DOI: 10.21870/0131-3878-2017-26-2-49-61

Эффективность фотон-захватной терапии с использованием золотосодержащих соединений на основе гиалуроновой кислоты (экспериментальные исследования)

Корякин С.Н.¹, Ульяненко С.Е.¹, Исаева Е.В.¹, Бекетов Е.Е.¹, Ульяненко Л.Н.¹,
Успенский С.А.^{2,3}, Селянин М.А.², Зеленецкий А.Н.³

¹ МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск;

² АНО «Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС», Москва;

³ ФГБУН Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва

Оценена эффективность фотон-захватной терапии с использованием синтезированного нанокompозита золота в эксперименте на крысах с модельной опухолью саркома М-1. Животных подвергали рентгеновскому облучению в сочетании с однократным введением в опухоль золотосодержащего соединения на основе гиалуроновой кислоты и меланина из расчёта 4 мг Au на животное за 15 мин до облучения. Доза локального рентгеновского облучения при моделировании фотон-захватной терапии составила 28 Гр. Отмечен сходный характер кривых динамики роста опухоли в течение 27 сут после облучения в вариантах опыта, моделирующих фотон-захватную терапию, и при однократном остром локальном облучении животных в дозе 32 Гр, то есть выигрыш в поглощённой дозе за счёт фотон-захватных событий составил 4 Гр (14%). Выигрыш в противоопухолевом эффекте, оцениваемом по индексу торможения роста опухоли, в группе экспериментальной фотон-захватной терапии по сравнению с группой облучения в дозе 28 Гр составил 26%. Степень проявления кожных реакций при рентгеновском облучении в дозе 28 Гр без и при внутриопухолевом введении золотосодержащего соединения не имела значимых отличий. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования нанокompозита золота в составе соединения с гиалуроновой кислотой и меланином для целей фотон-захватной терапии. Обнаруженные различия при использовании разных критериев оценки биологического эффекта (относительный объём опухоли, индекс торможения роста и коэффициент роста опухоли, коэффициент эффективности облучения, кожные реакции) свидетельствуют о необходимости выработки комплексного методологического подхода. Это ещё раз подчёркивает важность радиобиологических экспериментов в условиях *in vivo* (по сравнению с расчётными данными и результатами опытов *in vitro*), являющихся основой для разработки медицинских технологий.

Ключевые слова: фотон-захватная терапия, рентгеновское излучение, золотосодержащее соединение, наночастицы, гиалуроновая кислота, меланин, крысы с саркомой М-1, внутриопухолевое введение, поглощённая доза, противоопухолевая эффективность, кожные реакции.

Введение

Повышение показателей излечения онкологических больных связано, прежде всего, с эффективностью лучевой терапии (ЛТ), как одного из наиболее востребованных самостоятельных методов, роль которого в комплексном лечении постоянно возрастает [1]. Это обуславливает необходимость совершенствования как схем лечения, так и способов ЛТ, направленных на увеличение поглощённой дозы облучения в опухоли и снижение риска поражения окружающих здоровых тканей. Для конкретной локализации опухоли и даже определённых случаев заболевания существуют свои инструменты решения поставленных задач: привлечение к использованию в медицинских целях различных источников излучения с отличительными характеристика-

Корякин С.Н.* – зав. лаб., к.б.н.; Ульяненко С.Е. – зав. отд., д.б.н.; Исаева Е.В. – ст. научн. сотр., к.вет.н.; Бекетов Е.Е. – зав. лаб., к.б.н.; Ульяненко Л.Н. – в.н.с., д.б.н., проф. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. Успенский С.А. – ст. научн. сотр., к.х.н. АНО «МНИЦИТ МАРТИНЕКС», ИСПМ РАН. Селянин М.А. – президент АНО «МНИЦИТ МАРТИНЕКС». Зеленецкий А.Н. – зав. лаб., д.х.н., проф. ИСПМ РАН.

*Контакты: 249036, Калужская обл., Обнинск, ул. Королёва, 4. Тел.: (484) 399-72-76, e-mail: korsermic@mail.ru.

ми (включая величину линейной передачи энергии (ЛПЭ)), возможность локальной выгрузки максимальной дозы в заданных параметрах, высокий градиент поглощённых доз в опухолевой и здоровой тканях [2]. Однако для обеспечения таких технологий требуются специальные, иногда громоздкие, установки (циклотроны, синхротроны, реакторы и др.) в основном внеклинического размещения. Если учесть, что по техническому оснащению медицинская радиология в России существенно отстаёт от развитых стран, и адекватную лучевую терапию получают менее 30% онкологических больных [1], то к наиболее приемлемым для активного внедрения методам можно отнести бинарную, и в частности, фотон-захватную терапию (ФЗТ). В условиях облучения фотонами, благодаря введению в опухоль препаратов на основе лекарственных средств, содержащих металлы с атомным номером ≥ 53 (I, Gd, Au, Pt и др.) [3], в мишени происходит дополнительное энерговыделение за счёт электронов фотопоглощения и сопутствующего Оже-каскада [4].

Вместе с тем, ограниченный спектр соединений для фотон-захватной терапии и их свойства (высокая цитотоксическая активность, излишняя вязкость, недостаточная биодоступность, низкая селективность накопления металла в опухоли и др.) не позволяют перейти к широкому клиническому внедрению метода с использованием типовых терапевтических рентгеновских аппаратов, которыми, как правило, снабжены профильные центры [5].

Соответствие целям ФЗТ подтверждено для соединений, содержащих гадолиний и золото [6, 7]. На основе этих элементов ведётся синтез новых соединений, обладающих более высокими туморотропными свойствами. Перспективными соединениями являются вещества на основе гиалуроновой кислоты и золота, которые отличаются физиологичностью, ускоренной биodeградацией, высокими градиентами концентраций в опухоли по отношению к другим тканям организма, отсутствием или низким цитотоксическим эффектом [8-10].

В рамках проведённых на клетках мышиной меланомы B-16 опытов изучена динамика накопления золотосодержащего соединения на основе гиалуроновой кислоты и меланина, установлен (по показателю 10% выживаемости клеток [10]) диапазон концентраций, не обладающих цитотоксическим действием [9], но позволяющий существенно повысить эффективность дозы облучения. В опытах *in vivo* на мышах с привитой на голень асцитной карциномой Эрлиха после проведения ФЗТ с использованием гадолинийсодержащего препарата в зависимости от дозы облучения (18,8 до 31,7 Гр) выигрыш в терапевтическом эффекте, оценённом по индексу роста опухоли, варьировал в пределах 1,5-4,5 раз [3]. По расчётным данным, полученным методом Монте-Карло (программный комплекс MCNP5 [11]), выигрыш в поглощённой дозе за счёт применения соединений золота может достигать двух раз [12].

Целью данного исследования явилось изучение эффективности ФЗТ в экспериментах *in vivo* на крысах с перевитой опухолью саркома M-1 при использовании синтезированного нанокompозита золота на основе гиалуроновой кислоты и меланина.

Материалы и методы

Объект исследования. Исследования *in vivo* проводили на нелинейных крысах-самцах массой 150-200 г с модельной солидной опухолью саркома M-1, полученной из Банка экспериментальных опухолевых штаммов Российского онкологического научного центра. Животных содержали в стандартных условиях вивария экспериментального сектора МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Крысам с помощью троакара имплантировали подкожно в бедро правой задней лапки кусочек опухолевой ткани массой $\sim 0,2$ г. Опыты проводили на животных, когда объём опухоли достигал около 1 см^3 .

Характеристика, способ применения и контроль содержания Au в соединении для ФЗТ. Водорастворимый биоактивный наноккомпозит на основе химически модифицированной соединениями из ряда меланинов соли гиалуроновой кислоты и наночастиц золота был синтезирован в Международном научно-исследовательском центре инновационных технологий «МАРТИНЕКС» (Россия, Москва). Введение меланина в состав соединения позволяет восстанавливать и стабилизировать металл путём образования между функциональными группами меланина с золотом координационной связи – хелатов или слабых комплексов [13]. Для уточнения содержания золота в аликвоте для внутриопухолевого введения водный раствор вещества анализировали с использованием оптического эмиссионного метода с индуктивно связанной плазмой в качестве атомизатора на приборе ICP-OES (Varian, Австралия). В результате проведённых исследований установлено, что в 1 мл раствора содержится $20,8 \pm 0,3$ мкг Au.

Золотосодержащее соединение вводили в опухоль через 12 сут после перевивки (объём опухоли $1,1 \pm 0,3$ см³), четырёхкратно обкалывая опухоль, в объёме 0,4 мл (из расчёта 4 мкг золота на животное) за 15 мин до проведения сеанса облучения. Такой способ введения был обусловлен тем, что при однократном введении наноккомпозитов золота на основе гиалуроновой кислоты отмечается неравномерное распределение металла: в зоне введения содержание Au составляет около 50% от введённого количества, и даже через 3 ч после введения перераспределения металла по объёму опухоли не наблюдается [8].

Определение концентрации золота в опухоли спустя 15 мин после введения золотосодержащего вещества проводили на анализаторе ICP-OES. Пробоподготовку биоматериала после забоя животного и приготовление прозрачных образцов на определение содержания Au осуществляли по ранее разработанной методике [8]. Анализ показал, что на момент облучения в опухоли содержалось около 500 мкг золота, что составляет 12,5% от введённого количества.

Облучение животных. Облучение проводили на рентгеновской установке для радиационной обработки крови и её компонентов – СОУК (ООО «Диагностика-М», Россия). Источники излучения – две рентгеновские трубки, установленные в излучателях РАП 220-5, напряжение на аноде – 180 кВ, средний ток – 5 мА.

По достижении объёма опухоли ~ 1 см³ крысы подвергали локальному (зона опухоли) воздействию рентгеновского излучения в дозе 28 Гр как самостоятельно, так и после предварительного внутриопухолевого введения золотосодержащего соединения (4 мкг Au на животное), моделируя ФЗТ. Схема опыта предусматривала облучение животных без препарата в дозах 32 и 36 Гр. В каждой группе (всего 5 групп, включая контроль – без облучения и без применения каких-либо противоопухолевых средств) находилось не менее четырёх животных (в группе с введением золотосодержащего соединения – 8 животных).

Противоопухолевая эффективность. Определение размеров опухолей в период наблюдения проводили по методике, описанной в работе [14]. Противоопухолевую эффективность облучения рентгеновским излучением и экспериментальной фотон-захватной терапии оценивали по критериям подавления роста опухоли. Учитывали абсолютный ($V_{абс}$) и относительный объёмы опухолей ($V_{отн} = V_{ti}/V_o$, где V_{ti} – объём опухоли в см³ на i сутки после сеанса облучения, V_o – объём опухоли на момент воздействия, 0 сут); индекс торможения роста (ИТР) опухоли, определяемый как отношение среднего объёма опухолей в контрольной группе животных в конце опыта к тому же показателю в группе животных, подвергнутых воздействию; коэффициент роста опухоли (в %) рассчитывали по формуле $K_{po} = (V_{ti} - V_o)/V_o \cdot 100\%$. Коэффициент эффективности воздействия облучения (в том числе в сочетании с внутриопухолевым введением золотосодержащего соединения) определяли путём нормирования показателя (по $V_{абс}$

или $V_{отн}$) на 1 Гр дозы локального облучения: $K_{эфф} = \Delta/D \cdot 100\%$, где Δ – разность величины показателя в контрольной и опытной группах, D – доза облучения, Гр. Так же в работе определяли развитие кожных реакций на различные сроки после воздействия.

Статистическая обработка. Полученные данные обрабатывали при помощи статистического программного обеспечения R (www.R-project.org) версии 3.2.3 и графического приложения Veusz версии 1.23.2. Рассчитывали оценку среднего значения ($\bar{x}$) и несмещённую оценку стандартного отклонения среднего значения ($S_{\bar{x}}$). Различия считались значимыми при $p < 0,05$ [15, 16].

Результаты и обсуждение

Локальное однократное воздействие рентгеновским излучением на крыс с имплантированной опухолью саркома М-1, в целом, приводило к значительному подавлению роста опухоли (по сравнению с контрольной группой – без воздействия, табл. 1) с определёнными тенденциями в зависимости от варианта опыта и сроков наблюдения (рис. 1).

В течение первой недели наблюдения (3 и 7 сут после облучения) во всех опытных группах отмечали небольшой рост опухоли по сравнению с исходными значениями: величина показателя относительного объёма опухоли $V_{отн}$ (средние значения) увеличивалась на 15-33%. Вместе с тем, значимых различий в динамике роста опухоли в зависимости от дозы облучения (в диапазоне доз 28-36 Гр) не отмечено.

Таблица 1

Динамика роста опухоли саркома М-1 ($V_{отн}$) у крыс, не подвергавшихся облучению (контрольная группа)

Показатель	Сроки наблюдения, сут						
	*0	3	7	10	13	17	27
Относительный объём опухоли, $V_{отн}$ (отн. ед.)	1,1±0,2	1,3±0,3	2,3±0,7	3,6±1,2	5,0±2,1	6,1±2,8	11,1±5,1

* – Момент облучения экспериментальных групп.

Рис. 1. Динамика роста опухоли саркома М-1 ($V_{отн}$) в зависимости от дозы рентгеновского излучения (кривые: 1 – 28 Гр, 2 – 32 Гр, 3 – 36 Гр) и при моделировании ФЗТ (кривая 4 – 28 Гр и внутриопухолевое введение препарата из расчёта 4 мг Au на животное).

Начиная с 10 сут после воздействия, выявлено выраженное подавление роста опухоли при облучении в дозе 36 Гр, достигающее наибольшего эффекта на 17 сут ($V_{отн}=0,3$ ед.) при сохранении этих же значений в течение всего оставшегося срока наблюдения (27 сут после облучения). Максимальный рост опухоли в опытных группах отмечен при облучении в дозе 28 Гр на 27 сут после воздействия: превышение по сравнению с величиной показателя до облучения составляло 85%. Следует отметить, что в контроле увеличение объема опухоли за тот же период было более существенным и превышало первоначальные значения в 11 раз (табл. 1).

Воздействие рентгеновского излучения в дозе 28 Гр при дополнительном внутриопухолевом введении золотосодержащего соединения (4 мг Au) за 15 мин до облучения свидетельствует о лучшей противоопухолевой эффективности: в этом варианте опыта подавление роста опухоли (по $V_{отн}$) наступало уже на 10 сут после облучения, а прирост объема опухоли через 27 сут после наблюдения составлял 20% от исходных значений, тогда как в группе облучения 28 Гр – 85% (рис. 1). Выигрыш в эффективности по показателю $V_{отн}$ на 27 сут после облучения был немногим более 35%. Примечательно, что в исследованиях [17], проведенных при локальном рентгеновском облучении (30 Гр) мышей с карциномой ЕМТ-6 после однократного внутривенного введения наночастиц золота диаметром 1,9 нм (1,35 мг Au/г массы животного), через 30 сут после экспериментального сеанса фотон-захватной терапии у 90% животных наблюдали полную регрессию опухоли, в то время как у мышей, подвергшихся только облучению, опухоль за период наблюдения увеличилась в объеме в 5 раз.

Полученная нами кривая динамики роста опухоли при экспериментальной ФЗТ (облучение крыс в дозе 28 Гр и введение в опухоль Au в составе соединения с гиалуроновой кислотой и меланином) была близка к кривой при облучении животных в дозе 32 Гр (площади под кривыми динамики роста опухоли составили 31,0 и 31,3 усл. ед. для групп животных, облученных в дозах (28 Гр + Au) и 32 Гр соответственно). Это позволяет сделать заключение о соизмеримости противоопухолевого эффекта в этих группах животных. По показателю относительного объема опухоли ($V_{отн}$) выигрыш на 27 сут при сравнении эффектов облучения в группе экспериментальной ФЗТ и группе облучения в дозе 32 Гр составил около 8%.

Величина индекса торможения роста опухоли для группы облучения 28 Гр составила 6,5 ед., для группы экспериментальной ФЗТ – 8,2 ед.: выигрыш в эффекте при введении золотосодержащего препарата в опухоль – 26%.

Оценка динамики изменения величин коэффициента роста ($K_{ро}$) саркомы М-1 в разных вариантах опыта и на разные сроки наблюдения (табл. 2) с учетом первоначального их объема (средние значения в группе) свидетельствует о близком характере направленности проявления эффектов после локального облучения животных. Вместе с тем, и по этому показателю отмечены различия в динамике $K_{ро}$ для групп животных, облученных в дозах 28-32 и 36 Гр. В группе экспериментальной ФЗТ (28 Гр + Au) через 27 сут после воздействия величина $K_{ро}$ на $\approx 18\%$ была ниже, чем при только локальном облучении в той же дозе.

Расчет коэффициента эффективности ($K_{эфф}$) облучения, нормированного на 1 Гр, показал, что в экспериментальной группе фотон-захватной терапии (28 Гр + Au) по сравнению с группой, где животных облучали только в дозе 28 Гр, эффективность подавления роста опухоли в разные сроки наблюдения, в первую очередь в течение 10 сут с момента облучения, была различной (табл. 3). Это может свидетельствовать как о разных механизмах клеточной гибели, развивающейся на различных временных отрезках постлучевого периода, так и об усилении в

этот период одного из путей клеточной гибели, например, апоптоза [18]. При этом максимальный выигрыш в дозе, около 10%, наблюдали на 3 день, в течение последующих двух недель, а затем он снижался до 5-3%. Таким образом, анализ данных по этому критерию показал, что в группе экспериментальной ФЗТ происходит более выраженная гибель опухолевых клеток в первой декаде после облучения по сравнению с воздействием только облучения в дозе 28 Гр. В последующем различия нивелируются.

Таблица 2

**Динамика изменения коэффициента роста (K_{po}) крысиной саркомы М-1
в зависимости от параметров облучения (%)**

Доза, Гр	Сроки наблюдения, сутки после облучения					
	3	7	10	13	17	27
28	27±16	15±26	15±14*	23±20**	31±23**	85±46**
28 (+ Au)	27±9	16±10	7±13*	-2±13**	16±13**	70±15*
32	33±32	26±27	19±27*	4±27**	4±23**	26±32**
36	25±10	17±6	-8±7*	-42±10*	-67±6*	-67±8*
0 (Контроль)	29±52	129±100	264±160	400±214	514±270	1014±414

* – Различия по сравнению с контролем значимы при $p < 0,05$.

♦ – Различия по сравнению с группой животных, облучённых в дозе 36 Гр, значимы при $p < 0,05$.

Проведённый в рамках исследования анализ содержания золота в образцах опухоли через 15 мин после введения свидетельствует о том, что только 13% элемента удерживается в объёме опухоли (около 500 мкг золота). Вместе с тем, для достижения двукратного выигрыша в поглощённой дозе рентгеновского излучения, как показали расчёты, проведённые нами методом Монте-Карло, содержание золота в опухоли на момент облучения должно составлять 10 мг [12]. При этом уменьшение количества золота в опухоли приводит к пропорциональному снижению дозы. То есть, при содержании золота 0,5 мг можно было ожидать увеличения физической дозы на 5% (в нашем случае изменение дозы оказалось существенно выше – 14% – в 2,8 раза больше ожидаемого). По радиобиологическому показателю – ИТР – выигрыш составил 26%. Это свидетельствует об определённой биологической эффективности образующегося при реакциях фотон-захватного взаимодействия рентгеновского излучения и атомов золота вторичного излучения (Оже-электроны и низкоэнергетические фотоны).

Таблица 3

**Коэффициент эффективности ($K_{эфф}$) облучения в экспериментальной группе
фотон-захватной терапии (28 Гр + Au, 4 мг/опухоль) и при облучении 28 Гр
(расчёт по $V_{абс}$ и $V_{отн}$) (%)**

Изменение показателя на 1 Гр (Δ/D), %	Сроки наблюдения, сутки после облучения				
	7	10	13	17	27
28 Гр + Au					
$\Delta V_{абс}/D$	6,8±4,3	13,9±7,2	21,1±9,1	26,1±11,2	48,9±17,4
$\Delta V_{отн}/D$	4,1±4,0	8,9±6,1	14,4±8,3	17,6±10,1	35,4±16,5
28 Гр					
$\Delta V_{абс}/D$	6,1±4,5	12,9±7,1	19,3±9,0	24,6±11,0	47,1±17,2
$\Delta V_{отн}/D$	4,1±4	8,8±6,0	13,6±8,1	17,1±10,1	33,0±17,3
(28 Гр + Au) / 28 Гр, %					
$V_{абс}$	111,8	108,3	109,3	105,8	103,8
$V_{отн}$	99,1	102,0	105,8	102,9	107,0

Сравнение степени развития кожных реакций при рентгеновском облучении в дозе 28 Гр без и при внутриопухолевом введении золотосодержащего соединения (вариант экспериментальной ФЗТ) не выявило значимых отличий: площади под кривыми динамик их проявления в течение 27 сут после облучения, отличие составило менее 1% (рис. 2). Вместе с тем, прирост числа кожных реакций в группе животных, облучённых в дозе 32 Гр, по сравнению с дозовой нагрузкой 28 Гр (сравнение площадей под кривой) составил 19%, в дозе 36 Гр – более 50%.

Рис. 2. Динамика изменения реакции нормальных тканей, попадающих в поле облучения (кожные реакции) при различных вариантах локального воздействия рентгеновского излучения (кривые: 1 – 28 Гр, 2 – 32 Гр, 3 – 36 Гр) и при моделировании ФЗТ (кривая 4 – 28 Гр и внутриопухолевое введение препарата из расчёта 4 мг Au на животное).

Сравнение эффектов экспериментальной фотон-захватной терапии (28 Гр + 4 мг Au) в модельном опыте с крысиной саркомой М-1 с группой, получившей 28 Гр, по разным критериям оценки свидетельствует о вариативности величины выигрыша ФЗТ практически от 1,1 до 1,4 раза (табл. 4). При этом сравнение с группой, получившей дозу 32 Гр, показывает, в зависимости от используемого критерия оценки, как наличие, так и отсутствие эффекта. Это подтверждает необходимость корректного выбора критерия оценки (с учётом планируемой дозы облучения, исключающей риски недостижения необходимого эффекта или проявления постлучевых реакций) и предполагает разработку комплексного оценочного теста.

Таблица 4

Сравнение различных критериев оценки эффективности экспериментальной фотон-захватной терапии (28 Гр + 4 мг Au) и локального рентгеновского облучения в дозах 28 и 32 Гр

Критерий оценки*	Выигрыш в эффекте (%) группы экспериментальной ФЗТ (28 Гр + 4 мг Au) относительно локального облучения в дозах:	
	28 Гр	32 Гр
$V_{отн}$	35	7,7
ИТР	26	- 25
$K_{ро}$	18	- 63
Площадь под кривой изменения $V_{отн}$ (для всего срока наблюдения)	14	- 1
$K_{эфф}$ (по $V_{отн}$)	7	1
$K_{эфф}$ (по $V_{абс}$)	4	- 1
Кожные реакции	0	- 19

* Примечание: приведены данные показателей на 27 сут после облучения; (-) – означает, что эффект в группе ФЗТ меньше, чем в группе сравнения.

Заключение

Интерес к фотон-захватной терапии, как и к другим методам бинарной лучевой терапии [19, 20], обусловлен необходимостью повышения излечения онкологических больных при снижении риска развития постлучевых реакций. Эффективность фотон-захватной терапии, осуществляемой с использованием композитов ряда металлов, обладающих свойствами индуцировать дополнительное энерговыделение в мишени в процессе облучения, во многом зависит от характеристик металлосоединений. В последнее время всё большее внимание уделяется применению в диагностических и лечебных целях физиологически инертных частиц, таких как наночастицы золота, характеризующихся уникальными оптико-электрическими свойствами [21, 22].

В наших предыдущих исследованиях *in vitro* на клетках мышинной меланомы В-16, культивируемых в монослое по стандартной методике, были определены дозы отечественного золотосодержащего соединения на основе гиалуроновой кислоты и меланина, вызывающие цитотоксический эффект, оцениваемый по торможению клеточной пролиферации [9]. Последующая инкубация клеток в среде с золотосодержащим соединением (100 мкг Au/мл) в течение 24 ч перед облучением в разных дозах позволила определить значение коэффициента ОБЭ (по показателю 10% выживаемости клеток), которое колебалось в пределах 1,5-2,0 [10]. В этой серии опытов содержание золота в клетках находилось на уровне 14-18 мкг/мл, что составляло 14-18% от общего количества золота, введённого в составе золотосодержащего соединения в питательную среду. Результаты наших опытов согласуются с данными другого исследования, где в модельном опыте на мышах с меланомой В-16 после введения соединения с наночастицами золота в сочетании с облучением (линейный ускоритель Varian 2100С, энергия электронов 6 МэВ) отмечено значительное замедление роста опухоли [18]. При этом авторами установлено, что наночастицы золота (сферическая форма, 13 нм) в клетках меланомы В-16 локализуются в эндоплазматическом ретикулеуме и комплексе Гольджи при инкубации в течение 18 ч, что может способствовать увеличению апоптотического потенциала клеток после облучения.

В ряде исследований для характеристики дополнительного эффекта от фотон-захватных соединений вместо коэффициента ОБЭ используют фактор изменения дозы (ФИД), который рассчитывается как отношение равноэффективных доз облучения в присутствии и отсутствии радиомодифицирующего агента. Так, на фибробластах человека при их инкубации в среде с содержанием золота 100 мкг/мл (аналогичной выбранной нами в опытах на клетках меланомы В-16) значения ФИД составили 1,32 [20]. В наших исследованиях на крысах с саркомой М-1 изменение дозы составило 14%.

В целом следует отметить значительный интерес многих исследовательских групп и общие методологические подходы к решению актуальных задач ФЗТ. При этом как в исследованиях *in vitro*, так и в модельных опытах *in vivo* результаты отличаются в зависимости от характеристик и параметров облучения, изучаемого соединения, концентрации и размера частиц элемента и его химической характеристики, а также используемой тест-системы.

В наших исследованиях показатели оценки эффективности ФЗТ выбраны как с точки зрения их информативности, так и доступного и быстрого практического выполнения. В целом, полученные нами результаты (выигрыш в эффективности ~ в 1,1-1,4 раза) находятся в тех же пределах, что и представленные в других опубликованных работах. Важным преимуществом наших разработок является то, что экспериментально показан выигрыш в дозе (4 Гр) при отсутствии кожных реакций, а также использование отечественного препарата, химические характеристики которого (препаративная форма, концентрация золота, меланина и др.) могут быть усилены (туморотропность, биораспределение и др.), что позволит достичь более значимой эффективности фотон-захватной терапии.

Выявленные различия при использовании разных критериев эффективности экспериментальной фотон-захватной терапии (относительный объём опухоли, индекс торможения роста и коэффициент роста опухоли, коэффициент эффективности облучения, проявление кожных реакций) свидетельствуют о необходимости разработки комплексного методологического подхода, объединяющего расчётные данные и результаты радиобиологических экспериментов в условиях *in vitro* и *in vivo*, являющихся основой создания медицинских технологий.

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Калужской области (проект № 14-44-03084).

Литература

1. Давыдов М.И., Голанов А.В., Канаев С.В., Костылев В.А., Матякин Г.Г., Мардынский Ю.С., Панышин Г.А., Ткачёв С.И., Хмелевский Е.В., Юрьева Т.В. Анализ состояния и концепция модернизации радиационной онкологии и медицинской физики в России //Вопросы онкологии. 2013. Т. 59, № 5. С. 529-538.
2. Каприн А., Ульяненко С. Адронная терапия – точки развития //Медицина: целевые проекты. 2016. № 23. С. 56-59.
3. Хохлов В.Ф., Кулаков В.Н., Шейно И.Н., Насонова Т.А., Митин В.Н., Добрынина О.А. Способ фотон-захватной терапии опухолей. Патент РФ № 2270045. Бюл. № 5. 20.02.2004.
4. Kobayashi K., Usami N., Porcel E., Lacombe S., Le Sech C. Enhancement of radiation effect by heavy elements //Mutat. Res. 2010. V. 704. P. 123-131.
5. Хохлов В.Ф., Ижевский П.В., Кулаков В.Н., Липенголец А.А., Слободяник И.И., Федотов Ю.А. Фармакокинетическая оценка препаратов для бинарной лучевой терапии в рамках скринингового исследования //Российский биотерапевтический журнал. 2009. Т. 8, № 1. С. 25.
6. Черепанов А.А., Липенголец А.А., Насонова Т.А., Добрынина О.А., Кулаков В.Н., Шейно И.Н., Хохлов В.Ф., Климанов В.А., Григорьева Е.Ю. Увеличение противоопухолевого эффекта рентгеновского облучения при помощи гадолиний-содержащего препарата на примере мышей с трансплантируемой меланомой B16F10 //Медицинская биофизика. 2014. № 3. С. 66-69.
7. Rahman W.N., Bishara N., Ackerly T., He C.F., Jackson P., Wong C., Davidson R., Geso M. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy //Nanomedicine. 2009. V. 5. P. 136-142.
8. Koryakin S.N., Yadrovskaya V.A., Beketov E.E., Isaeva E.V., Ulyanenko S.E., Uspenskiy S.A., Khabarov V.N., Selyanin M.A. The study of hyaluronic acid compounds for neutron capture and photon activation therapies //Cent. Eur. J. Biol. 2014. V. 9, N 10. P. 922-930.
9. Корякин С.Н., Ульяненко С.Е., Исаева Е.В., Бекетов Е.Е., Ядровская В.А., Успенский С.А., Селянин М.А. Оценка цитотоксичности и накопления в опухоли золотосодержащих соединений на основе гиалуроновой кислоты //Радиация и риск. 2015. Т. 24, № 3. С. 115-124.
10. Корякин С.Н., Исаева Е.В., Ульяненко С.Е., Бекетов Е.Е., Трошина М.В., Ядровская В.А. Изучение эффектов фотон-захватной терапии по тесту клоногенной активности клеток меланомы В-16 //Труды регионального конкурса проектов фундаментальных научных исследований. Калуга, 2016. Вып. 21. С. 204-210.
11. X-5 Monte Carlo Team. MCNP – A General Monte Carlo N-Particle Transport Code, Version 5. Volume I: Overview and Theory. LA-UR-03-1987, 2005.
12. Ульяненко С.Е., Соловьев А.Н., Литяев В.М., Федоров В.В., Корякин С.Н. Математическое моделирование фотон- и протон-захватной терапии с использованием препаратов золота //Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2016. № 5. С. 59-64.
13. Apte M., Girme G., Bankar A., RaviKumar A., Zinjarde S. 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine-derived melanin from Yarrowia lipolytica mediates the synthesis of silver and gold nanostructures //J. Nanobiotechnology. 2013. V. 11, N 2. P. 1-9.
14. Южаков В.В., Кветной И.М., Кузнецова М.Н., Хавинсон В.Х., Фомина Н.К. Кинетика роста и функциональная морфология саркомы М-1 у интактных крыс после гамма-облучения //Вопросы онкологии. 2001. Т. 47, № 3. С. 328-334.
15. Урбах В.Ю. Биометрические методы. М.: Наука, 1964. 415 с.
16. Химмельблау Д. Анализ процессов статистическими методами. М.: Мир, 1975. 297 с.
17. Hainfeld J., Slatkin D., Smilowitz H. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice //Phys. Med. Biol. 2004. V. 49, N 18. P. 309-315.

18. **Chang M.-Y., Shiao A.-L., Chen Y.-H., Chang C.-J., Chen H.-H., Wu C.-L.** Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice //Cancer Sci. 2008. V. 99, N 7. P. 1479-1484.
19. **Ceresa C., Bravin A., Cavaletti G., Pellei M., Santini C.** The combined therapeutical effect of metal-based drugs and radiation therapy: the present status of research //Curr. Med. Chem. 2014. V. 21, N 20. P. 2237-2265.
20. **McQuade C., Al Zaki A., Desai Y., Vido M., Sakhuja T., Cheng Z., Hickey R.J., Joh D., Park S.J., Kao G., Dorsey J.F., Tsourkas A.A.** Multifunctional nanoplatform for imaging, radiotherapy, and the prediction of therapeutic response //Small. 2015. V. 11, N 7. P. 834-843.
21. **Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкманов Л.А., Хлебцов Б.Н.** Золотые наноструктуры с плазмонным резонансом для биомедицинских исследований //Российские нанотехнологии. 2007. Т. 2, № 3. С. 69-86.
22. **Simon T., Boca-Farcau S., Gabudean A.M., Baldek P., Astilean S.J.** LED-activated methylene blue-loaded Pluronic-nanogold hybrids in vitro photodynamic therapy //Biophotonics. 2013. V. 6, N 11-12. P. 950-953.

The efficiency of the photon capture therapy with gold containing compounds based on hyaluronic acid (experimental study)

**Koryakin S.N.¹, Ulyanenko S.E.¹, Isaeva E.V.¹, Beketov E.E.¹, Ulyanenko L.N.¹,
Uspenskiy S.A.^{2,3}, Selyanin M.A.², Zelenetskii A.N.³**

¹ A. Tsyb MRRC, Obninsk;

² Martinex Research Centre, Moscow;

³ Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials of RAS (ISPM RAS), Moscow

The efficiency of the photon capture therapy with synthesized gold-containing nanocomposite for experimental sarcoma M-1 was estimated. To simulate photon capture irradiation the animals were exposed to single X-ray dose of 28 Gy delivered to the tumor following administration of a single dose of gold-containing compound based on hyaluronic acid and melanin. The composite was injected intratumorally in the amount of 4 mg of gold per animal 15 minutes before irradiation. Dynamic curves of tumor growth for 27 days after X-ray exposure of rats with the injected gold composite were similar to tumor growth curves after single local X-ray exposure to 32 Gy. The absorbed dose reduction due to photon-capturing events was 4 Gy (about 14%). Efficiency of experimental photon capture therapy was estimated by comparison of tumor growth inhibition indexes. The experimental photon-capture therapy was by 26% more efficient than local acute X-rays irradiation. No significant difference in skin reactions yield was observed. The obtained results showed the gold-containing nanocomposite based on hyaluronic acid and melanin to be promising agent for photon-capture therapy. The observed difference between therapeutic efficiency estimates due to the use of different criteria, such as relative tumor volume, tumor growth inhibition index, tumor growth factor, irradiation efficiency ratio, skin reactions yield, highlights the need to develop a multifaceted approach for creating the medical technology.

Key words: *photon-capture therapy, X-ray, gold compound, nanoparticles, hyaluronic acid, melanin, rats with sarcoma M-1, intratumoral administration, absorbed dose, anti-tumor efficiency, skin reaction yield.*

Koryakin S.N.* – Head of Lab., C. Sc., Biol.; **Ulyanenko S.E.** – Head of Dep., D. Sc., Biol.; **Isaeva E.V.** – Sen. Res., C. Sc., Vet.; **Beketov E.E.** – Head of Lab., C. Sc., Biol.; **Ulyanenko L.N.** – Lead. Res., D. Sc., Biol. A. Tsyb MRRC. **Uspenskiy S.A.** – Sen. Res., C. Sc., Chem. ISPM RAS. **Selyanin M.A.** – President Martinex RC. **Zelenetskii A.N.** – Head of Lab., D. Sc., Chem. Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials of RAS (ISPM RAS), Moscow.

*Contacts: 4 Korolev str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249036. Tel.: (484) 399-72-76, e-mail: korsernic@mail.ru.

References

1. **Davidov M.I., Golan A.V., Kanaev S.V., Kostilev V.A., Matyakin G.G., Mardinsky Yu.S., Panshin G.A., Tkachev S.I., Chmielewski E.V., Yur'eva T.V.** Analiz sostoyaniya I koncepciya modernizacii radiacionnoi onkologii I medicinskoj fiziki [Analysis of the state and the concept of modernization of radiation oncology and medical physics. *Voprosy onkologii – Questions of Oncology*, 2013, vol. 59, no 5, pp. 529-538.
2. **Kaprin A., Ulyanenko S.** Adronnaya terapiya – tochki razvitiya [Hadron therapy – development point]. *Medicina: celevye proekty – Medicine: targeted projects*, 2016, no. 23. pp. 56-59.
3. **Khokhlov V.F., Kulakov V.N., Shano I.N., Nasonova T.A., Mitin V.N., Dobrynina O.A.** Sposob foton-zahvatnoi terapii opuholei [Method of photon-capture tumor therapy]. RF Patent № 2270045. Bul. № 5. 20.02.2004.
4. **Kobayashi K., Usami N., Porcel E., Lacombe S., Le Sech C.** Enhancement of radiation effect by heavy elements. *Mutation Res.*, 2010, vol. 704, pp. 123-131.
5. **Hohlov V.F., Izhevskij P.V., Kulakov V.N., Lipengolc A.A., Slobodjanik I.I., Fedotov Ju.A.** Farmakokineticheskaja ocenka preparatov dlja binarnoj luchevoj terapii v ramkah skринingovogo issledovaniya [Pharmacokinetic evaluation of drugs for binary radiation therapy as part of a screening study]. *Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal – Russian Biotherapeutic Journal*, 2009. vol. 8, no. 1, pp. 25.
6. **Cherepanov A.A., Lipengol'c A.A., Nasonova T.A., Dobrynina O.A., Kulakov V.N., Shejno I.N., Hohlov V.F., Klimanov V.A., Grigor'eva E.Ju.** Uvelichenie protivopuholevogo jeffekta rentgenovskogo obluchenija pri pomoshhi gadolinij soderzhashhego preparata na primere myshej s transplantiruemoj melanomoj B16F10 [The increase in the antitumor effect of X-ray irradiation using gadolinium-containing drug on mice with transplanted example melanoma B16F10]. *Medicinskaja biofizika – Medical Biophysics*, 2014, no. 3, pp. 66-69.
7. **Rahman W.N., Bishara N., Ackerly T., He C.F., Jackson P., Wong C., Davidson R., Geso M.** Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine*, 2009, vol. 5, pp. 136-142.
8. **Koryakin S.N., Yadrovskaya V.A., Beketov E.E., Isaeva E.V., Ulyanenko S.E., Uspenskiy S.A., Khabarov V.N., Selyanin M.A.** The study of hyaluronic acid compounds for neutron capture and photon activation therapies. *Cent. Eur. J.Biol.*, 2014, vol. 9, no. 10, pp. 922-930.
9. **Koryakin S.N., Ulyanenko S.E., Isaeva E.V., Beketov E.E., Yadrovskaya V.A., Uspenskiy S.A., Selyanin M.A.** Ocenka citotoksichnosti I nakopleniya v opuholi zolotosoderzhachih soedinenii na osnove gialuronovoi kisloti [Evaluation of cytotoxicity and tumor accumulation of gold compounds on the basis of hyaluronic acid]. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2015, vol. 24, no 3, pp. 115-124.
10. **Koryakin S.N., Isaeva E.V., Ulyanenko S.E., Beketov E.E., Troshina M.V., Yadrovskaya V.A.** Izuchenie effectov foton-zahvatnoi terapii po testy klonogennoi aktivnosti kletok melanoma B-16 [Studying the effects of photon capture therapy on test clonogenic activity of cells melanoma B-16]. *Proceedings of the regional competition of fundamental research projects*. Kaluga, 2016, vol. 21, pp. 204-210.
11. **X-5 Monte Carlo Team.** MCNP – A General Monte Carlo N-Particle Transport Code, Version 5. Volume I: Overview and Theory, LA-UR-03-1987, 2005.
12. **Ulyanenko S.E., Soloviev A.N., Lityaev V.M., Fedorov V.V., Koryakin S.N.** Matematicheskoe modelirovanie foton I proton-zachvatnoi terapii s ispolzovaniem prepatatov zolota [Mathematical modeling of photon and proton-capture therapy using gold preparations]. *Medicinskaja radiologija i radiacionnaja bezopasnost' – Nuclear Medicine and Radiation Safety*, 2016, no. 5, pp. 59-64.

13. **Apte M., Girme G., Bankar A., RaviKumar A., Zinjarde S.** 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine-derived melanin from *Yarrowia lipolytica* mediates the synthesis of silver and gold nanostructures. *J. Nanobiotechnology*, 2013, vol. 11, no. 2, pp. 1-9.
14. **Yuzhakov V.V., Kvetnoy I.M., Kuznetsova M.N., Havinson V.X., Fomina N.K.** Kinetika rosta i funktsionalnaya morfologiya sarkomi M-1 y intaktnih kris posle gamma-oblycheniya [The kinetics and growth morphology functional sarcoma M-1 in intact rats after gamma-irradiation]. *Voprosy onkologii – Questions of Oncology*, 2001, vol. 47, no. 3. pp. 328-334.
15. **Urbah Ju.V.** Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovaniyakh [Statistical analysis in biological and medical research]. Moscow, Medicina, 1964. 415 p.
16. **Himmelblau D.** Analiz processov statisticheskimi metodami [Process Analysis by Statistical Methods]. Moscow, Mir, 1975. 297 p.
17. **Hainfeld J., Slatkin D., Smilowitz H.** The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.*, 2004, vol. 49, no. 18, pp. 309-315.
18. **Chang M.Y., Shiau A.L., Chen Y.H., Chang C.J., Chen H.H., Wu C.L.** Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci.*, 2008, vol. 99, no. 7, pp. 1479-1484.
19. **Ceresa C., Bravin A., Cavaletti G., Pellei M., Santini C.** The combined therapeutical effect of metal-based drugs and radiation therapy: the present status of research. *Curr. Med. Chem.*, 2014, vol. 21, no. 20, pp. 2237-2265.
20. **McQuade C., Al Zaki A., Desai Y., Vido M., Sakhuja T., Cheng Z., Hickey R.J., Joh D., Park S.J., Kao G., Dorsey J.F., Tsourkas A.A.** Multifunctional nanoplatform for imaging, radiotherapy, and the prediction of therapeutic response. *Small*, 2015, vol. 11, no. 7, pp. 834-843.
21. **Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A., Dykmanov L.A., Khlebtsov B.N.** Zolotie nanostryktyri s plazmonnim rezonansom dlya biomedicinskih issledovaniy [Gold nanostructures with a plasmon resonance for biomedical research]. *Rossiyskie nanotekhnologii – Russian Nanotechnologies*, 2007, vol. 2, no 3, pp. 69-86.
22. **Simon T., Boca-Farcau S., Gabudean A.M., Baldek P., Astilean S.J.** LED-activated methylene blue-loaded Pluronic-nanogold hybrids in vitro photodynamic therapy. *Biophotonics*, 2013, vol. 6, no. 11-12, pp. 950-953.