

МГНОВЕННОЕ СЕЛЕКТИВНОЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ УСИЛЕНИЕ ХИМИОРАДИОТЕРАПИИ РАКА ПРИ ПОМОЩИ ПЛАЗМОННЫХ НАНОПУЗЫРЬКОВ

Е. Лукьянова-Глеб¹, К. Рен¹, Р. Савант³, К. Ву¹, В. Торчилин³, Д. Ланотко^{1,4}

¹Факультет Биохимии и Биологии Клеток, Университет Райс, г. Хьюстон, Техас, США

²Факультет клинической профилактики рака, Университет Техаса,
Медицинский Раковый Центр Андерсона, г. Хьюстон, Техас, США

³Центр Фармацевтических Биотехнологий и Наномедицины,
Северо-Восточный Университет, г. Бостон, Массачусетс, США

⁴Факультет физики и астрономии, Университет Райс, г. Хьюстон, Техас, США

Основным ограничением эффективного и безопасного лечения агрессивных форм рака является их устойчивость к химио- и радиотерапии. Мы предложили и апробировали метод селективного внутриклеточного усиления химио- и химиорадиотерапии рака при помощи наночастиц золота и внутриклеточного взрывного воздействия, вызванного действием короткого лазерного импульса. Агрессивность опухоли является основополагающим фактором, определяющим эффективность формирования смешанных кластеров золотых наночастиц и наноносителей лекарств внутри раковых клеток. В результате воздействия короткого лазерного импульса и рентгеновского излучения на такой внутриклеточный кластер, происходит генерация плазмонного нанопузырька, вызывающего впрыск лекарства в цитоплазму клетки, и усиление рентгеновского излучения. Внутриклеточный синергизм взрывного воздействия плазмонного пузырька, впрыснутого лекарства и локального усиления рентгеновского излучения повышает эффективность химиорадиотерапии устойчивого к стандартному лечению агрессивного рака головы и шеи в 100 раз *in vitro* и в 17 раз *in vivo* при существенном снижении используемых в клинической практике доз лекарств до 2–3 % и рентгеновского излучения до 6 %. Кроме того, локальный характер используемых явлений и процессов существенно понижает неспецифическую токсичность воздействия на

нормальные клетки и ткани. Предложенный метод был назван квадрупля и включает в себя четыре клинически- апробированные компоненты и трансформирует стандартную макро-терапию в мгновенную внутриклеточную диагностико-терапевтическую процедуру с многократным усилением терапевтического эффекта и высокой селективностью.

ВВЕДЕНИЕ

Высокая смертность от рака вызвана, в первую очередь, агрессивностью некоторых его форм (рака головы и шеи, мозга, простаты, легких и др.) и их устойчивостью к химио- и радиотерапии, особенно в тех случаях, когда дозы используемых лекарств ограничены их неспецифической токсичностью. Полное удаление таких опухолей часто невозможно из-за их близости с жизненно важными здоровыми тканями, что приводит к опасной остаточной микроскопической болезни (ОМБ) [1]. Отсутствие возможности безопасного удаления или эффективной химиотерапии подобных агрессивных форм рака, в конечном счете, сокращает процент выживания пациентов и существенно ухудшает качество их жизни [2]. Именно поэтому крайне необходимо разработать инновационный подход, который позволит: (i) локально усилить эффективность стандартной терапии только в раковых клетках, (ii) сохранить функциональность локализованных здоровых

тканей и органов, и (iii) уменьшить неспецифичную токсичность и время лечения.

Предложенный нами метод внутриклеточного усиления химио- и радиотерапии, основан на внутриклеточном совместном применении четырех клинически- апробированных компонент (рис. 1): инкапсулированного лекарства, наночастиц коллоидного золота (ЗНЧ) [3, 4], лазерного излучения в ближнем инфра-красном спектральном диапазоне и рентгеновского излучения. Разработанный нами новый метод был назван «квадрапия». Мы предположили, что совместное применение четырех вышеуказанных компонент стимулирует новые терапевтические механизмы внутри раковых клеток (рис. 1). Во-первых, клетки самостоятельно интернализируют функционализированные антителами золотые наночастицы и наноносители лекарств и формируют, таким образом, смешанные внутриклеточные кластеры за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза. После этого, короткий лазерный импульс и рентгеновское излучение активируют вышеупомянутые кластер и запускают несколько локализованных внутриклеточных терапевтических процессов: взрывное механическое воздействие парового плазмонного нанопузырька (ПНП), мгновенный впрыск лекарства в цитоплазму клетки из механически разрушенных наноносителей и локальное усиление рентгеновского излучения. Внутриклеточный синергизм этих трех локальных, нестационарных и очень быстрых процессов усиливает терапевтический эффект стандартной химиорадиотерапии исключительно в раковых клетках.

Агрессивные и устойчивые к стандартной химио- и радиотерапии клетки плоскоклеточной карциномы головы и шеи были использованы нами для апробации квадрапии *in vitro* и *in vivo* с использованием клинически апробированных наночастиц коллоидного золота, инкапсулированного доксорубина и паклитаксела, пикосекундных лазерных импульсов и рентгеновского излучения.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутриклеточный, индуцированный плазмонными нанопузырьками, впрыск инкапсулированного лекарства

В работе использовались клетки плоскоклеточной карциномы головы и шеи HN31.

Основным биомаркером этих клеток является рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР), поэтому мы использовали клинически апробиро-

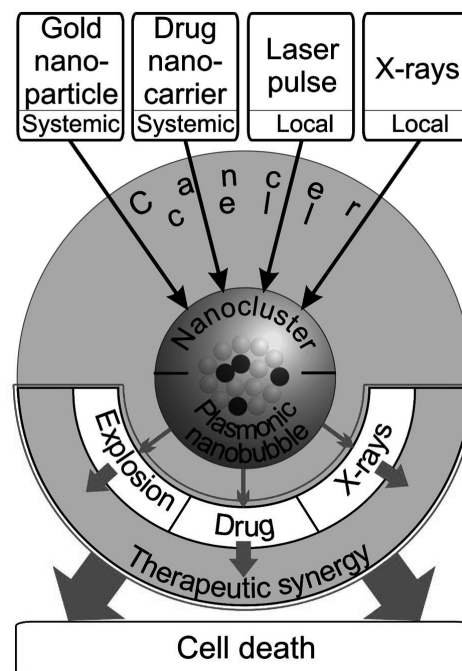


Рис. 1. Принцип квадрапии: четыре компонента – золотые наночастицы, инкапсулированное лекарство, короткий лазерный импульс с безорасной для нормальных тканей плотностью энергии и рентгеновское излучение – доставляются в простом трехшаговом протоколе: 1) раковые клетки формируют внутриклеточные нанокластеры из функционализированных антителами золотых наночастиц и наноносителей лекарств за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза; 2) мгновенная активация нанокластеров с помощью короткого лазерного импульса и рентгеновского излучения запускает локализованные внутриклеточные процессы: генерацию плазмонных нанопузырьков (ПНП), мгновенный впрыск лекарства в цитоплазму клетки, локальное усиление рентгеновского излучения; 3) пороговый характер и внутриклеточный синергизм этих трех процессов селективно усиливает терапевтический эффект стандартной химиорадиотерапии только в раковых клетках

ванное к РЭФР антитело C225 [5] для селективной доставки золотых наночастиц и наноносителей лекарств в раковые клетки. На первом этапе работы, мы использовали функционализированные антителами золотые наночастицы диаметром 60 нм и липосомы, содержащие зеленый флуоресцентный краситель, для исследования механизма внутриклеточного, индуцированного плаз-

монными нанопузырьками, впрыска инкапсулированного в липосомы вещества (красителя или лекарства). Высокий уровень экспрессии РЭФР в клетках HN31 обеспечил формирование в них смешанных внутриклеточных кластеров золотых наночастиц и липосом, которые были визуализированы методом рассеяния света ЗНЧ (рис. 2, а, слева), однако детектирование флуоресцентного красителя в интактных липосомах практически невозможно из-за его квенчинга (рис. 2, а, в центре и справа). Далее, клетки были однократно облучены коротким лазерным импульсом (длительность импульса 70 пс, длина волны 532 нм, плотность энергии 40 мДж/см²) с одновременным детектированием ПНП в рассеянном ими свете дополнительного пробного лазерного импульса (рис. 2, б, в центре). Положение ПНП совпадало с положением кластеров золотых наночастиц в клетках (рис. 2, б, слева) и, согласно регистрируемому термо-оптическому отклику (рис. 2, б, справа), время жизни ПНП составляло 50–60 нс. Известно, что время жизни плазмонных нанопузырьков характеризует их максимальный диаметр [7]. Немедленно после генерации ПНП, трехмерные конфокальные изображения облученных клеток свидетельствовали о впрыске зеленого флуоресцентного красителя из липосом в цитоплазму клеток: яркая флуоресценция детектировалась в суб-микронных зонах, локализованных с кластерами золотых наночастиц, и местами генерации ПНП (рис. 2, с). Впрыск красителя наблюдался только в тех клетках, в которых генерировались ПНП. Таким образом, генерация плазмонных нанопузырьков небольшого диаметра (200–400 нм с временем жизни 60 нс [7]), их механическая, нетепловая, природа [7] и высокая скорость развития вызывают локальный впрыск красителя из липосом в цитоплазму клеток. Интенсивность флуоресцентных сигналов и размера флуоресцирующих зон анализировались в клетках, в которых генерировались ПНП (рис. 2, д).

Специфичность к раковым клеткам ПНП-индуцированного впрыска инкапсулированного вещества была исследована нами в смеси двух типов клеток HN31 и J32 с высоким и низким уровнем экспрессии РЭФР соответственно. Перед смешиванием клетки HN31 предварительно были окрашены красным флуоресцентным красителем, а клетки J32 — синим (рис. 2, е), что обеспечило их точную идентификацию в смеси. Затем полученная смесь клеток была обработана функционализированными золотыми наночастицами

и липосомами, в которые был инкапсулирован зеленый флуоресцентный маркер как в вышеописанном эксперименте. Для одновременного облучения сотен клеток в смешанной суспензии, мы использовали широкий лазерный пучок (532 нм, 40 мДж / см²).

На рис. 2, f представлены характерные термо-оптические отклики для клеток HN31 (красный) — время жизни составляло 55–60 нс, и J32 (синий) — облучение лазерным импульсом не вызывало генерацию ПНП по причине пороговой природы их возникновения [7]. Пороговый механизм возникновения ПНП предотвращает их генерацию в клетках с низким уровнем экспрессии РЭФР из-за отсутствия в этих клетках кластеров золотых наночастиц достаточно большого размера (рис. 3, h) и, следовательно, пороговая плотность энергии, необходимая для генерации нанопузырей в клетках J32, выше той плотности энергии, которую мы использовали в экспериментах [8, 9]. Флуоресцентные изображения клеток были получены непосредственно после их облучения (рис. 2, g): локальные флуоресцирующие зеленым внутриклеточные зоны детектировались только в клетках HN31. Анализ 150–180 клеток HN31 и J32 (рис. 2, h) показал, (i) что локальные флуоресцирующие зеленым внутриклеточные зоны локализованы с зонами генерации плазмонных нанопузырей, (ii) четкую внутриклеточную локализацию впрыснутого вещества и (iii) высокую специфичность к раковым клеткам ПНП-индуцированного впрыска содержимого липосом.

Терапевтическая эффективность лекарств, золотых наночастиц, лазерного и рентгеновского излучения

Мгновенный и долговременный терапевтические эффекты были исследованы нами *in vitro*. В качестве носителей лекарств мы использовали липосомы, наполненные доксорубицином (Доксил) [10], и мицеллы, наполненные паклитакселом [11]. Инкубация клеток только с этими липосомами или мицеллами демонстрирует низкую селективность к раковым клеткам стандартной химиотерапии и высокую устойчивость клеток HN31 к используемым лекарствам (рис. 3, а). Обработка клеток только ПНП вызывает селективный к раковым клеткам терапевтический эффект только при плотностях энергии, достаточных для генерации достаточно больших, разрушающих клетки [12], ПНП с временами жизни более 200 нс, в то время как маленькие

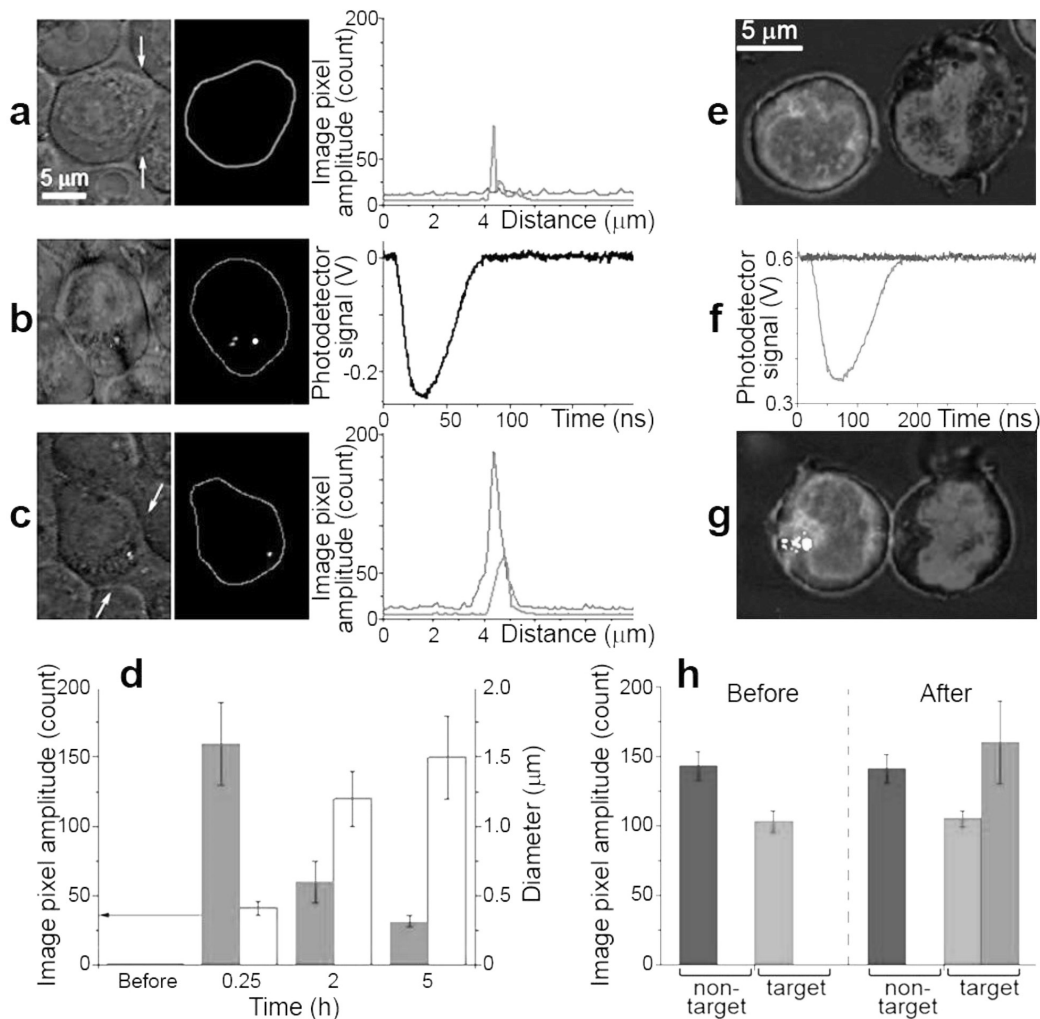


Рис. 2. ПНП-индуцированный внутриклеточный впрыск инкапсулированного в липосомы флуоресцентного красителя (кальцеин зеленый). Конфокальные изображения живых клеток, обработанных функционализированными антителами липосомами (зеленый) и золотыми наночастицами (красный): (a) Перед облучением лазерным импульсом (зеленый флуоресцентный краситель не детектировался в интактных липосомах вследствие его квенчинга). (b) Непосредственно во время воздействия лазерного импульса: генерируемые при воздействии лазерного импульса (532 нм, 40 мДж / см²) ПНП (в центре, изображение ПНП в рассеянном свете) строго коллокализованы с кластерами золотых наночастиц (слева); время жизни пузырей измерялось с помощью их термооптических откликов (справа), регистрируемых одновременно с изображения ПНП (в центре). (c) Изображения клеток непосредственно после генерации ПНП: зеленая флуоресценция красителя коллокализована с кластерами золотых наночастиц и ПНП. (d) Кинетика усредненной амплитуды флуоресцентных сигналов зеленого красителя (заштрихованное) и размера флуоресцентных зон (полые колонки) в отдельных клетках после генерации ПНП. (e) Специфичность внутриклеточного ПНП-индуцированного впрыска красителя. Объединенные оптическое и конфокальные трехцветные изображения клеток с высоким (красные) и низким (синие) уровнем экспрессии РФЭР, обработанные функционализированными к РФЭР золотыми наночастицами и липосомами с инкапсулированным зеленым красителем. (f) Термооптические отклики ПНП, регистрируемые в соответствующих клетках при однократном их облучении коротким лазерным импульсом (532 нм, 40 мДж / см²). (g) Изображения клеток через 5–10 минут после генерации ПНП: локализованный впрыск зеленого красителя происходит только в красных клетках благодаря селективной генерации неинвазивных ПНП, которые разрушили наноносители красителя (липосомы) и эндосомы и локально впрыснули краситель (зеленый) в цитоплазму клеток. (h) Усредненные амплитуды флуоресцентных сигналов в клетках до и после генерации ПНП. Данные: среднее ± стандартное отклонение (n = 150)

ПНП не влияют на жизнеспособность клеток (рис. 3, b). Однако эффективность терапевтического воздействия на раковые клетки существенно увеличивается в случае коллокализованного воздействия неинвазивных (55–60 нс) ПНП и наноносителей лекарств (рис. 3, d, режим D+PNB). Таким образом, ПНП-индуцированный впрыск доксорубина и паклитаксела увеличивает как эффективность так и селективность химиотерапии раковых клеток. Кроме того, отсутствие ПНП в нормальных клетках в сочетании с дозами используемых лекарств, сниженными до 2–3 % относительно стандартных, делает предложенный способ обработки клеток практически безопасным для нормальных клеток (рис. 3, e). Однако следует отметить, что предложенный нами способ усиления терапевтического эффекта требует эффективной коллокализации ПНП и наноносителей лекарств. Очевидно, что без такой коллокализации механическое воздействие ПНП не сможет влиять на носители лекарств, что приведет к низкому терапевтическому эффекту.

Анализ эффективности стандартной радиотерапии (без лекарств и золотых наночастиц) показал, что клетки HN31 являются достаточно устойчивыми к такому виду терапии (рис. 3, c) и их рост может быть эффективно приостановлен только при достаточно больших, небезопасных для нормальных клеток, дозах облучения. Предварительная обработка клеток золотыми наночастицами приводит к незначительному усилению радиотерапевтического эффекта вследствие локального испускания вторичных электронов [13, 14] (рис. 3, d). Комбинация химио- и радиотерапии вызывает предсказуемое усиление терапевтического эффекта (рис. 3, d, режим D+XR1) вследствие хорошо известного совместного воздействия лекарств и рентгеновского излучения [15, 16]. Однако следует отметить, что все стандартные клинически апробированные терапевтические компоненты и их, описанные выше, сочетания не достаточно эффективно приостанавливают рост агрессивных, устойчивых к химио- и радиотерапии раковых клеток.

Основными преимуществами предложенного нами метода (квадрупии), считающего в себе все четыре клинически апробированные компоненты, являются радикальное усиление терапевтического эффекта (рис. 3, d, режим D+PNB+XR1) и его высокая селективность (рис. 3, e, режим D+PNB+XR1). При этом максимальный эффект – полное подавление роста раковых клеток, был достигнут в случае обработки клеток рентгенов-

ским излучением через 6 часов после генерации в клетках неинвазивных ПНП (рис. 3, d, режим D+PNB+XR6). Идентично обработанные нормальные клетки продемонстрировали высокую выживаемость (рис. 3, e, режим D+PNB+XR1).

Роль нанокластеров и ПНП в усилении терапевтического эффекта

Три типа клеток были использованы нами для исследования роли нанокластеров и ПНП в усилении терапевтического эффекта путем анализа эффективности формирования кластеров наночастиц в клетках, генерации ПНП и терапевтической реакции клеток на квадрупию и радиотерапию: нормальные эпителиальные клетки NOM9, медленно растущие и неагрессивные раковые клетки HN30 и очень агрессивные и быстрорастущие раковые клетки HN31 (оба типа раковых клеток относятся к плоскоклеточной карциноме головы и шеи [17]). Все три типа клеток одинаково обрабатывались золотыми наночастицами, наноносителями лекарств, лазерным и рентгеновским излучением. По сравнению с неагрессивными раковыми клетками, агрессивные HN31 клетки продемонстрировали высокую устойчивость к стандартной химиорадиотерапии (рис. 3, f), однако квадрупия полностью подавила рост этих клеток.

Усиление терапевтического эффекта в зависимости от степени агрессивности клеток количественно характеризовалось отношением степени выживаемости клеток, обработанных химиорадиотерапией к степени выживаемости клеток после обработки квадрупией, и анализировалось как функция скорости роста интактных опухолей, индуцированных из соответствующих клеток *in vivo* (рис. 3, g). Коэффициент усиления терапевтического эффекта быстро превысил 100 для агрессивных HN31 клеток, таким образом продемонстрировав эффект саморегуляции квадрупии в зависимости от агрессивности рака. Определенный нами коэффициент усиления терапевтического эффекта увеличивался с увеличением размера внутриклеточных кластеров золотых наночастиц и ПНП (рис. 3, g): для нормальных клеток характерно неспецифическое попадание отдельных наночастиц в нормальные клетки (рис. 3, h), однако из недостаточно для генерации ПНП и, следовательно, нормальные клетки выживают после обработки квадрупией; неагрессивные HN30 клетки формируют кластеры среднего размера (рис. 3, i), что приводит к генерации в них ПНП очень маленького размера,

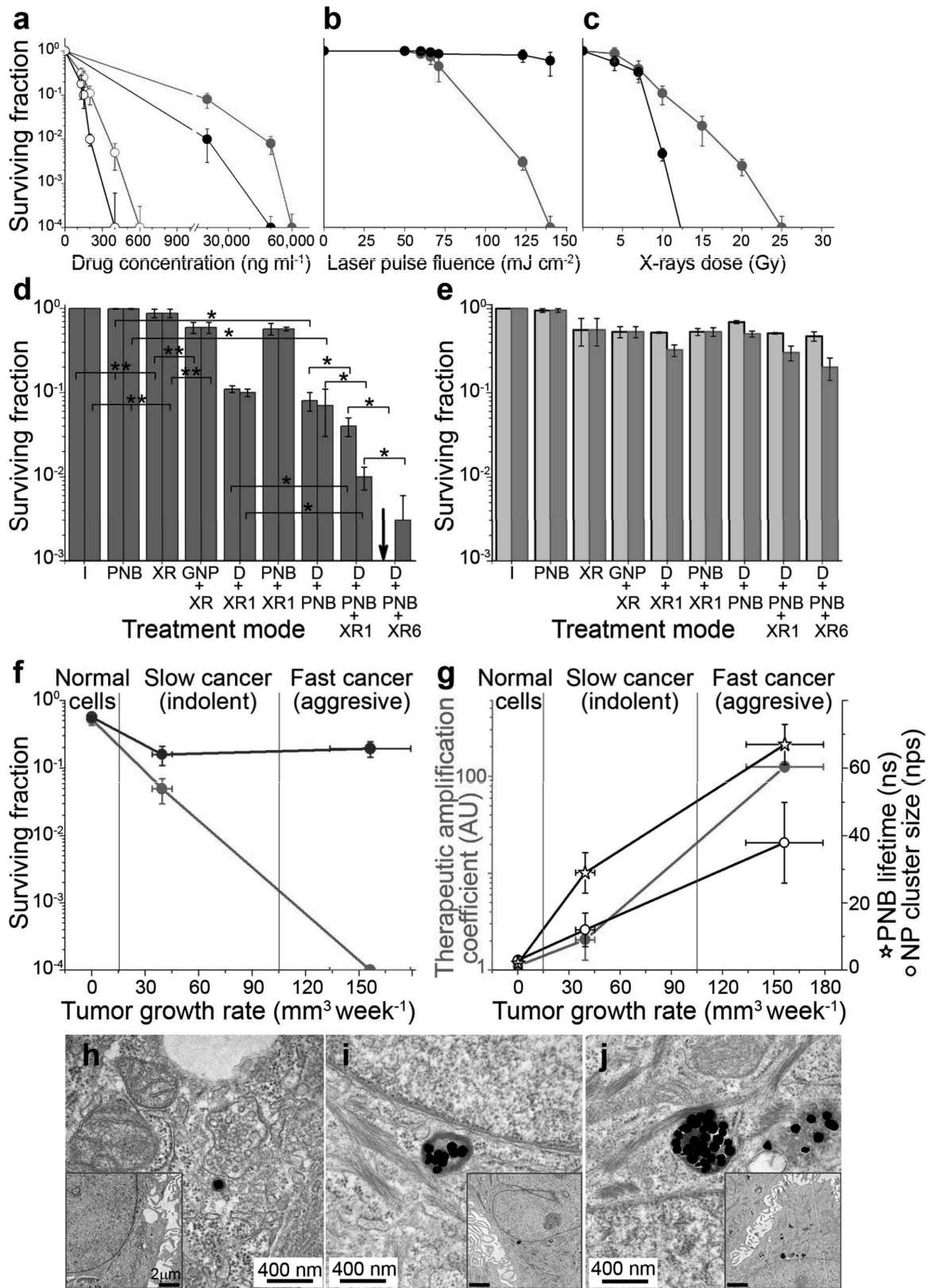


Рис. 3. Выживаемость (клоногенный тест) раковых клеток HN31 (красные символы) и нормальных клеток NOM9 (черные символы) после однократной терапевтической обработки как функция: (а) Концентрации лекарства (Доксил: заштрихованные символы; Мицеллярный паклитаксел: пустые

символы). (b) Плотности энергии воздействующего лазерного излучения, т.е. от размера ПНП. (c) Дозы рентгеновского излучения. (d) Выживаемость (клоногенный тест) клеток HN31 при различных режимах их обработки (I – интактные клетки; PNB – обработка ПНП (золотые наночастицы + лазер: 780 нм, 45 мДж / см²); XR – рентгеновское излучение, 4 Гр; GNP+XR – золотые наночастицы и рентгеновское излучение; D+XR – лекарство (серый – Доксил, 2 мкг мл⁻¹; красный – Паклитаксел, 33 нг мл⁻¹) и рентгеновское излучение (4 Гр); PNB+XR1 – ПНП + рентгеновское излучение через 1 час после воздействия лазера; D+PNB – лекарство и золотые наночастицы + лазер (ПНП); D+PNB+XR1 – лекарство и золотые наночастицы + лазер (ПНП) + рентгеновское излучение через 1 час после воздействия лазера; D+PNB+XR6 – лекарство и золотые наночастицы + лазер (ПНП) + рентгеновское излучение через 6 часов после воздействия лазера; черная стрелка обозначает полное отсутствие выживших клеток. (e) Выживаемость (клоногенный тест) нормальных (NOM9) клеток как функция режимов лечения идентичных (d). (f) Выживаемость (клоногенный тест) нормальных (NOM9), медленно растущих и неагрессивных раковых клеток HN30 и быстро растущих и агрессивных раковых клеток HN31 после стандартной химиорадиотерапии (синие символы) и квадрупии (красные символы) как функция агрессивности рака (характеризующейся через степень роста опухолей, индуцированных соответствующими типами клеток *in vivo*), все терапевтические дозы как в (d). (g) Коэффициент усиления терапии (красные символы) (соотношение выживаемости клеток, обработанных стандартной химиорадиотерапией к выживаемости клеток, обработанных квадрупией), усредненный размер кластера золотых наночастиц (черные точки), измеренный через количество наночастиц в кластере, и максимальный размер ПНП (черные звездочки) в нормальных (NOM9), неагрессивных (HN30) и быстро растущих агрессивных раковых (HN31) клетках, измеренные как функция агрессивности рака, все терапевтические дозы как в (d). (h–j) ТЕМ изображения кластеров золотых наночастиц в клетках (время инкубации 24 часа; наночастицы были функционализированы C225) в нормальных клетках NOM9 (h), неагрессивных раковых клетках HN30 (i) и агрессивных раковых клетках HN31 (j), вставки показывают те же клетки с маленьким увеличением. Объем образца n = 6 (для (f) и (g)). Данные: среднее ± стандартное отклонение для трех независимых экспериментов *P < 0.05, **P > 0.05

вызывая небольшое усиление терапевтического эффекта; агрессивные HN31 клетки формируют большие кластеры наночастиц (рис. 3, j), что приводит к генерации ПНП максимального размера, вызывая тем самым и максимальный терапевтический эффект. Вышеописанные эксперименты *in vitro* продемонстрировали уникальную способность квадрупии мгновенно и селективно (только в раковых клетках) усиливать терапевтический эффект химио- и радиотерапии при очень низких дозах лекарств (2–3 % от стандартных клинически-апробированных доз) и рентгеновского излучения (6–7 %) в ответ на воздействие короткого лазерного импульса и однократное рентгеновское облучение, и одновременно уменьшать неспецифическую токсичность лечения.

Апробация квадрупии *in vivo*

Во-первых, мы исследовали эффективность внутривенной доставки золотых наночастиц и возможность локальной генерации и детектирования ПНП в лабораторных животных (мышях). Клетки HN31 были использованы для подкожного индуцирования раковой опухоли у животного. Через 24 часа после внутривенного введения функционализированных антителами C225 золотых наночастиц (0,8 мкг/г), большие кластеры наночастиц формировались только в опухоли, в

то время как в соседних нормальных тканях присутствовали только отдельные наночастицы, аналогично ранее полученным результатам *in vitro*. Воздействие на опухоль одиночного лазерного импульса в ближнем инфра-красном диапазоне спектра (780 нм, 45 мДж / см²) вызывало генерацию ПНП, которые детектировались *in vivo* путем регистрации акустических сигналов (рис. 5, a), возникающих при генерации ПНП. Амплитуды этих сигналов использовались нами в качестве метрики ПНП [14]. Процесс генерации ПНП *in vivo* отличается высокой специфичностью и чувствительностью к опухоли, безопасностью и спектральной селективностью [18].

Во-вторых, квадрупия была апробирована в двух моделях *in vivo*. В первой модели, небольшое количество (180 тысяч) предварительно обработанных клеток HN31 было подкожно инжескировано в бок мыши и дальнейшее развитие опухолей наблюдалось в течение нескольких недель (рис. 4, a–c). Мы сравнили 4 группы животных: в первую группу инжескировались ничем необработанные (интактные) клетки, во вторую группу – клетки, обработанные золотыми наночастицами и ПНП с временами жизни 55 нс (концентрация наночастиц 2.4x10¹⁰ наночастиц/мл, время инкубации с клетками – 24 часа, лазерное

излучение: 780 нм, 20 пс, 45 мДж / см²), в третью – клетки, обработанные Доксилем (концентрация лекарства – 2 мкг/мл) и рентгеновским излучением (однократная доза 4 Гр), и в четвертую – клетки, обработанные квадрапией (Доксил – 2 мкг/мл, золотые наночастицы – 2.4x10¹⁰ наночастиц/мл, время инкубации лекарства и наночастиц с клетками – 24 часа, лазерное излучение: 780 нм, 20 пс, 45 мДж/см², радиотерапия – 4 Гр через 6 часов после генерации ПНП). Через 15 дней после инъектирования клеток, опухоли максимального размера, выросли в случаях инъектирования интактных клеток (рис. 4, а, слева) и клеток, обработанных неинвазивными ПНП (рис. 4, а, справа). Стандартная химиорадиотерапия замедлила, но полностью не подавила рост опухоли (рис. 4, б, слева), в то время как квадрапия способствовала полному (рис. 4, б, справа) или практически полному подавлению роста опухоли (рис. 4, с).

Во второй модели, первичные опухоли индуцировались *in vivo* кодированными лициферазой клетками HN31, что дало возможность детектировать опухоли на самых ранних стадиях их развития. После формирования опухолей диаметром 3–5 мм животные были случайно разделены на 4 группы. Первая группа животных была обработана *in vivo* квадрапией: наночастицы золота и Доксил доставлялись внутривенно в концентрации 0.8 мкг/г веса животного и 1 мг/кг, соответственно, за 24 часа до генерации ПНП (лазер: 780 нм, 20 пс, 45 мДж/см²) и следующим, через 6 часов, рентгеновским облучением (4 Гр). Вторая группа животных подвергалась химиорадиотерапии (дозы лекарства и рентгеновского излучения аналогичны первой группе). Третья группа обрабатывалась только ПНП, т.е. наночастицы золота доставлялись внутривенно за 24 часа до обработки лазером (780 нм, 20 пс, 45 мДж/см²). И четвертая группа использовалась в качестве контроля, т.е. на опухоли не оказывалось никакого воздействия. После вышеописанной однократной обработки, объем и биолюминесценция опухолей еженедельно оценивались во всех животных (рис. 4, d–g). Видно, что квадрапия быстро подавила рост опухолей на первой неделе после обработки (рис. 4, e, g): средний объем опухолей достиг всего 3 % от объемов опухолей в контрольной группе и 6 % относительно группы животных подвергшихся химиорадиотерапии (рис. 4, f). Кроме того, обработка опухолей только ПНП или химиорадиотерапией характеризуется достаточно низкой терапевтической эффективностью и замедляет рост опухолей незначительно (рис. 4, g) в

отличие от квадрапии, которая в радикально (в 17 раз) усиливает эффект химиорадиотерапии после однократного ее применения (рис. 4, g).

Далее, мы оценили применимость квадрапии для диагностики и дополнительной обработки ОМБ непосредственно во время удаления злокачественной опухоли. Первичные опухоли диаметром (8–10 мм) были индуцированы *in vivo* с помощью клеток HN31. Золотые наночастицы и Доксил были введены в животных внутривенно за 24 часа до резекции опухоли и вся послеоперационная зона была облучена в течение 20–30 секунд широким лазерным пучком (780 нм, 20 пс, 45 мДж/см²) немедленно после резекции опухоли (рис. 5, а). Акустический метод детектирования ПНП был использован нами для одновременной регистрации генерируемых ПНП (рис. 5, а). Мы сравнили амплитуды акустических сигналов ПНП в первичной опухоли, послеоперационной зоне и прилегающих нормальных тканях в животных, обработанных и необработанных золотыми наночастицами (рис. 5, б). Полученные в послеоперационной зоне сигналы ПНП свидетельствуют о наличии ОМБ (рис. 5, б), что было впоследствии подтверждено локальным рецидивом опухоли. Кроме того, стандартный акустический метод детектирования ОМБ, без генерации ПНП, не показал наличие этой опасной болезни в тех же самых животных. Этот эксперимент, продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность мгновенной диагностики ОМБ с помощью ПНП в реальное время, непосредственно во время проведения операции, и без предварительного взятия биопсийного материала.

Эффективность послеоперационной обработки ОМБ, была исследована нами на трех группах животных: 1) стандартная резекция опухоли, 2) резекция опухоли в сочетании с химиорадиотерапией и 3) резекция опухоли в сочетании с квадрапией. Присутствие ОМБ было подтверждено немедленно после резекции опухоли, путем детектирования ПНП как описано выше. Повторное возникновение опухоли (рецидив) наблюдалось в 100 % случаев на 2–4 недели после операции как в случаях только резекции первичных опухолей (рис. 5, а, f), так и в случаях комбинирования хирургии и стандартной химиорадиотерапии (рис. 5, d, f), в то время как сочетание хирургии и квадрапии эффективно подавило возникновение опухолей после лечения (рис. 5, e, f). Таким образом, квадрапия обеспечивает одновременно эффективное детектирование и лечение ОМБ без использования дополнительных методов или устройств.

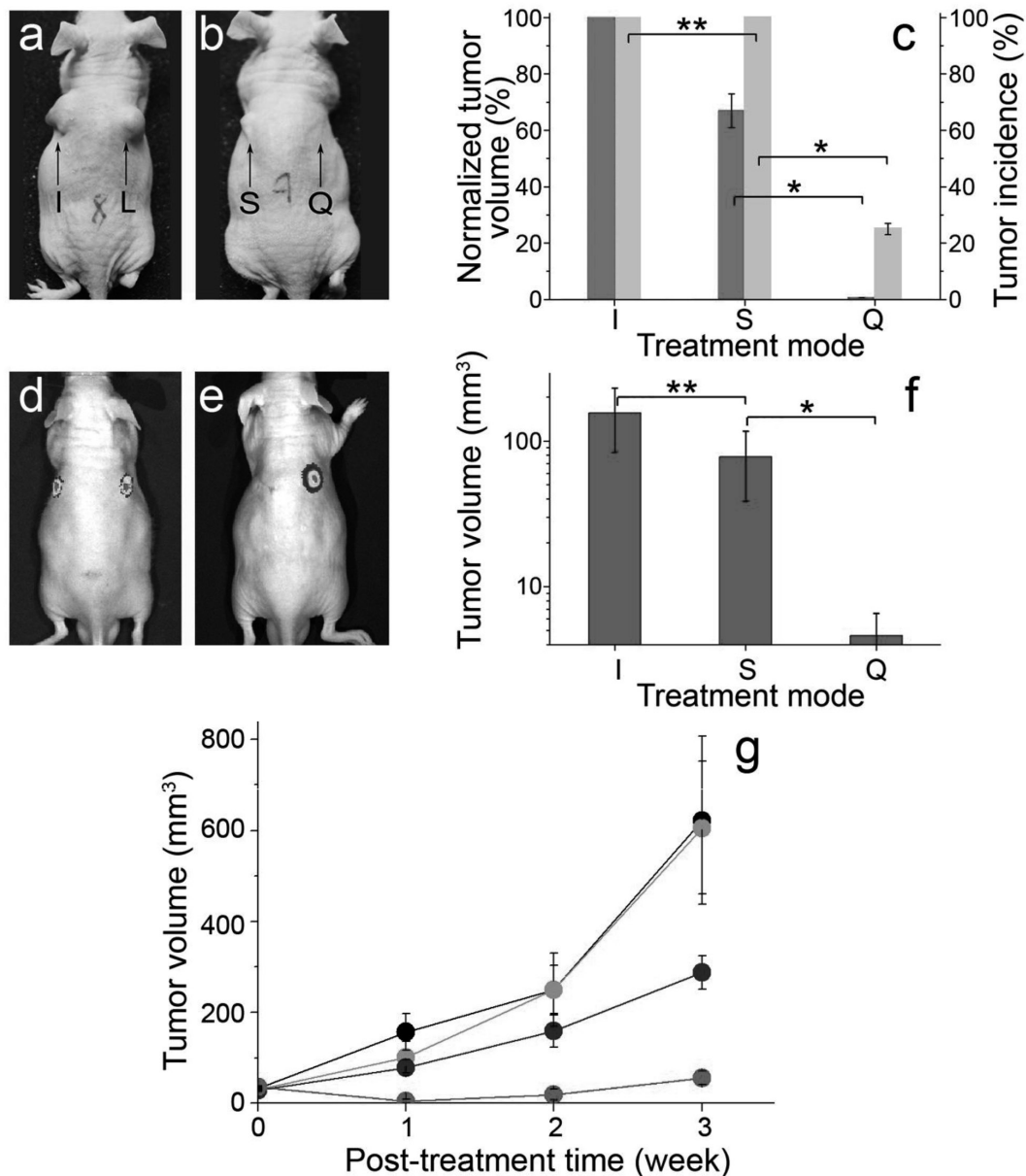


Рис. 4. Квадратия агрессивных опухолей *in vivo*. (a–c) Клетки HN31 были предварительно обработаны *in vitro* и затем инжесктированы в животных: (a,b) изображения животных через 15 дней после введения клеток: интактных клеток (I), обработанных химиорадиотерапией клеток (S), ПНП обработанных клеток (L) и клеток, обработанных квадратией (Q) (Доксил – 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$, золотые наночастицы – 2.4×10^{10} частиц ml^{-1} , лазер – 780 нм, 45 мДж/см², рентгеновское излучение – 4 Гр), (c) вероятность развития опухоли (серый) и нормированный объем (пурпурный) опухолей для трех групп животных через 15 дней после введения клеток. Данные: среднее \pm стандартная ошибка для независимых экспериментов (I: n = 5, S: n = 6, Q: n = 4). (d–g) Квадратия первичных опухолей: биOLUMИнесцентные изображения животных до (d) и через неделю после (e) однократной обработки первичных рпухолей квадратией (опухоль на левом боку (Доксил (1 мг кг⁻¹) и золотые наночастицы (0.8 мг кг⁻¹) были введены внутривенно за 24 часа до генерации ПНП (лазер: 780 нм, 45 мДж/см², локальное облучение) + локальное рентгеновское облучение (4 Гр) через 6 часов после генерации ПНП) и стандартной химиорадиотерапии (опухоль на правом боку, те же дозы Доксила и рентгеновского излучения). (f) Объем опухолей через неделю после обработки. (g) Кинетика роста опухолей после однократной обработки животных *in vivo*: квадратия (красные символы, n = 11); химиорадиотерапия (синие символы, n = 11); ПНП сами по себе (оранжевые символы, n = 4); животные не подвергшиеся обработке (черные символы, n = 6). Данные: среднее \pm стандартная ошибка

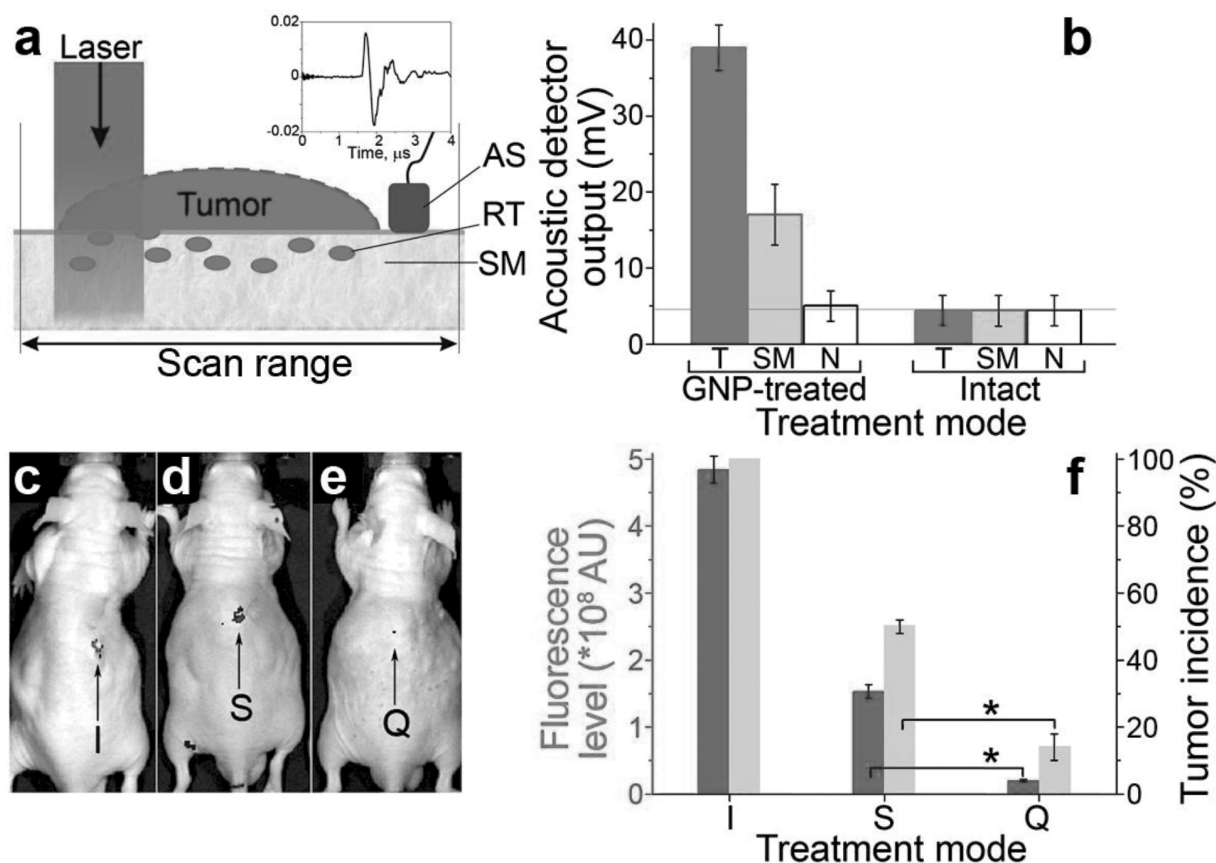


Рис. 5. Квадратия как метод диагностики и лечения микроскопической остаточной болезни (МОБ) непосредственно по время резекции опухоли *in vivo*. (а) Экспериментальная модель диагностики и лечения МОБ по время резекции опухоли: первичная опухоль (tumor), остаточная микро-опухоль (RT), диапазон сканирования послеоперационной зоны широким лазерным пучком (scan range) и акустический датчик (AS) для регистрации ПНП, характерный акустический сигнал ПНП. (b) Диагностика МОБ: амплитуды акустических сигналов ПНП, полученные во время лазерного сканирования животных обработанных (внутривенно) и необработанных золотыми наночастицами: первичная опухоль перед резекцией (Т, красный), хирургические срезы немедленно после резекции опухоли (SM, розовый) и прилегающая здоровая ткань (N, белый); горизонтальная линия показывает фотонный акустический сигнал (шум). Данные: среднее ± стандартная ошибка (n = 3). (c–e) Лечение МОБ: флуоресцентные изображения опухолей (GFP), полученные через 28 дней после (c) только хирургического вмешательства (I), (d) хирургического вмешательства и вспомогательной химиорадиотерапии (S), (e) хирургического вмешательства и квадратии (все терапевтические дозы идентичны указанным на рис. 4). (f) Метрики повторного роста опухолей (рецидив) через 28 дней после лечения МОБ: зеленый – уровень флуоресценции опухоли; серый – вероятность рецидива (I: n = 5; S: n = 6, Q: n = 7). Данные: среднее ± стандартная ошибка. *P < 0.05, **P > 0.05

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предложенная нами квадратия, как метод внутриклеточного, обладающего высокой специфичностью к раковым клеткам, усиления стандартной макро-терапии, была успешно апробирована *in vivo* (рис. 3) и *in vivo* (рис. 4, 5). Высокая терапевтическая эффективность, специфичность и безопасность квадратии основана на формировании и мгновенной, пороговой активации внутриклеточных нанокластеров в раковых клетках ис-

ключительно под воздействие лазерного и рентгеновского излучения. Размер внутриклеточных кластеров наночастиц в раковых клетках увеличивается с увеличением их агрессивности, таким образом, влияя на пороговую плотность энергии, необходимую для активации кластеров в клетках, и результирующую терапевтическую эффективность, вызванную следующими нестационарными терапевтическими явлениями:

1) Внутриклеточное механическое, нетепловое, лазерно-индуцированное развитие и схлопы-

вание ПНП вокруг золотых наночастиц. ПНП – это нестационарное короткоживущее явление (не частица) (рис. 2, g), которое вызывает локальное, механическое разрушение наноносителей лекарств и внутриклеточных эндосом, в которых они локализованы, и, таким образом, локально и мгновенно впрыскивает лекарство в цитоплазму клетки, обеспечивая тем самым его высокую внутриклеточную концентрацию (рис. 2, g). Стандартные оптические катетеры и эндоскопы [20,21] могут успешно использоваться для доставки безопасного лазерного излучения в ближнем инфра-красном диапазоне спектра, обладающего наибольшей глубиной проникновения в ткани [19]. Большие кластеры наночастиц, которые формируются в наиболее агрессивных раковых клетках (рис. 3, j), требуют минимальную плотность энергии лазерного излучения для активации больших, инвазивных ПНП [7, 18, 22]. Одиночные наночастицы или маленькие кластеры наночастиц, возникающие в результате неспецифического взаимодействия наночастиц с нормальными клетками, требуют гораздо больших плотностей энергии лазерного излучения для активации ПНП, таким образом, при одинаковых условиях облучения нормальных и раковых клеток, генерация ПНП происходит только в последних [8, 9, 22] (рис. 2, f, g). Вместе с этим медленная диффузия лекарства, из неспецифически интернализованных нормальными клетками одиночных наноносителей лекарств, не вызывает сильных токсических эффектов вследствие сниженной, до 2–3 % от стандартной, дозы лекарства, используемой в предложенной нами методе (рис. 3, e).

2) Максимальное внутриклеточное усиление радиотерапии вокруг больших кластеров золотых наночастиц за счет локального испускания ими вторичных электронов [13]. Известно, что золотые наночастицы усилят эффект радиотерапии [13, 23] однако при этом используются очень высокие дозы наночастиц. При низких дозах обработки клеток и тканей наночастицами, как в случае квадрупии, наблюдается незначительное усиление радиотерапии (рис. 3, d, режим GNP+XR). Золотые наночастицы могут одновременно использоваться для доставки лекарств и усиления радиотерапии [24], однако в случае отсутствия локализованного высвобождения лекарства и усиления рентгеновского излучения усиление терапевтического эффекта не происходит.

Синергизм вышеописанных явлений (механическое воздействие ПНП, впрыск лекарства и усиление рентгеновского излучения) радикально

усиливает их терапевтический эффект вследствие их внутриклеточной коллокализации. Такое усиление можно объяснить хорошо известными макро-эффектами: взаимное усиление химио- и радиотерапий [16, 25–27] и механическое усиление восприимчивости опухоли к химио- и радиотерапии [28–33].

Таким образом, внутриклеточный смешанный кластер золотых наночастиц и носителей лекарств выступает в роли своеобразного троянского коня, который активируется только в раковых клетках при воздействии короткого лазерного импульса с определенной плотностью энергии и рентгеновского излучения, существенно увеличивая эффективность терапевтического воздействия существующих макро-терапий [34–36]. Следует отметить, что используемые нами наночастицы или лазерное излучение являются абсолютно безопасными, что было продемонстрировано *in vitro* (рис. 3) и *in vivo* (рис. 4, g).

Терапевтический потенциал квадрупии дополняется ее диагностическим потенциалом: возникающий, при генерации ПНП, импульс давления позволяет быстро, в реальном времени и с высокой чувствительностью детектировать эффект ПНП (рис. 5, b). Применяемые сегодня методы детектирования ОМБ требуют взятия биопсии для длительного и, зачастую, неточного ее анализа [1, 37]. В то время как ПНП-метод технически близок к стандартному фотоакустическому методу [38], последний обладает гораздо более низкой чувствительностью.

Таким образом, предложенная нами квадрупия трансформирует стандартные хорошо апробированные макро-терапии в мгновенную и эффективную внутриклеточную терапию. Селективное формирование в раковых клетках кластеров наночастиц и генерация плазмонных нанопузырей ускоряют и усиливают терапевтическую эффективность и селективность химио- и радиотерапии агрессивных и устойчивых к стандартному лечению опухолей более чем в 17 раз после однократного применения квадрупии *in vivo*. Совмещение диагностики и терапии в одной процедуре (тераностика) позволяет быстро, эффективно и с высокой чувствительностью детектировать и обрабатывать в реальном времени остаточные раковые клетки непосредственно во время проведения резекции опухоли. Существенное уменьшение (относительно стандартных) доз, используемых в квадрупии лекарств и рентгеновского излучения минимизирует неспецифическую токсичность разработанного нами метода.

Список использованных источников

1. Meier, J.D., Oliver, D.A. & Varvares M.A. Surgical margin determination in head and neck oncology: current clinical practice. The results of an International American Head and Neck Society Member Survey. *Head Neck*. 27, 952-958 (2005).
2. Langendijk, J.A., et al. Impact of late treatment- related toxicity on quality of life among patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* 26, 3770-3887 (2008).
3. Libutti, S.K., et al. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin. Cancer Res.* 16, 6139-6149 (2010).
4. Kean, W.F., Kean, I.R.L. Clinical pharmacology of gold. *Inframmopharmacology.* 16, 112-125 (2008).
5. Sharafinski, M.E., Ferris, R.L., Ferrone, S. & Grandis J.R. Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 32, 1412-1421 (2010).
6. Iakoubov, L., Rokhlin, O. & Torchilin, V. Anti-nuclear autoantibodies of the aged reactive against the surface of tumor but not normal cells. *Immunol. Lett.* 47, 147-149 (1995).
7. Lukianova-Hleb, E., et al. Plasmonic nanobubbles as transient vapor nanobubbles generated around plasmonic nanoparticles. *ACS Nano.* 4, 2109-2123 (2010).
8. Lukianova-Hleb, E.Y., et al. Improved cellular specificity of plasmonic nanobubbles versus nanoparticles in heterogeneous cell systems. *PLoS One.* 7, e34537 (2012).
9. Lukianova-Hleb, E.Y., Ren, X., Zasadzinski, J.A., Wu, X. & Lapotko, D. Plasmonic nanobubbles enhance efficacy and selectivity of chemotherapy against drug-resistant cancer cells. *Adv. Mater.* 24, 3831-3837 (2012).
10. Doxil: Product Information Book. Centocor Ortho Biotech Products, L.P. USA 3/2011, (2011).
11. Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N., Gao, Z. & Papahadjopoulos-Sternberg, B. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 6039-6044 (2003).
12. Wagner, D.S., et al. The in vivo performance of plasmonic nanobubbles as cell theranostic agents in zebrafish hosting prostate cancer xenografts. *Biomaterials.* 31, 7567-7574 (2010).
13. Hainfeld, J.F., et al. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys. Med. Biol.* 55, 3045-3059 (2010).
14. Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N. & Smilowitz, H.M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* 49, N309-315 (2004).
15. Calais, G., et al. Stage III and IV cancers of the oropharynx: results of a randomized study of Gortec comparing radiotherapy alone with concomitant chemotherapy. *Bull Cancer.* 87, 48-53 (2000).
16. Sano, D., et al. Vandetanib restores head and neck squamous cell carcinoma cells' sensitivity to cisplatin and radiation in vivo and in vitro. *Clin. Cancer Res.* 17, 1815-1827 (2011).
17. Sano, D., et al. Disruptive TP53 mutation is associated with aggressive disease characteristics in an orthotopic murine model of oral tongue cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 6658-6670.
18. Lukianova-Hleb, E.Y., Volkov, A.N., Wu, X. & Lapotko, D.O. Transient enhancement and spectral narrowing of the photothermal effect of plasmonic nanoparticles under pulsed excitation. *Adv. Mater.* 25, 772-776 (2013).
19. Welch, A.J. & van Gemert, M.J.C. (Eds.) *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue.* 2nd Ed., Springer (2011).
20. Ambrosch, P. The role of laser microsurgery in the treatment of laryngeal cancer. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 15, 82-88 (2007).
21. Karni, R.J., Rich, J.T., Sinha, P. & Haughey, B.H. Transoral laser microsurgery: a new approach for unknown primaries of the head and neck. *Laryngoscope.* 121, 1194-1201 (2011).
22. Hleb, E. & Lapotko, D. Influence of transient environmental photothermal effects on optical scattering by gold nanoparticles. *Nano Lett.* 9, 2160-2166 (2009).
23. Rahman, W.N., et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine.* 5, 136-142 (2009).
24. Jiao, P., et al. Leading neuroblastoma cells to die by multiple premeditated attacks from a multifunctionalized nanoconstruct. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 13918-13921 (2011).
25. Argiris, A., Karamouzis, M.V., Raben, D. & Ferris, R.L. Head and neck cancer. *The LANCET.* 371, 1695-1709 (2008).
26. Jegannathen, A., et al. Synchronous chemoradiotherapy in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck using capecitabine: a single-centre, open-label, single-group phase II study. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 23, 149-158 (2011).

27. Chen, Y., et al. Phase I/II clinical study of pulsed paclitaxel radiosensitization for thoracic malignancy a therapeutic approach on the basis of preclinical research of human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* 9, 969-975 (2003).
28. Paliwal, S. & Mitragotri, S. Ultrasound-induced cavitation: applications in drug and gene delivery. *Exper. Opin. Drug. Deliv.* 3, 713-726 (2006).
29. Czarnota, G.J., et al. Tumor radiation response enhancement by acoustical stimulation of the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109, E2033-E2041 (2012).
30. Rapoport, N., et al. Ultrasound-mediated tumor imaging and nanotherapy using drug loaded, block copolymer stabilized perfluorocarbon nanoemulsions. *J. Control. Release.* 153, 4-15 (2011).
31. Gao, Z., Kennedy, A.M., Christensen, D.A. & Rapoport, N.Y. Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy. *Ultrasonics.* 48, 260-270 (2008).
32. Rapoport, N.Y. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *Progress in Polymer Science* 32, 962-990 (2007).
33. Rapoport, N., Gao, Z., Kamaev, P. & Christensen, D.A. (2006) Ultrasound-enhanced localized chemotherapy of drug-sensitive and multidrug resistant tumors. *Am. Inst. Physics.* 829, 481-483 (2006).
34. Allen, T.M. & Cullis, P.R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science.* 303, 1818-1822 (2004).
35. Schroeder, A. et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat. Rev. Cancer.* 12, 39-50 (2011).
36. Peer, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotech.* 2, 751-760 (2007).
37. de Carvalho, A.C., et al. Clinical significance of molecular alterations in histologically negative surgical margins of head and neck cancer patients. *Oral Oncol.* 48, 240-248 (2012).
38. Zhang, H.F., Maslov, K., Stoica, G. & Wang, L.V. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* 24, 848-851 (2006).