

ЛАЗЕРНАЯ ГИПЕРТЕРМИЯ ОПУХОЛЕЙ С НАНОТЕРМОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ

УДК 616—006:615.849.19
Поступила 8.12.2009 г.



М.А. Сироткина, младший научный сотрудник НИИ ПФМ¹;
В.В. Елагин, младший научный сотрудник НИИ ПФМ¹;
М.В. Ширманова, младший научный сотрудник НИИ ПФМ¹;
М.Л. Бугрова, к.б.н., научный сотрудник НИИ ПФМ¹;
Л.Б. Снопина, к.б.н., старший научный сотрудник НИИ ПФМ¹;
В.А. Надточенко, д.х.н., главный научный сотрудник²;
В.А. Каменский, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник³;
Е.В. Загайнова, д.м.н., зам. директора НИИ ПФМ¹

¹ Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород;

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва;

³ Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород

Цель работы — исследование возможности использования золотых наночастиц для проведения локальной лазерной гипертермии опухоли.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 16 самках мышей линии СВА с перевитым раком шейки матки. Животным внутривенно вводили раствор золотых наночастиц объемом 0,2 мл с концентрацией 10^9 частиц/мл. Размер частиц составлял 200—250 нм; максимум экстинкции, связанный с плазмонным резонансом, находился на длине волны 850—950 нм. Наблюдение проникновения наночастиц в опухолевый узел осуществляли методом оптической когерентной томографии. В период максимального накопления наночастиц в опухоли проводили гипертермию на лазерной установке ЛСП-АЗОР, генерирующей излучение в непрерывном режиме на длине волны 810 нм. Длительность воздействия на опухоль составляла 20 мин. Противоопухолевый эффект проводимого воздействия оценивали по торможению роста опухоли.

Результаты. Определение момента достижения максимальной концентрации наночастиц в опухолевой ткани позволило наиболее эффективно осуществить лазерное воздействие. Использование наночастиц в качестве термосенсибилизатора дало возможность снизить мощность лазерного излучения и обеспечить локальность воздействия.

Ключевые слова: золотые наночастицы, лазерная гипертермия, оптическая когерентная томография, ИК-термография.

English

Laser hyperthermia of tumors with nanothermosensibilizers

M.A. Sirotkina, junior scientific worker of the AFM SRI¹;
V.V. Elagin, junior scientific worker of the AFM SRI¹;
M.V. Shirmanova, junior scientific worker of the AFM SRI¹;
M.L. Bugrova, c.b.s., scientific worker of the AFM SRI¹;
L.B. Snopina, c.b.s., scientific worker of the AFM SRI¹;
V.A. Nadtochenko, ChD, head scientific worker²;
V.A. Kamensky, c.phm.s., leading scientific worker³;
E.V. Zagainova, MD, deputy director of the AFM SRI¹

Для информации: Сироткина Марина Александровна, тел. раб. 8(831)465-41-13.

¹ Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod;

² N.N. Semyonov Institute of chemical physics of the RAS, Moscow;

³ Institute of applied physics of the RAS, N. Novgorod

Aim of work is investigation of the gold nanoparticle use possibility for a local laser hyperthermia of tumor.

Materials and methods. The investigation is made on 16 female-mice of the CBA line with a twisted cancer of the neck of the uterus. A solution of gold nanoparticles with a 0.2 ml volume with a concentration of 10^9 particles/ml was intravenously infused into the animals. The particle size was 200—250 nm; a maximum of extinction, connected with a plasma resonance, was at the wavelength of 850—950 nm. An observation of the nanoparticle penetration to a tumoral node was accomplished by a method of optical coherent tomography. A hyperthermia at the LSD-AZOR laser apparatus, generating radiation in a continuous mode at a wavelength of 810 nm, has been conducted in a period of the nanoparticle maximum accumulation in a tumor. The duration of effect to a tumor was 20 min. The antitumoral result of effect was assessed according to the tumor growth inhibition.

Results. A detection of a moment of the nanoparticle maximum concentration in a tumoral tissue achievement has permitted a more effective laser effect. The nanoparticle use as a thermosensibilizer has permitted to decrease a laser radiation power and provide a local effect.

Key words: gold nanoparticles, laser hyperthermia, optical coherent tomography, IR-thermography.

Метод лазерной гипертермии является одним из перспективных в лечении онкологических заболеваний. Из-за патологического строения сосудов злокачественных опухолей при лазерном нагреве развиваются сосудистый стаз и многочисленные тромбозы и, как следствие, происходит значительное повышение температуры, в то время как в нормальных тканях скорость перфузии и вместе с ней теплоотдача возрастает линейно с ростом температуры. Нарушение кровотока в солидных опухолях и хроническая гипоксия значительно повышают термочувствительность опухолевых клеток и уже при температуре $43,5^{\circ}\text{C}$ происходят необратимые повреждения клеток опухоли [1].

Однако существенным недостатком стандартной гипертермии является отсутствие избирательного действия, поскольку наряду с опухолевыми клетками нагреваются здоровые ткани вокруг опухоли. С развитием нанотехнологий гипертермия получила новые возможности. Для локализации процесса гипертермии все чаще применяют термосенсибилизаторы: магнитные или плазмонно-резонансные наночастицы, которые вводят в кровоток или непосредственно в опухолевый узел. Накопление наночастиц в опухолевой ткани резко повышает градиент температуры между опухолью и окружающими здоровыми тканями, обеспечивая локальность нагрева. Это делает лазерное воздействие прицельным и снижает его негативное влияние на нормальные ткани.

Плазмонно-резонансные наночастицы обладают уникальным свойством — способностью возбуждать локализованный поверхностный плазмонный резонанс в видимой или ближней ИК-области спектра, что приводит к повышенному поглощению и/или рассеянию ими зондирующего излучения [2]. При поглощении лазерного излучения такие частицы способны генерировать тепловую энергию, что позволяет снизить дозу лазерного излучения.

Существует возможность настройки спектрального положения и амплитуды плазмонного резонанса за счет изменения природы металла, размера, формы, структуры частиц и их диэлектрического окружения. Таким

образом, путем варьирования различных параметров таких наночастиц можно контролировать длину волны плазмонного резонанса и получать частицы с заданными оптическими свойствами [3, 4].

Немаловажным достоинством этих наночастиц является низкая токсичность, что делает их безопасными для применения в живых организмах. К тому же, в силу своего размера, они обладают высокой способностью проникать внутрь опухоли через эндотелий капилляров и накапливаться. Эта способность обуславливает феномен избирательного накопления наночастиц в опухоли [5].

Однако, несмотря на рост использования наночастиц в качестве термосенсибилизаторов и быстрое развитие этого направления, вопрос о распределении их в организме и накоплении в опухолевом узле остается до конца не изученным.

В настоящее время для исследования биораспределения и селективного накопления наночастиц в опухоли используют такие методы, как световая [6], электронная, конфокальная [7], многофотонная [8] микроскопия, количественный анализ проводят методами атомно-абсорбционной спектроскопии [9], нейтронно-активационного анализа [10]. Данные методы являются трудоемкими и дорогостоящими, требуют большого количества экспериментального материала и не позволяют проводить прижизненное исследование. Распределение наночастиц в условиях живого организма может быть изучено методом магнито-резонансной томографии, но для этого наночастицы должны быть мечены гадолинием [11]. Золотые наночастицы, обладающие поверхностным плазмонным резонансом, могут быть детектированы методом поверхностно-усиленной Раман-спектроскопии. Так, в работе X. Qian использовали данный метод для наблюдения накопления наночастиц в опухолевом узле и печени при пассивной и направленной доставке [12].

Оптические методы визуализации чувствительны к изменению поглощающих или рассеивающих характеристик биоткани, поэтому позволяют безопасно и быстро исследовать проникновение и накопление нано-

частиц в биоткани на живых объектах [13—15]. К тому же они признаны безопасными, поскольку в качестве зондирующего излучения используют свет ближнего ИК-диапазона.

В частности, метод оптической когерентной томографии (ОКТ) позволяет по изменению оптических характеристик визуализировать процесс взаимодействия наночастиц с биотканями. ОКТ — это высокоразрешающий метод получения изображения внутренней микроструктуры тканей. Основным принцип его заключается в регистрации рассеянного тканью зондирующего излучения и построении изображения поперечного сечения исследуемой ткани. Современные ОКТ-устройства обеспечивают визуализацию структур биотканей на глубину до 2 мм с пространственным разрешением в несколько микрометров [16]. Объектами для ОКТ-исследований являются преимущественно покровные ткани — кожа и слизистые оболочки внутренних органов.

Цель работы — исследование возможности использования золотых наночастиц для проведения локальной лазерной гипертермии опухоли.

Материалы и методы.

Животные. Исследование выполнено на 16 самках мышей линии СВА массой 25—30 г. Модель неоплазии создавали путем подкожной перевивки опухолевого штамма рака шейки матки (РШМ 5). Исследование начинали проводить, когда опухолевый узел хорошо пальпировался и достигал размера 10 мм. Предварительно перед началом исследования проводили депиляцию участка кожи в районе опухолевого узла. Животных разделили на две группы. В опытной группе (12 животных) мышам в хвостовую вену ввели раствор наночастиц в объеме 0,2 мл. В контрольной группе (4 животных) одновременно с опытными животными также внутривенно ввели физиологический раствор в объеме 0,2 мл.

Наночастицы. В качестве термосенсибилизатора использовали коллоидный раствор плазмонно-резонансных золотых наночастиц типа бипирамиды, стабилизированных хитозаном. Размер частиц — 200—250

нм (рис. 1, а), концентрация в растворе составляла 10^9 частиц/мл. Максимум экстинкции наночастиц находился на длине волны 850—950 нм (рис. 1, б). Эти оптические характеристики оптимальны для проведения гипертермии, а также для визуализации методом ОКТ. Размер и форму наночастиц определяли методом электронной микроскопии.

Оптический контроль накопления наночастиц в опухоли. Исследование накопления наночастиц в опухоли выполнено на оптическом когерентном томографе, разработанном в ИПФ РАН (Нижний Новгород). Данный прибор имеет следующие характеристики: длина волны зондирующего излучения — 900 нм, мощность — 2 мВт, пространственное разрешение — 15—20 мкм, глубина визуализации — до 1,5 мм, время получения одного изображения — около 2 с. Прибор предназначен для получения изображения микроструктуры биотканей на основе низкоинтенсивной интерферометрии [16].

Непосредственно перед проведением лазерной гипертермии прижизненно и неинвазивно осуществляли ОКТ-контроль накопления наночастиц в опухоли, поскольку очевидно, что для достижения желаемого терапевтического эффекта важно проводить воздействие в период максимального накопления.

Для этого ОКТ-зонд устанавливали на поверхность кожи над опухолью перпендикулярно, с контролируемым небольшим прижимом. ОКТ-исследование проводили без применения дополнительных просветляющих агентов.

Контрольные ОКТ-изображения опухоли получали перед инъекцией наночастиц. Затем, после их введения, процесс накопления в опухоли наблюдали путем многократного получения ОКТ-изображений. Для этого поверхность опухолевого узла условно делили на 5 областей: верхнюю, нижнюю, правую, левую и центр. Из каждой области снимали по 3 изображения, таким образом получали по 15 ОКТ-изображений каждые 30 мин. Длительность исследования составляла 5 ч.

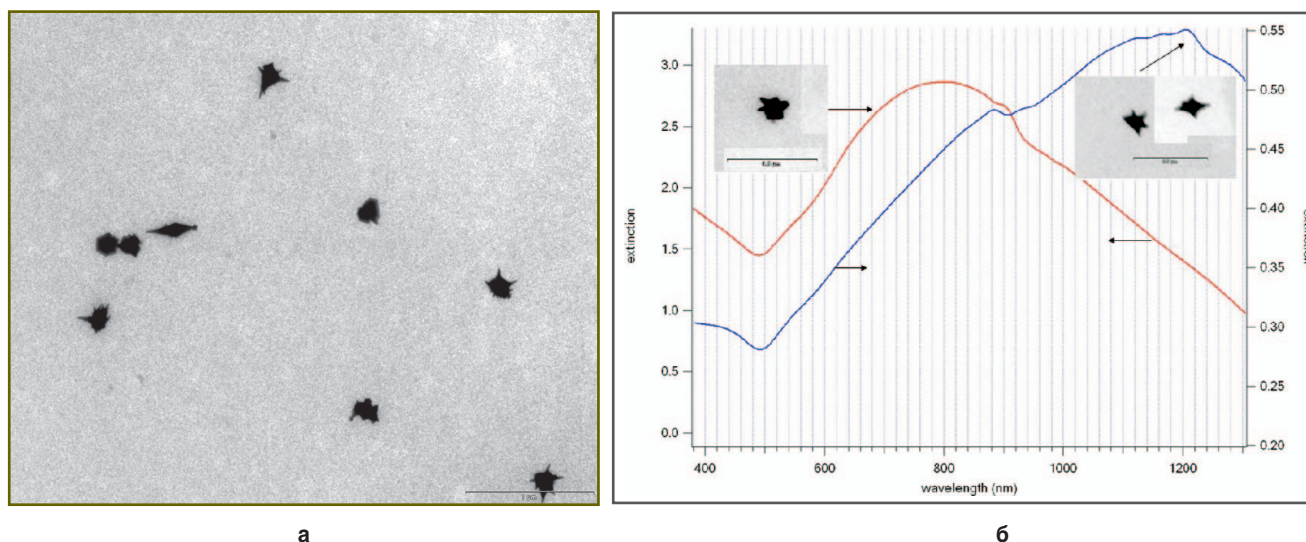


Рис. 1. Электронная микрофотография золотых наночастиц, ув. 18 000 (а) и спектр экстинкции (б)

Аналогично проводили ОКТ-исследование животных в контрольной группе.

Накопление наночастиц в опухоли оценивали визуально по увеличению интенсивности сигнала на ОКТ-изображениях, для чего сравнивали интенсивность ОКТ-сигналов на получаемых и контрольном (до введения наночастиц) изображениях. Высокий уровень ОКТ-сигнала на ОКТ-изображениях обусловлен наличием плазмонно-резонансных наночастиц в опухоли, которые являются источниками дополнительного обратного рассеяния. Период времени, когда наблюдаются наибольшие значения ОКТ-сигнала и глубины проникновения зондирующего излучения, характеризуется максимальным накоплением наночастиц в опухоли и оптимально подходит для проведения сеанса лазерной гипертермии.

Лазерная гипертермия. Для нагрева биоткани использовали медицинский лазер портативный одноволновой, ЛСП-АЗОР со сменным оптическим волокном. Для осуществления термотерапии работу лазера проводили в непрерывном режиме излучения на длине волны 0,81 мкм. Диапазон выходной мощности в непрерывном режиме регулировался от 0,5 до 15 Вт.

Для визуализации температурных изменений опухоли во время лазерной гипертермии с возможностью последующей компьютерной обработки использовали портативный компьютерный термограф ИРТИС-2000 МЕ, охлаждаемый жидким азотом. Температурное разре-

шение прибора — 0,02°C, время формирования кадра — 0,8 с.

Животным опытной группы в момент максимального накопления наночастиц в опухоли проводили однократный сеанс лазерной гипертермии. Для достижения терапевтического эффекта температуру опухоли поддерживали на постоянном уровне 44—45°C в течение 20 мин. При этом световой пучок диаметром около 1 см охватывал всю поверхность опухоли. Нагрев опухоли проводили под непрерывным контролем ИК-термографа, который фиксировал интегральное значение температуры с поверхности кожи. В режиме реального времени на монитор компьютера выводилось изображение, получаемое каждые 3 с. В результате в память компьютера записывалась непрерывная серия изображений. Животным в контрольной группе воздействия на опухоль не оказывали.

После окончания лазерной гипертермии у животных из опытной группы производили забор образцов опухолевой ткани. Методом электронной микроскопии проводили верификацию наночастиц в этих образцах.

После сеанса лазерной гипертермии оценивали противоопухолевый эффект по торможению роста опухоли.

Результаты и обсуждение.

Оптический контроль накопления наночастиц в опухоли. ОКТ-изображение опухоли, врастающей в кожу (рис. 2), представляет собой однородную область со средним уровнем сигнала, кожа на изображении не

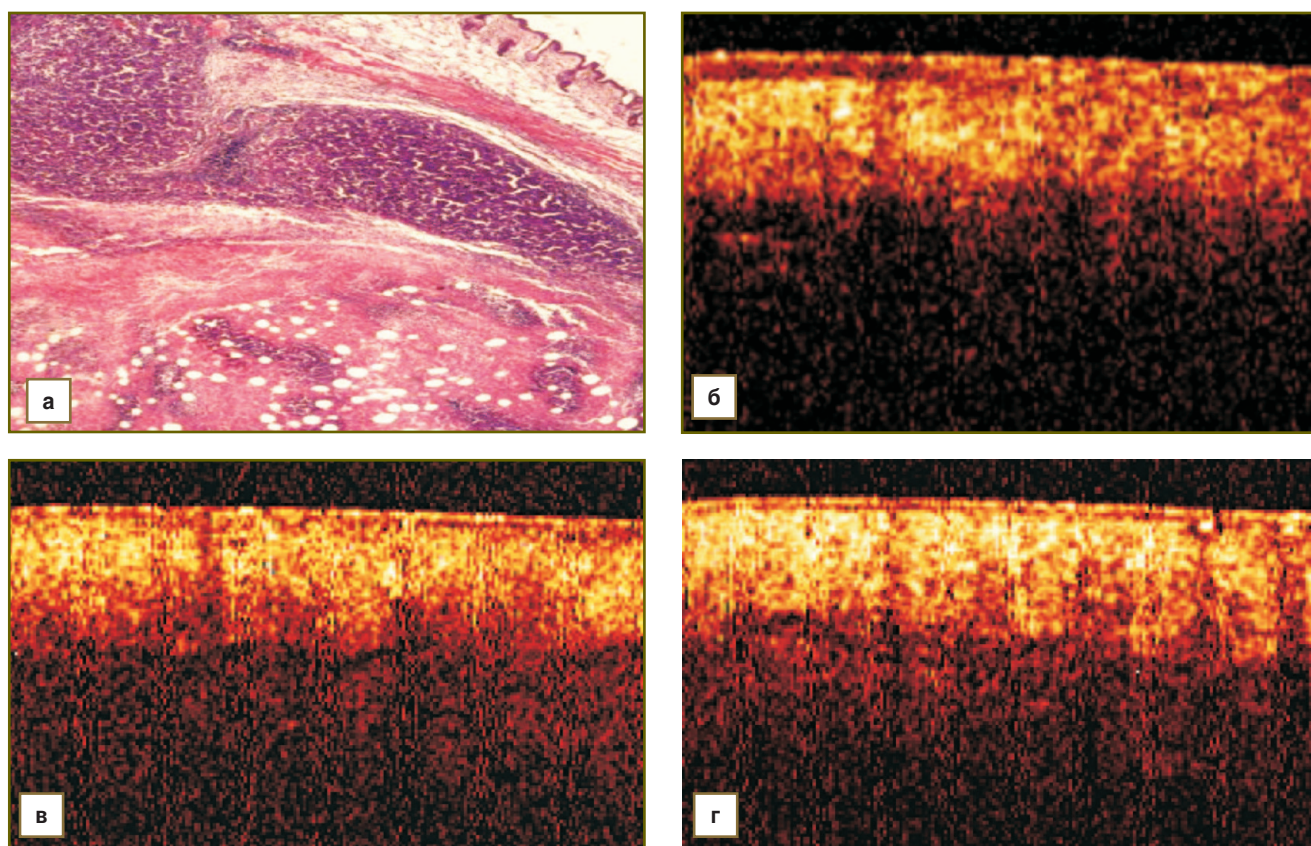


Рис. 2. ОКТ-исследование накопления наночастиц в опухоли, врастающей в кожу: а — гистологическое изображение опухоли (окраска гематоксилином и эозином, ув. 40); б — ОКТ-изображение опухоли до введения наночастиц; в — ОКТ-изображение через 2 ч после инъекции; г — ОКТ-изображение опухоли через 4 ч после инъекции

идентифицируется (рис. 2, б). Первые 2 ч после инъекции наночастиц никаких изменений на ОКТ-изображениях опухоли не наблюдали. Через 2—2,5 ч после внутривенного введения в обеих группах наблюдалось постепенное увеличение ОКТ-сигнала и возрастание глубины визуализации. Максимальная выраженность этих изменений отмечалась через 4—5 ч, что соответствует максимальному накоплению в опухоли наночастиц.

Наличие наночастиц в опухолевой ткани подтверждено методом электронной микроскопии (рис. 3). Наночастицы обнаружены внутри опухолевых клеток: в цитоплазме и ядре.

Таким образом, ОКТ-исследование выявило время максимального накопления наночастиц в опухоли (4—5 ч), которое является оптимальным для проведения лазерной гипертермии.

Лазерная гипертермия. Начальная мощность лазера, при которой происходит нагрев опухоли до 44°C за несколько минут, была подобрана на модельном экспе-

рименте и составила 1,2 Вт. В случае лазерной гипертермии опухоли с наночастицами необходимая температура опухоли достигалась при мощности лазера 1,2 Вт, затем мощность уменьшалась до 1 Вт и оставалась такой в течение 20 мин — это позволяло поддерживать постоянную температуру в опухоли на протяжении всего сеанса гипертермии. При нагреве опухоли без наночастиц мощность лазера была постоянной в течение всего времени воздействия и составляла 1,2 Вт.

Отмечено, что нагрев опухоли до 44°C при равных условиях воздействия происходил за 3—4 мин в группе опытных животных (с введением наночастиц) и более чем за 10 мин — в контрольной группе.

С помощью ИК-термографии установлено, что в случае проведения гипертермии опухоли, меченной золотыми наночастицами, наблюдался локальный нагрев опухолевого узла (рис. 4), в то время как при их отсутствии происходило диффузное распространение тепла из зоны опухоли в окружающие здоровые ткани.

Видимых повреждений опухоли (ожог, гиперемия) во

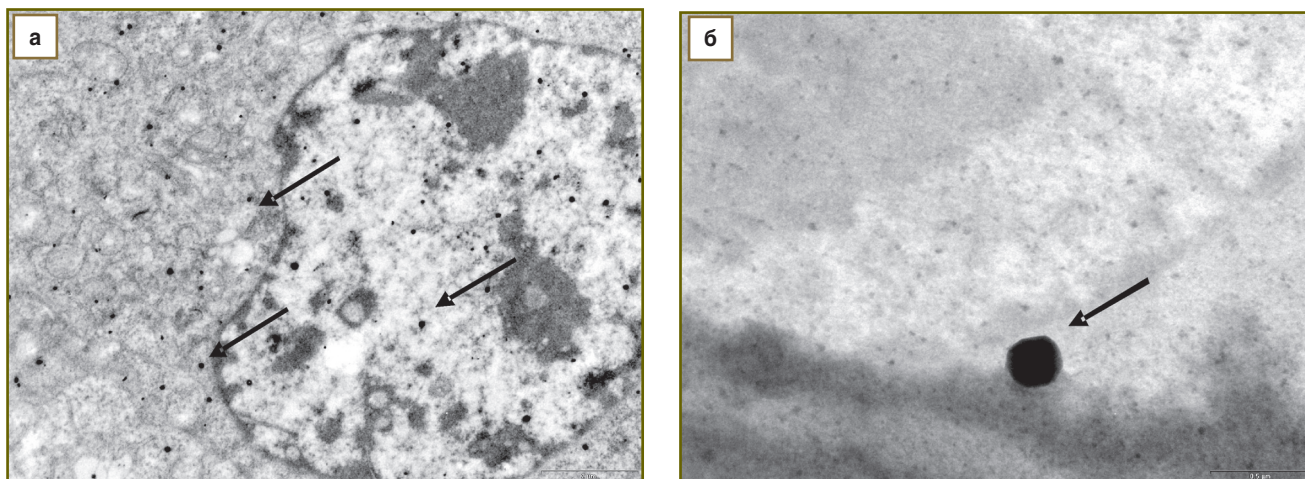


Рис. 3. Электронные микрофотографии опухолевой ткани. Золотые наночастицы показаны стрелками: а — наночастицы в ядре (ув. 7100); б — наночастицы в цитоплазме опухолевой клетки вблизи ядра (ув. 44 000)

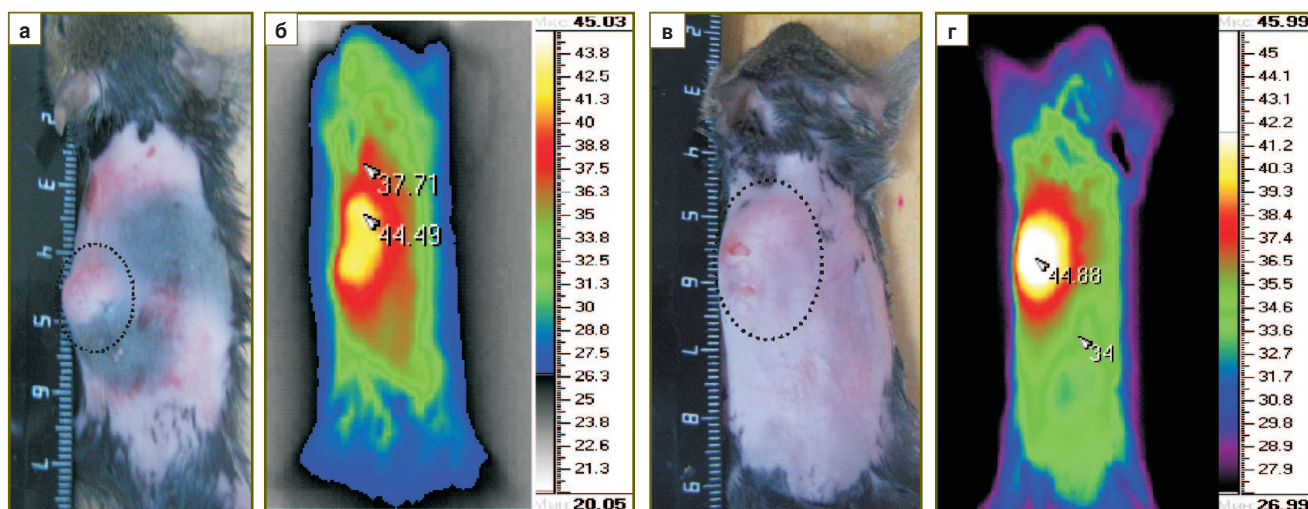


Рис. 4. Температурное распределение в биотканях при проведении лазерной гипертермии опухоли, содержащей наночастицы (б) и без наночастиц (г). Фотографии а и в демонстрируют расположение опухолевого узла на теле животных

время проведения сеанса гипертермии и после него не наблюдали. Через сутки в центре воздействия лазерного пучка появились некротические изменения в виде белого пятна с красным контуром (рис. 5, а). Через 3 сут размер пятна увеличивался и формировалась некротическая геморрагическая корка (рис. 5, б).

Лазерная гипертермия с нанотермосенсибилизаторами оказала выраженный противоопухолевый эффект. Торможение роста опухоли составило 53% на 8-е сутки после воздействия.

Заключение. Доказана эффективность проведения прижизненного и неинвазивного мониторинга накопления плазмонно-резонансных золотых наночастиц в экспериментальной опухолевой модели методом оптической когерентной томографии. Посредством анализа визуальных изменений установлено время максимального накопления наночастиц в опухоли — 4—5 ч после внутривенной инъекции. Применение наночастиц позволило более эффективно и прицельно осуществить лазерное воздействие на опухоль, обеспечить его локальность и снизить мощность лазерного излучения.

Полученные данные о торможении роста опухоли свидетельствуют о положительном лечебном эффекте лазерной гипертермии в сочетании с плазмонно-резонансными наночастицами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (ГК 02.512.11.2244), грантов РФФИ (09-02-97072, 09-02-12215, 09-02-00539, 09-02-90736), президентского гранта МД-3018.2009.7.

Литература

1. Генфольд М.Л., Барчук А.С. Лазерная селективная гипертермия в лечении злокачественных новообразований. СПб, 2002 г.
2. Wijaya A., Brown K.A., Alperc J.D., Hamad-Schifferli K. Magnetic field heating study of Fe-doped Au nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2007; 309: 15—19.
3. Daniel M., Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chem Rev* 2004; 104: 293—346.
4. Матвеевская Н.А., Семиноженко В.П., Толмачев А.В. Коллоидные системы наночастиц SiO₂/Au и их оптические свойства. *Материаловедение* 2006; 7: 39—43.
5. Lee T.M., Oldenburg A.L., Sitafalwalla S. et al. Engineered microsphere contrast agents for optical coherence tomography. *Optics Letters* 2003; 28(17): 1546—1548.
6. Gobin A.M., Lee M.H., Halas N.J. et al. Near-Infrared Resonant Nanoshells for combined Optical imaging and photothermal cancer. *NanoLetters* 2007; 7(7): 1929—1934.
7. Alvarez-Roman R., Naik A., Kalia Y.N. et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 2004; 99: 53—62.
8. Park J., Estrada A., Sharp K. et al. Two-photon-induced photoluminescence imaging of tumors using near-infrared excited gold nanoshells. *Optics Express* 2008; 16(3): 1590—1599.
9. Liu S., Han Y., Yin L., Long L., Liu R. Toxicology Studies of a Superparamagnetic iron oxide nanoparticle in vivo. *Advanced Materials Research* 2008; 47—50: 1097—1100.
10. James W.D., Hirsch L.R., West J.L. et al. Application of INAA to the build-up and clearance of gold nanoshells in clinical studies in mice. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2007; 271(2): 455—459.
11. Alric C., Taleb J., Mandon C. et al. Gold nanoparticles designed for combining dual modality imaging and radiotherapy. *Gold Bulletin* 2008; 41(2): 90—97.
12. Qian X., Peng X.-H., O'Ansari D. et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nature Biotechnology* 2008; 26: 83—90.
13. Sirotkina M.A., Zagaynova E.V., Shirmanova M.V. et al. Detection of nanoparticles accumulation in biological tissues by optical coherence tomography in vivo. In: *Nanoscale imaging, sensing, and actuation for biomedical applications VI*. Proceeding of SPIE. A.N. Cartwright, D.V. Nicolau (editors). Bellingham: SPIE. 2009; V. 7188, p. 71880L-1 — 71880L-7.
14. Zagaynova E.V., Shirmanova M.V., Kirillin M.Yu. et al. Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography: phantom, in vivo studies and Monte Carlo simulation. *Phys Med Biol* 2008; 53: 4995—5009.
15. Kirillin M., Shirmanova M., Sirotkina M. et al. Contrasting properties of gold nanoshells and titanium dioxide nanoparticles for OCT imaging of skin: Monte Carlo simulations and in vivo study. *Journal of Biomedical Optics* 2009; 14(2): 021017-1—021017-11.
16. Gelikonov V.M., Gelikonov G.V., Dolin L.S., et al. Optical coherence tomography: physical principles and applications. *Laser Physics* 2003; 13(5): 692—702.

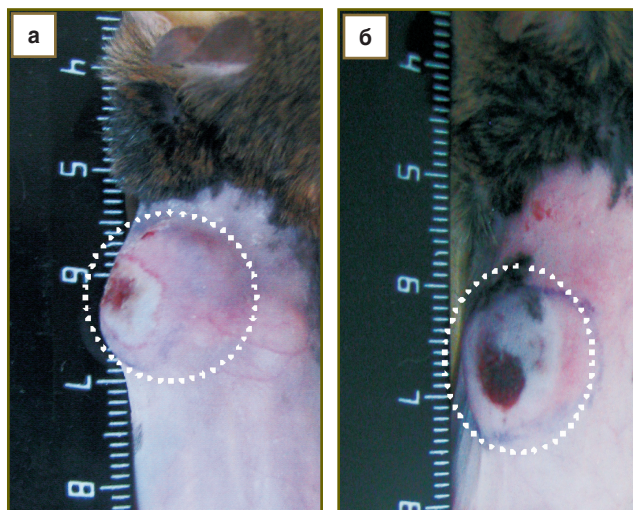


Рис. 5. Развитие некротических изменений в опухоли после лазерной гипертермии: а — через 1 сут; б — на 3-и сутки после гипертермии