Mater. Chem. B.,* 8, 282–289. https://doi.org/10.1039/C9TB02014D

Zhou, Z., Song, J., Nie, L., & Chen, X. (2016). Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 45, 6597–6626. https://doi.org/10.1039/c6cs00271d

References

Aslanoglu, B. et al. (2020). Optical properties of photodynamic therapy drugs in different environments: The paradigmatic case of temoporfin. *Phys. Chem. Chem. Phys*., 22, 16956–16964. https://doi.org/10.1039/D0CP02055A

Baskaran, R., Lee, J., & Yang, S.-G. (2018). Clinical development of photodynamicagents and therapeutic applications. *Biomater. Res.*, 22, 25. https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z

Correia, J.H., Rodrigues, J.A., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (2021). Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*, 13, 1332. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332

Chumachenko, V.A. et al. (2016). Copolymers Dex-tran-Graft-Polyacrylamide as Nanocarriers for Delivery of Gold Nanoparticles and Photosensitizers to Tumor Cells. In Nano-physics, Nanophotonics, Surface Studies, and Applications. *Springer*, 183, 379–390. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30737-4_32

Daliang, Y. et al. (2021). Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. *Sens. Actuators B. Chem*., 339, 129878. https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129878

Gierlich, P. et al. (2021). One-photon and two-photon photophysical properties of tetrafunctionalized Temoporfin (mTHPC) derivatives as potential agents for two-photon induced photodynamic therapy. *ChemPhotoChem,* 6(4), e20210024. https://doi.org/10.1002/cptc.202100249

Gualdesi, M.S. et al. (2021). New poly(acrylamide) nanoparticles in the development of third generation photosensitizers. *Dye. Pigment.*, 184, 108856. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108856

Hamidi, A., Shamlouei, H.R., Maleki, A., & Goodajdar, B.M. (2020). Improving the Optical Properties of Porphyrin Ring with Different Substitutions: As Candidate Using in Photosensitizer. *Int. J. Nanoelectron. Mater.*, 13, 411–420.

Kutsevol, N., Bezugla, T., Bezuglyi, M., & Rawiso, M. (2012). Branched Dextran-graft-Polyacrylamide Copolymers as Perspective Materials for Nanotechnology. *Macromol. Symp*., 317, 82–90. https://doi.org/10.1002/masy.201100087

Kutsevol, N., Bezuglyi, M., Rawiso, M., & Bezugla, T. (2014). Star-like Destran-graft-(polyacrylamide-co-polyacrylic acid) Copolymers. *Macromol. Symp.*, 335, 12–16. https://doi.org/10.1002/masy.201200115

Li, X., Lee, S., & Yoon, J. (2018). Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 47, 1174–1188. https://doi.org/10.1039/C7CS00594F

Niculescu, A.G., & Grumezescu, A.M. (2021). Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. *Appl. Sci*., 11, 3626. https://doi.org/10.3390/app11083626

Setaro, F. et al. (2020). Amphiphilic phthalocyanines in polymeric micelles: A supramolecular approach toward efficient third-generation photosensitizers. *J. Mater. Chem. B.,* 8, 282–289. https://doi.org/10.1039/C9TB02014D

Zhou, Z., Song, J., Nie, L., & Chen, X. (2016). Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 45, 6597–6626. https://doi.org/10.1039/c6cs00271d

Отримано редакцією збірника / Received: 21.06.24
Прорецензовано / Revised: 11.07.24
Схвалено до друку / Accepted: 30.09.24

Pavlo VIRYCH[1], PhD (Biol.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0002-1463-1992
e-mail: sphaenodon@ukr.net

Nataliya KUTSEVOL[1], DSc (Chem.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0002-1468-4111
e-mail: kutsevol@ukr.net

Oleg YESHCHENKO[1], DSc (Phys. & Math.), Prof.
ORCID ID: 0000-0001-8927-5673
e-mail: oleg.yeshchenko@knu.ua

Vitalii SMOKAL[1], PhD (Chem.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0001-6832-8625
e-mail: vitalii.smokal@knu.ua

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

MULTICOMPONENT NANOSYSTEM FOR PHOTODYNAMIC ANTI-TUMOR THERAPY

Introduction. ***Photodynamic therapy is a minimally invasive method of treating tumors based on photosensitizing molecules (PS) that generate reactive oxygen species (ROS) in tissue under the influence of red or infrared light excitation.***

Methods. ***The optimum concentrations of components that can enhance the formation of (ROS) were determined by absorption and photoluminescence spectroscopy.***

Results. ***In this work a third-generation FS with improved photosensitizing properties was prepared and stupid. This FS is a multicomponent nanosystem polymer-gold nanoparticles-temoporfin. Dynamic light scattering confirm the leveling of aggregation processes in comparison with individual temoporfin.***

Conclusions. ***It has been proven that the combination of temporphine with gold nanoparticles incorporated into a polymer matrix can significantly enhance the effect of ROS generation due to the surface plasmon resonance of gold nanoparticles. The ternary nanosystem can be recommended for in vitro testing on cancer cells under low-power LED lamp irradiation (λ = 660 nm) for further use in photodynamic therapy.***

Keywords: ***polymer nanocarrier; nanosystem; gold nanoparticles; temoporfin; photodynamic therapy.***

Автори П. Вірич, О. Єщенко та В. Смокал заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Член редакційної колегії Н. Куцевол заявляє про відсутність конфлікту інтересів та невтручання в процес оцінювання цієї статті відповідно до міжнародних стандартів публікаційної етики. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors P. Virych, O. Yeshchenko and V. Smokal declare no conflicts of interest. The member of the Editorial board N. Kutsevol declares no conflict of interest and has not interfered in the evaluation process of this article, in accordance with international publication ethics standards. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.