

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ТИПОВ С ЛИПОСОМАЛЬНЫМ БОРИРОВАННЫМ ХЛОРИНОМ Е6

О.Б. Абрамова, В.В. Дрожжина, Т.П. Чурикова, Е.А. Козловцева, Л.М. Архипова, М.А. Каплан, С.А. Иванов, А.Д. Каприн

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

Резюме

Обобщены результаты исследований эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) с использованием нового отечественного фотосенсибилизатора липосомального борированного хлорина е6 после его парентерального введения (внутрибрюшинное и внутривенное). Противоопухолевую эффективность препарата оценивали на моделях перевивных опухолей: саркома М-1 и альвеолярный рак печени РС-1 у крыс, меланома В16 и карцинома Эрлиха у мышей. Опухоли перевивали подкожно в область бедра животных. Цель исследования состояла в определении оптимальных режимов ФДТ, позволяющих добиться максимального противоопухолевого эффекта до 21 сут после проведения ФДТ. Терапию проводили под контролем накопления фотосенсибилизатора в опухолевой и окружающих тканях бедра, осуществляя подбор доз препарата и параметров лазерного излучения (плотность энергии и плотность мощности). Эффективность терапии оценивали по следующим параметрам: торможение роста опухоли, процент животных с полной регрессией опухоли, коэффициент абсолютного прироста опухоли у животных с продолженным ростом. Результаты исследований показали, что отечественный фотосенсибилизатор липосомальный борированный хлорин е6 обладает высокой противоопухолевой активностью *in vivo*. При экспериментальном исследовании фотосенсибилизатора при определенных режимах ФДТ получен максимальный противоопухолевый эффект (полная регрессия опухоли у 100% животных) до 21 сут после проведения ФДТ на всех использованных опухолевых моделях.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фармакокинетика, лазер, липосомальный борированный хлорин е6, саркома М-1 крыс, альвеолярный рак печени РС-1 крыс, меланома В16 мышей, карцинома Эрлиха мышей.

Для цитирования: Абрамова О.Б., Дрожжина В.В., Чурикова Т.П., Козловцева Е.А., Архипова Л.М., Каплан М.А., Иванов С.А., Каприн А.Д. Фотодинамическая терапия экспериментальных опухолей различных морфологических типов с липосомальным борированным хлорином е6 // Biomedical Photonics. – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 12–22. doi: 10.24931/2413-9432-2021-10-3-12-22

Контакты: Абрамова О.Б., e-mail: olyabramova@gmail.com

PHOTODYNAMIC THERAPY OF THE EXPERIMENTAL TUMORS OF DIFFERENT MORPHOLOGICAL TYPES WITH LIPOSOMAL BORONATED CHLORIN E6

Abramova O.B., Drozhzhina V.V., Churikova T.P., Kozlovceva E.A., Arkhipova L.M., Kaplan M.A., Ivanov S.A., Kaprin A.D.

A.Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

Abstract

The article summarizes the results of studies of the effectiveness of photodynamic therapy using a new domestic photosensitizer liposomal borated chlorin e6 (LBC) after its parenteral administration (intraperitoneal and intravenous). Antitumor efficacy was evaluated in rats with M-1 sarcoma and PC-1 alveolar liver cancer and mice with B16 melanoma and Ehrlich's carcinoma, which were transplanted subcutaneously into the thigh area of the animals. The aim of the study was to determine the optimal regimes of photodynamic therapy that would allow achieving the maximum antitumor effect up to 21 days after the photodynamic therapy. The therapy was carried out under the control of the accumulation of the photosensitizer in the tumor and surrounding tissues of the thigh by selecting the doses of the drug and the parameters of laser radiation (energy density and power density). The effectiveness of therapy was assessed by the inhibition of tumor growth, by the percentage of animals with complete tumor regression, by the absolute growth rate in animals with continued tumor growth compared to controls. The results of our studies have shown that the domestic photosensitizer liposomal borated chlorin e6 has high antitumor activity *in vivo*. In an experimental study of the photosensitizer under certain PDT modes, the maximum antitumor effect (complete tumor regression in 100% of animals) was obtained up to 21 days after PDT in all tumor models used.

Keywords: photodynamic therapy, pharmacokinetics, laser, liposomal borated chlorin e6, rat sarcoma M-1, rat alveolar cancer liver PC-1, mouse melanoma B16, mouse Ehrlich's carcinoma.

For citations: Abramova O.B., Drozhzhina V.V., Churikova T.P., Kozlovtsceva E.A., Arkhipova L.M., Kaplan M.A., Ivanov S.A., Kaprin A.D. Photodynamic therapy of the experimental tumors of different morphological types with liposomal boronated chlorin e6, *Biomedical Photonics*, 2021, T. 10, No. 3, pp. 12–22 (in Russian). doi: 10.24931/2413–9432–2021–10–3–12–22

Contacts: Abramova O.B., e-mail: olyabramova@gmail.com

Введение

Проблема борьбы со злокачественными новообразованиями остается приоритетной для современного общества. Возможности клинической онкологии значительно увеличились с внедрением метода фотодинамической терапии (ФДТ), и в настоящее время она успешно занимает свое место в лечении онкологических пациентов [1, 2]. ФДТ – эффективный метод лечения, проводимый с использованием современных полупроводниковых лазеров и препаратов – фотосенсибилизаторов (ФС). ФС селективно накапливаются в ткани опухолей и при локальном воздействии лазерного облучения генерируют образование синглетного кислорода и других активных радикалов, оказывающих цитотоксический эффект на опухоль. Реализация эффектов ФДТ напрямую зависит от того, в каких структурах опухолевого узла ФС накопился во время проведения сеанса терапии. Мишенями фотохимических воздействий являются многие клеточные структуры: клеточные мембраны, митохондрии и микротрубочки. По мере прогрессирования повреждения мембран могут наблюдаться и другие электролитные нарушения, цитокиновые реакции, обусловленные стимуляцией продукции фактора некроза опухоли, активацией макрофагов, лейкоцитов и лимфоцитов. Сублетальное повреждение клеток посредством вовлечения многих сигнальных систем может индуцировать апоптоз. Кроме прямого цитотоксического воздействия на опухолевые клетки важную роль в деструкции новообразования могут играть и не прямые эффекты, такие как ишемический некроз вследствие повреждения эндотелия кровеносных сосудов и тромбоза [3, 4].

Для дальнейшего совершенствования метода ФДТ требуется поиск новых ФС, обладающих более высокой фотоактивностью, опухолетропностью, способностью к возбуждению в ближнем инфракрасном диапазоне спектра. Необходимо создавать безопасные лекарственные средства, обеспечивающие достаточный терапевтический эффект при минимальном повреждении окружающих тканей и отсутствии общетоксического действия. Большой интерес в качестве ФС вызывают производные ряда хлорофилла [5–8]. Ведутся активные работы по созданию новых форм хлориновых ФС, например, путем конъюгации существующих форм ФС с липосомами, что расширяет спектр их возможностей. Они проявляют на поря-

док большую световую токсичность при отсутствии темновой токсичности, повышают селективность накопления в опухоли, что увеличивает эффективность ФДТ при использовании меньших доз ФС [9–16].

Борированный хлорин еб – оригинальный отечественный препарат, обладающий как фотоактивными свойствами, так и может быть использован для лучевой терапии, в частности для нейтрон-захватной терапии (НЗТ). В ФС был введен бор, обладающий нейтрон-захватными свойствами. Кроме того, при модификации ФС путем присоединения борных кластеров к тетрапиррольному макроциклу существенно оптимизировались свойства противоопухолевого препарата. Механизм действия борированных производных хлорина еб включает глубокое проникновение в липидный бислой мембраны клеток благодаря свойствам борного полиэдра, что обеспечивает необратимое повреждение опухолевых клеток благодаря индукции первичного некроза. Таким образом синтезированный борированный хлорин еб позволяет проводить ФДТ и при необходимости дополнить ее НЗТ. Экспериментальные исследования, проведенные с борированным хлорином еб, свидетельствовали о его хороших фотоактивных свойствах и низкой токсичности [17–21].

Целью исследования являлось обобщение результатов экспериментальных исследований по изучению противоопухолевой эффективности новой лекарственной формы на основе борированного хлорина еб – липосомального борированного хлорина еб (ФС ЛБХ) на различных моделях опухолей: саркома М–1 и альвеолярный рак печени РС–1 крыс, меланома В16 и карцинома Эрлиха мышей.

Материалы и методы

В качестве ФС использовали липосомальный борированный хлорин еб.

В Институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН был синтезирован (патент РФ № 2406726) препарат – борированный хлорин еб (рис. 1).

В ГОУ ВПО ПМГМУ им. И.М. Сеченова на кафедре фармацевтической технологии и фармакологии на основе борированного хлорина еб была разработана и синтезирована новая лекарственная форма мембраноактивного ФС для ФДТ и НЗТ «Борхлорин липосомальный лиофилизат», используемый для приготовления раствора для инъекций.

(13 (1)-N-{2- [N- (клозо-монокарбадодекаборат-1этил) метил] аминоэтил} амид-15 (2), 17 (3) – диметилового эфира хлорина е6

(The patent of the Russian Federation № 2406726)
(13 (1)-N – {2 [N – (closo-monocarbadodecaborate-1ethyl) methyl] aminoethyl} amide-15 (2), 17 (3) – dimethyl ether chlorin e6

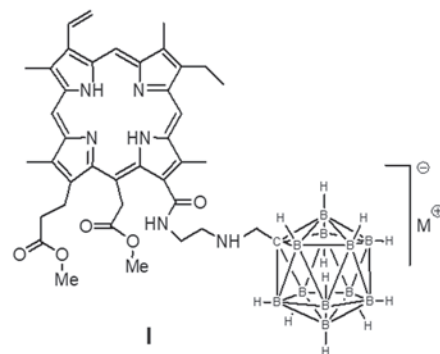


Рис. 1. Структурная формула борированного хлорина е6.
Fig. 1. The structural formula of boronated chlorin e6.

Состав липосомальной формы: борхлорин/лецитин 1:200 и лецитин/холестерин 3:1, обеспечивает включение борхлорина на уровне 99%, ПЭГ-ДГФА, приемлемый размер липосом 185 ± 10 нм и значение pH 6,9 [12].

Препарат животным вводили интраперитонеально и внутривенно. В качестве экспериментальных моделей опухолей использовали саркому М-1 и альвеолярный рак печени РС-1 крыс, меланому В16 и карцинома Эрлиха мышей. Работа выполнена с соблюдением международных рекомендаций по проведению исследований с использованием лабораторных животных.

Исследования эффективности ФДТ саркомы М-1 (62 крысы) и альвеолярного рака печени РС-1 (42 крысы) проведены на беспородных крысах массой тела 150–180 г. Опухоли перевивали под кожу в область бедра в виде кусочков опухоли донора. В опыт животных с саркомой М-1 включали на 7–9 день, когда пальпируемая опухоль достигала в диаметре 0,7–1,0 см, животных с РС-1 – на 11–13 сутки, при достижении опухолью диаметра от 1,2 до 1,6 см.

Исследование эффективности ФДТ меланомы В16 проводили на 183 мышах-гибридах первого поколения F1 (CBA x C₅₇BL/6j) с массой тела 20 г. Меланому перевивали мышам в виде клеточной суспензии объемом 0,10–0,15 мл. В опыт мышей включали на 4–5 день, когда диаметр опухоли достигал 0,4–0,6 см. Эффективность ФДТ карциномы Эрлиха изучали на беспородных мышах (n=87). Для воспроизведения солидной опухоли асцитическую жидкость от мышей-доноров по 0,05 мл вводили подкожно в область бедра. Мышей включали в опытную группу на 4 сутки после перевивки, когда диаметр опухоли достигал размера 0,8–1,0 см.

Контролем служили животные-опухоленосители, которые не подвергались воздействию ФДТ. Дизайн исследования представлен в табл. 1.

Лекарственно-световой интервал, то есть время от момента введения ФС до облучения лазером, был

определен на основании данных фармакокинетических исследований, проведенных методом лазерной флуоресцентной диагностики на установке ЛЭСА-01-«Биоспек». Облучение проводилось при высоком уровне накопления ФС в опухоли и максимальном индексе контрастности опухоль/окружающая ткань.

Источником лазерного излучения служил полупроводниковый лазерный аппарат «Аткус-2» производства ЗАО «Полупроводниковые приборы» (Санкт-Петербург, Россия) с длиной волны излучения 662 ± 1 нм. Диаметр светового пятна составлял 1,0–2,0 см.

Животные во время облучения находились под общим тиопенталовым наркозом. Тиопентал натрия вводили внутривенно: мышам по 0,03 мл 1,25% раствора на 10 г массы тела; крысам по 0,2 мл 2,5% раствора на 100 г массы животного.

Объем опухоли измеряли: до проведения ФДТ (V_0) и на 3, 7, 10, 14 и 21 сутки (V_t) после терапии.

Эффективность ФДТ оценивали в соответствии с рекомендациями Фармакологического комитета по предклинической апробации препаратов [22] по параметрам:

1. Коэффициент абсолютного прироста опухоли (К).

Для этого сначала вычисляли объемы опухоли по формуле:

$$V = \frac{1}{6} \pi * d_1 * d_2 * d_3 \quad (1), \text{ где:}$$

d_1, d_2, d_3 – три взаимно перпендикулярные диаметры опухоли;

V – объем опухоли в см³.

К рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0} \quad (2), \text{ где:}$$

V_0 – объем опухоли до воздействия;

V_t – объем опухоли в определенный срок наблюдения.

Таблица 1
Схема экспериментов
Table 1
Experimental design

Опухоль / Tumor	Тест-система / Test system	Доза ФС мг/кг / PS dose mg/kg	Метод введения / Method of administration	Параметры облучения / Irradiation parameters	
				Е Дж/см ² / E J/cm ²	Ps Вт/см ² / Ps W/cm ²
Саркома М-1 / Sarcoma M-1	крысы / rats	0,75	Интраперитонеально / Intraperitoneal	150	0,25
		1,25			
		2,5			
		5,0			
Альвеолярный рак печени РС-1 / Alveolar liver cancer RS-1	крысы / rats	2,5	Интраперитонеально / Intraperitoneal	150	0,25
		5,0			
Меланома В16 / Melanoma B16	мыши / mice	5,0	Интраперитонеально / Intraperitoneal	150	0,25
		5,0		150	0,51
		5,0		300	0,44
		7,5		150	0,51
		7,5		30	0,44
		10,0		150	0,25
		10,0		150	0,51
		10,0		300	0,44
Карцинома Эрлиха / Ehrlich Carcinoma	мыши / mice	0,7	Интраперитонеально / Intraperitoneal	100	0,51
		1,25		100	0,51
		2,5		100	0,28
		2,5		100	0,51
Карцинома Эрлиха / Ehrlich Carcinoma	мыши / mice	1,25	Внутривенно / Intravenous	150	0,51
		2,5		100	0,51

2. Торможение роста опухоли (ТРО,%) рассчитывали по формуле:

$$TGI \% = \frac{V_k - V_o}{V_k} * 100 \% \quad (3), \text{ где:}$$

V_k – средний объем опухоли в контрольной группе;

V_o – средний объем опухоли в опытной группе.

3. Процент животных в группе с полной регрессией опухоли (ПР,%) ($K = -1,00$). За ПР опухоли принимали отсутствие видимой и пальпируемой опухоли.
4. В некоторых исследованиях определяли процент излеченных животных: отсутствие рецидивирования опухоли в течение 90 суток после ФДТ.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в компьютерной программе «Statistica» непараметрическими методами для независимых групп (описательная статистика, значимость различий признаков). Оценку статистической значимости различий сравниваемых признаков в группах проводили с помощью метода U теста Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Саркома М-1

Уровень высокого и максимального накопления препарата в опухоли и самый высокий индекс контрастности наблюдался через 3–3,5 ч, данный интервал является оптимальным для проведения лазерного облучения. При проведении ФДТ в оптимальные сроки с плотностью энергии лазерного воздействия (Е) 150 Дж/см² и плотностью мощности (Ps) 0,25 Вт/см² были подобраны дозы ФС, при введении которых наблюдался максимальный противоопухолевый эффект: ПР опухоли у 100% животных на 21 сутки после ФДТ (см. рис. 2, табл. 2).

Максимальный противоопухолевый эффект получен при внутривенном введении ФС ЛБХ в малой дозе 1,25 мг/кг массы тела (табл. 2).

При наблюдении за животными до 90 суток после ФДТ с примененной дозой ЛБХ 1,25 мг/кг массы тела рецидив наблюдался у 10% крыс. Излеченность у 100% животных получена с дозой ФС 2,5 мг/кг массы тела при тех же параметрах лазерного воздействия ($E=150$ Дж/см² и $Ps=0,25$ Вт/см²) (табл. 2) [23].

РС-1

Исходя из проведенных фармакокинетических исследований, самый высокий индекс контрастности

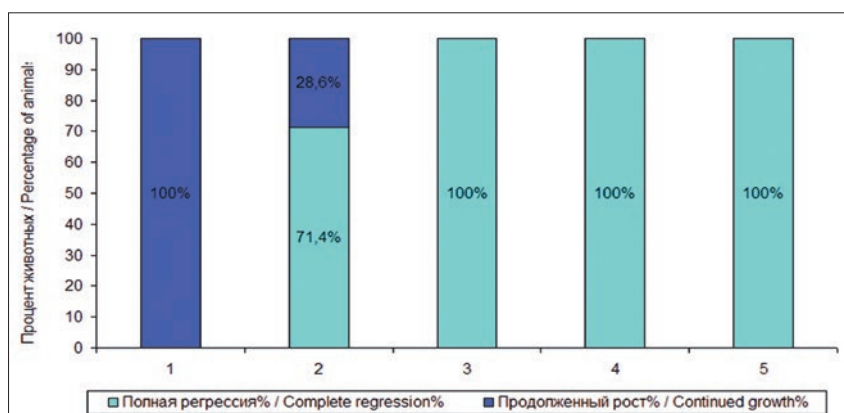


Рис. 2. Эффективность ФДТ на 21 сутки в группе животных с саркомой М-1 при использовании разных доз ФС ЛБХ (мг/кг массы тела): 1 – контроль; 2–0,75; 3–1,25; 4–2,5; 5–5,0.

Fig. 2. Efficiency of PDT on the 21st day in the group of animals with sarcoma M-1 when using different doses of PS LBC (mg/kg of body weight): 1– control; 2–0.75; 3–1.25; 4–2.5; 5–5.0.

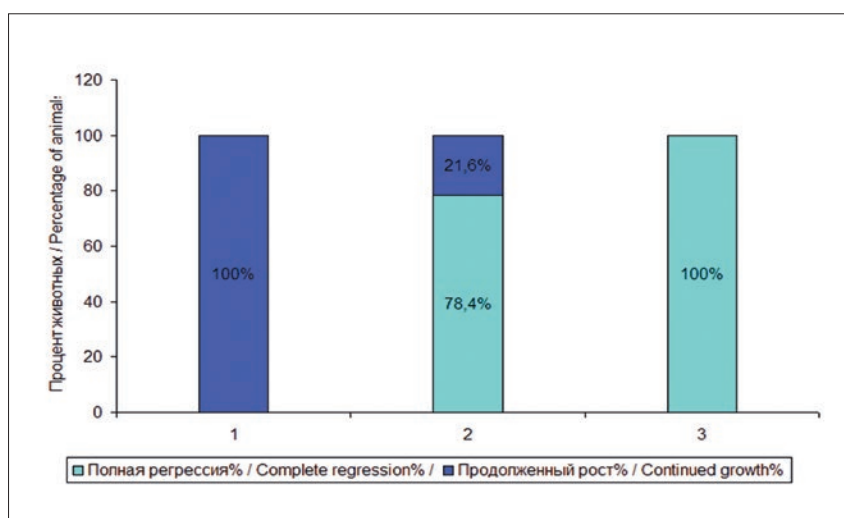


Рис. 3. Эффективность ФДТ на 21 сутки в группе животных с РС-1 при использовании разных доз ФС ЛБХ (мг/кг массы тела): 1 – контроль; 2–2,5; 3–5,0.

Fig. 3. The effectiveness of PDT on day 21 in the group of animals with PC-1 when using different doses of PS LBC (mg/kg of body weight): 1 – control; 2–2.5; 3–5.0.

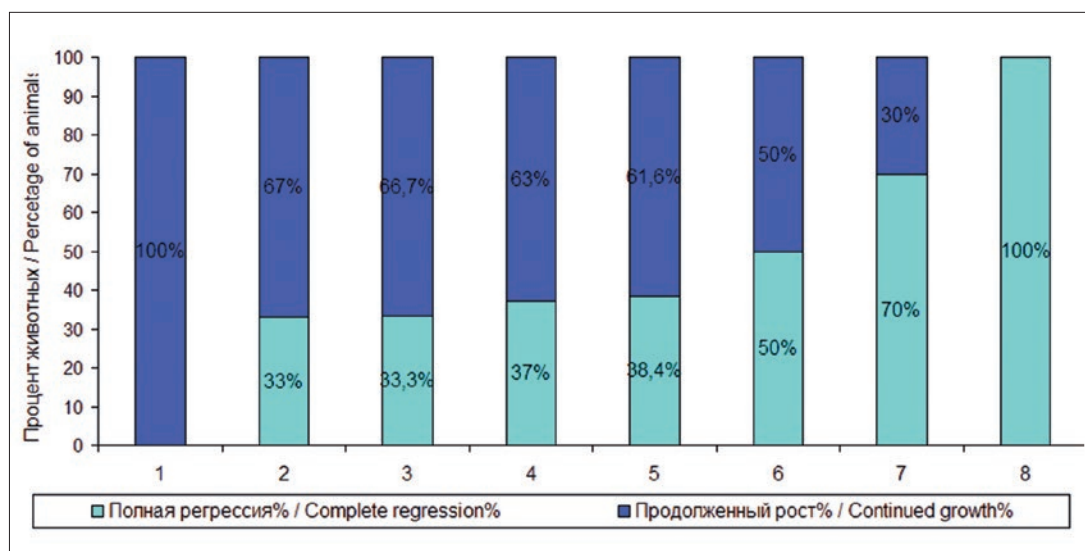


Рис. 4. Эффективность ФДТ на 21 сутки в группе животных с меланомой В16 при использовании разных доз ФС ЛБХ и с разными параметрами облучения: 1 – контроль; 2–2,5 мг/кг; 150 Дж/см²; 0,51 Вт/см²; 3–5,0 мг/кг; 100 Дж/см²; 0,51 Вт/см²; 4–5,0 мг/кг; 150 Дж/см²; 0,44 Вт/см²; 5–5,0 мг/кг; 300 Дж/см²; 0,44 Вт/см²; 6–5,0 мг/кг; 300 Дж/см²; 0,25 Вт/см²; 7–10 мг/кг; 150 Дж/см²; 0,25 Вт/см²; 8–10 мг/кг; 300 Дж/см²; 0,44 Вт/см².

Fig. 4. Efficiency of PDT with different doses of PS LBC and different irradiation parameters on the 21st day in the group of animals with melanoma B16: 1 – control; 2–2.5 mg/kg; 150 J/cm²; 0.51 W/cm²; 3–5.0 mg/kg; 100 J/cm²; 0.51 W/cm²; 4–5.0 mg/kg; 150 J/cm²; 0.44 W/cm²; 5–5.0 mg/kg; 300 J/cm²; 0.44 W/cm²; 6–5.0 mg/kg; 300 J/cm²; 0.25 W/cm²; 7–10 mg/kg; 150 J/cm²; 0.25 W/cm²; 8–10 mg/kg; 300 J/cm²; 0.44 W/cm².

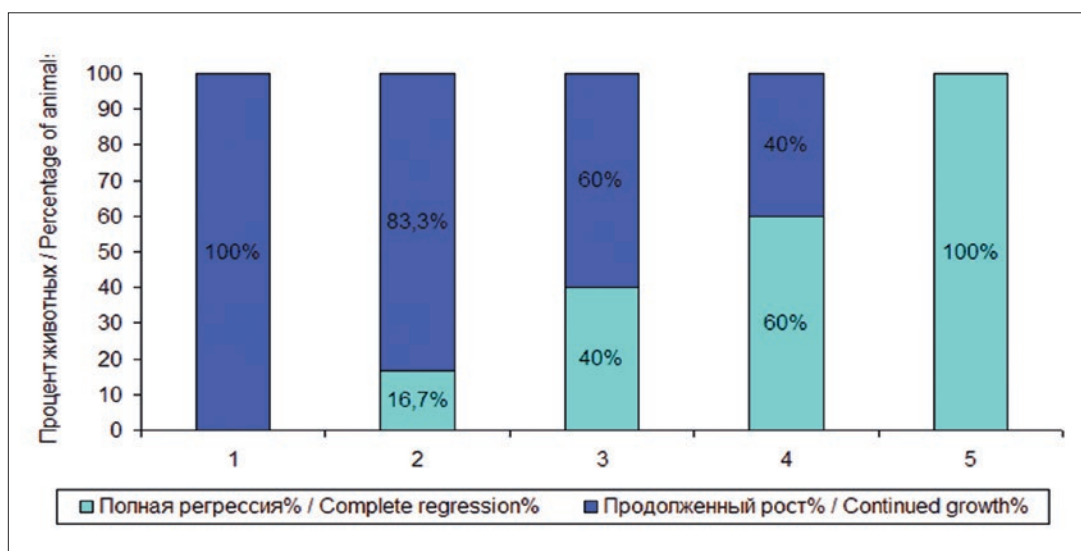


Рис. 5. Эффективность ФДТ при интраперитонеальном введении разных доз ФС ЛБХ и с разными параметрами облучения на 21 сутки в группе животных с карциномой Эрлиха: 1 – контроль; 2–0,70 мг/кг; 100 Дж/см²; 0,51 Вт/см²; 3–1,25 мг/кг; 100 Дж/см²; 0,51 Вт/см²; 4–2,5 мг/кг; 100 Дж/см²; 0,28 Вт/см²; 5–2,5 мг/кг; 100 Дж/см²; 0,51 Вт/см².

Fig. 5. Efficiency of PDT with different doses of PS LBC (intraperitoneal administration) and different irradiation parameters on day 21 in the group of animals with Ehrlich's carcinoma: 1 – control; 2–0,70 mg/kg; 100 J/cm²; 0,51 W/cm²; 3–1,25 mg/kg; 100 J/cm²; 0,51 W/cm²; 4–2,5 mg/kg; 100 J/cm²; 0,28 W/cm²; 5–2,5 mg/kg; 100 J/cm²; 0,51 W/cm².

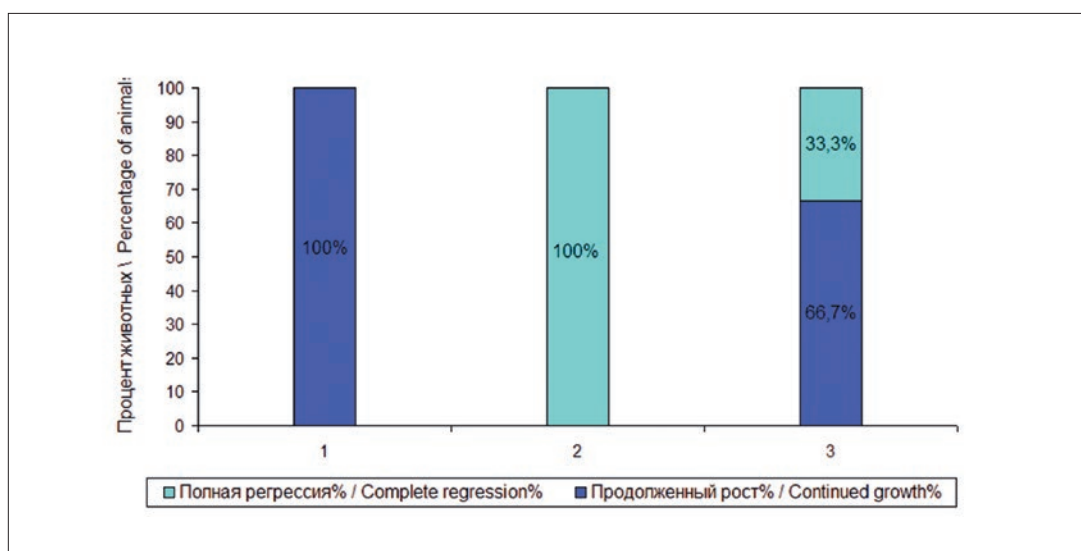


Рис. 6. Эффективность ФДТ при внутривенном введении разных доз ФС ЛБХ и с разными параметрами облучения на 21 сутки в группе животных с карциномой Эрлиха: 1 – контроль; 2–1,25 мг/кг; 150 Дж/см²; 3–2,5 мг/кг; 100 Дж/см².

Fig. 6. Efficiency of PDT with different doses of PS LBC (intravenous administration) and different irradiation parameters on the 21st day in a group of animals with Ehrlich's carcinoma: 1 – control; 2–1,25 mg/kg; 150 J/cm²; 3–2,5 mg/kg; 100 J/cm².

наблюдали через 2,5 ч, то есть это время проведения лазерного облучения было оптимальным. Несмотря на значительный первоначальный размер опухоли и ее агрессивность, при интраперитонеальном введении ФС ЛБХ после ФДТ был получен максимальный противоопухолевый эффект: ПР опухоли у 100% животных при наблюдении до 21 суток после воздействия ($E=150$ Дж/см² и $P_s=0,25$ Вт/см²) (рис. 3, табл. 3).

Значительный ингибирующий эффект, заключающийся в ПР опухоли у 78,4% животных, был получен при введении ФС в дозе 2,5 мг/кг массы тела. Максимально эффективная доза ФС, приводящая к ПР опухоли РС-1 у 100% животных до 21 суток исследования после ФДТ ($E = 150$ Дж/см² и $P_s = 0,25$ Вт/см²) с ФС ЛБХ, составляла 5,0 мг/кг массы тела (табл. 2) [24, 25].

Таблица 2

Динамика роста перевивных опухолей после ФДТ с ФС ЛБХ в разных дозах и при различных параметрах лазерного излучения
Table 2

Dynamics of the growth of transplanted tumors after PDT with liposomal boronated chlorin e6 at different doses and at different parameters of laser radiation

№	Схема опыта / The experiment scheme	1. Коэффициент прироста опухоли (К) / The coefficient of tumor growth (K); 2. Торможение роста опухоли (ТРО,%) / Tumor growth inhibition (TGI,%); 3. Процент животных с полной регрессией опухоли (ПР, %) / The percentage of animals with complete tumor regression (CR,%) 4. Процент излеченных животных (90 сут)/ Percentage of animals healed (90 days)					
		Время исследования после ФДТ / Time of research after PDT					
		3 сут / 3 days	7 сут / 7 days	10 сут / 10 days	14 сут / 14 days	21 сут / 21 days	90 сут / 90 days
Саркома М–1 крыс / rat Sarcoma M-1 (Е=150 Дж/см² / J/cm²; Ps=0,25 Вт/см² / W/cm²)							
1.	0,75 мг/кг/ 0,75 mg/kg	ПР/CR=100%				K / K=0,19±0,57* ТРО / TGI=94,0% ПР / CR=85,7%	ПР/CR=71,4%
2.	1,25 мг/кг/ 1,25 mg/kg	ПР/CR=100%					ПР/CR=90,0%
3.	2,5 мг/кг / 2,5mg/kg	ПР/CR=100%					
Контроль(К)/ Control (K)		K/K=1,28 ±0,23	K/K=6,97 ±1,25	K/K= 12,82±2,41	K/K=20,36±3,65	K/K= 52,54±10,56	**
Альвеолярный рак печени РС–1 крыс / rat Alveolar liver cancer RS–1 (Е=150 Дж/см² / J/cm²; Ps=0,25 Вт/см² / W/cm²)							
1.	2,5 мг/кг / 2,5 mg/kg	ПР/CR=100%			K / K=0,57±0,31* ТРО / TGI=98,1% ПР / CR=85,7%	K / K= 2,74±1,99* ТРО / TGI=91,4% ПР / CR=78,4%	**
2.	5,0 мг/кг / 5,0 mg/kg	ПР/CR=100%					**
Контроль (К) / Control (K)		K/K=0,48 ± 0,10	K/K=1,94 ± 0,40	K/K=4,96 ± 0,84	K/K=10,41 ±1,62	K/K=23,25 ±6,26	**
Меланома В16 мышей / mouse Melanoma В16							
1.	10,0 мг/кг; 150 Дж/см²; 0,25 Вт/см² / 10,0 mg/kg; 150 J/cm²; 0,25 W/cm²	ПР/CR=100%		K/K=0,68±1,19 ТРО/TGI=87,8% ПР/CR=80,0 %	K/K=1,76±1,76 ТРО/TGI=88,4% ПР/CR=70,0%	K/K=6,44±6,64* ТРО/TGI=89,0% ПР/CR=70,0%	**
2.	10,0 мг/кг; 300 Дж/см²; 0,44 Вт/см² / 10,0 mg/kg; 300 J/cm²; 0,44 W/cm²	ПР/CR=100%					**
Контроль (К) / Control (K)		K/K=0,57 ±0,20	K/K=2,01 ±0,54	K/K=4,74 ±1,02	K/K=12,89±4,58	K/K= 53,17±13,06	**
Карцинома Эрлиха мышей (интраперитонеальное введение) / mouse Ehrlich carcinoma (intraperitoneal administration) (Е=100 Дж/см² / J/cm²)							
1.	1,25 мг/кг 150 Дж/см²/ 1,25 mg/kg 150 J/cm²	ПР/CR=100%					**
2.	2,5 мг/кг 100 Дж/см²/ 2,5 mg/kg 100 J/cm²	ПР/CR=100%				K/K=0,72 ± 0,39* ТРО/TGI=92,4% ПР/CR=66,7%	**
Контроль (К) / Control (K)		K/K=2,44 ± 0,64	K/K=4,43 ± 0,96	K/K=7,87 ± 1,83	K/K=15,41±5,03	K/K=32,32±12,55	**

№	Схема опыта / The experiment scheme	1. Коэффициент прироста опухоли (К) / The coefficient of tumor growth (K); 2. Торможение роста опухоли (ТРО,%) / Tumor growth inhibition (TGI,%); 3. Процент животных с полной регрессией опухоли (ПР, %) / The percentage of animals with complete tumor regression (CR,%) 4. Процент излеченных животных (90 сут)/ Percentage of animals healed (90 days)					
		Время исследования после ФДТ / Time of research after PDT					
		3 сут / 3 days	7 сут / 7 days	10 сут / 10 days	14 сут / 14 days	21 сут / 21 days	90 сут / 90 days
Карцинома Эрлиха мышей (внутривенное введение) / mouse Ehrlich carcinoma (intravenous administration) (Ps=0,51 Вт/см² / W/cm²)							
1,25 мг/кг 150 Дж/см²/ 1,25 mg/kg 150 J/cm²		ПР/CR=100%					**
2,5 мг/кг 100 Дж/см²/ 2,5 mg/kg 100 J/cm²		ПР/CR=100%				K/K=0,72 ± 0,39* ТРО/TGI=92,4% ПР/CR=66,7%	**
Контроль (К) / Control (K)		K/K=2,44 ± 0,64	K/K=4,43 ± 0,96	K/K=7,87 ± 1,83	K/K=15,41±5,03	K/K=32,32±12,55	**

Примечание:

* – коэффициент абсолютного прироста опухоли в опыте достоверно ниже по сравнению с контролем (p < 0,05);

** – нет данных (замеры объемов опухолей заканчивали на 21 сутки после ФДТ, поскольку на этот срок в контроле начинался падеж животных и дальнейшее сравнение перестает быть корректным. На 90 сутки выживших животных во всех контрольных группах не было, соответственно расчет ТРО не проводили).

Notes:

* – the coefficient of absolute tumor growth in the experiment is significantly lower than in the control (p < 0,05);

** – no data (measurements of tumor volumes were done on day 21 after PDT, since at this time the deaths of animals started in the control and further comparison ceased to be correct. On day 90, there were no surviving animals in any control groups, so the calculation of TGI was not performed.)

Таблица 3

Динамика роста саркомы М-1 крыс после ФДТ с интраперитонеальным введением борированного хлорина е6

Table 3

Dynamics of M-1 sarcoma growth in rats after PDT with intraperitoneal injection of boronated chlorin e6

№	Схема проведения ФДТ / PDT scheme	1. Коэффициент прироста опух. (K) / The coefficient of tumor growth (K); 2. Торможение роста опухоли (TPO, %) / Tumor growth inhibition (TGI,%); 3.Процент животных с полной регрессией опухоли (ПР, %) / The percentage of animals with complete tumor regression (CR,%)					
		Время исследования после ФДТ / Time of research after PDT					
		3 сут / 3 days	7 сут / 7 days	10 сут / 10 days	14 сут / 14 days	21 сут / 21 days	
(E=150 Дж/см ² / J/cm ² ; Ps=0,25 Вт/см ² / W/cm ²)							
1.	1,25 мг/кг / 1,25 mg/kg	K / K= −0.88±0,12* TPO / TGI = 99,4% ПР / CR = 95,0%	K / K= −0.76±0,17* TPO / TGI = 98,2% ПР / CR = 90,0%	K / K = 0,14±0,60* TPO / TGI = 96,5% ПР / CR = 80,0%	K / K = 3.14±1,99* TPO / TGI = 93,3% ПР / CR = 75.0%	K / K = 25,86±11,10* TPO / TGI = 86,1% ПР / CR = 50,0%	
1.	2,5 мг/кг / 2,5 mg/kg	ПР/CR=100%					K / K = 0,30 ± 1,30* TPO / TGI = 99,4% ПР / CR = 92,0%
2.	5,0 мг/кг / 5,0 mg/kg	ПР/CR=100%					
Контроль (K) / Control (K)		K / K = 1,42 ± 0,18	K / K = 8,20 ± 1,14	K / K = 16,44 ± 2,22	K / K = 26,96 ± 3,91	K / K = 61,54 ± 9,73	

Меланома В16

Меланома одна из самых агрессивных опухолей. Было поставлено большое количество опытов с разными дозами ФС, различными параметрами лазерного излучения и соответствующим контролем в каждой опытной серии. Результаты не были стабильными, особенно при малых дозах ФС и низких величинах параметров лазерного излучения. При увеличении дозы ФС и параметров лазерного излучения наблюдалась наиболее выраженная и стойкая регрессия опухоли (рис. 4).

Согласно результатам фармакокинетических исследований установлено оптимальное время проведения лазерного облучения: через 2,0 ч после введения ФС. Максимальный противоопухолевый эффект был получен с дозой ФС 10,0 мг/кг массы тела и параметрах лазерного излучения $E = 300 \text{ Дж/см}^2$ и $P_s = 0,44 \text{ Вт/см}^2$ (табл. 2) [26].

Карцинома Эрлиха

Интраперитонеальное введение. Оптимальное время проведения лазерного облучения после введения ФС ЛБХ в дозе 2,5 мг/кг массы тела наступает через 1,5 ч. Противоопухолевый эффект зависит от дозы ФС и параметров лазерного излучения (рис. 5).

Максимальный противоопухолевый эффект, приводящий к ПР карциномы Эрлиха у 100% животных до 21 суток после ФДТ, проявляется при внутрибрюшинном введении ФС в дозе 2,5 мг/кг массы тела и параметрах лазерного излучения $E=100 \text{ Дж/см}^2$ и $P_s=0,51 \text{ Вт/см}^2$. На 90 сутки после терапии получен высокий уровень излеченности животных (80% случаев) (табл. 2).

Внутривенное введение. Оптимальное время проведения лазерного облучения после внутривенного введения ФС ЛБХ в дозе 2,5 мг/кг массы тела наступает через 30–75 мин (рис. 6).

Максимальная эффективность терапии животных с карциномой Эрлиха отмечалась при дозе ФС 1,25 мг/кг массы тела, плотности энергии 150 Дж/см^2 и плотности мощности $0,51 \text{ Вт/см}^2$ лазерного излучения. При увеличении дозы ФС до 2,5 мг/кг массы тела и снижении плотности энергии лазерного излучения до 100 Дж/см^2 был получен значительный противоопухолевый эффект, заключающийся в ТРО в 92,4% наблюдений при 66,7% ПР (табл. 2) [27].

В табл. 2 представлены результаты исследований противоопухолевой эффективности ФС ЛБХ еб в опытных группах.

Ранее нами был проведен анализ эффективности борированного хлорина на модели саркомы М–1 крыс [28] (табл. 3).

Сравнение результатов исследования двух форм препарата выявило явное преимущество ФС ЛБХ по сравнению с не липосомальной формой. Максимальная эффективность ФДТ с ФС ЛБХ в отношении саркомы М–1 наблюдалась при дозе 1,25 мг/кг массы тела, что в 4 раза ниже дозы борированного хлорина (5,0 мг/кг), приводящей к такому же противоопухолевому ответу при прочих равных условиях.

Заключение

На основе результатов проведенных нами исследований показано, что отечественный фотосенсибилизатор ЛБХ обладает высокой противоопухолевой активностью *in vivo*. Путем подбора доз ФС и параметров лазерного воздействия был получен максимальный ингибирующий эффект (ПР у 100% животных до 21 суток после проведения ФДТ) на всех использованных опухолевых моделях: саркома М–1 и альвеолярный рак печени РС–1 крыс, меланома В16 и карцинома Эрлиха мышей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Filonenko E.V. The history of development of fluorescence diagnosis and photodynamic therapy and their capabilities in oncology//Russian Journal of General Chemistry. – 2015. – Vol. 85 (1). – P. 211–216.
2. Ancély Ferreira dos Santos, Daria Raquel Queiroz de Almeida, Leticia Ferreira Terra, Mauricio S. Baptista, Leticia Labriola. Photodynamic therapy in cancer treatment – an update review//J Cancer Metastasis Treat. – 2019. – Vol. 25. (3). – P.1–20.
3. Allison, R.R. Photodynamic Therapy: PDT Mechanisms., R.R. Allison, K. Moghissi//Clin. Endosc. – 2013. – Vol. 46. – P. 24–29.
4. Бикбов Э.Н., Привалов В.А., Куренков Е.Л. Динамика морфологических изменений в опухоли при ФДТ в эксперименте//Иероглиф. – 2009. – № 21 – С. 41–59.
5. Juan Zhang, Chengshi Jiang, João Paulo Figueiró Longo, Ricardo Bentes Azevedo, Hua Zhang, Luis Alexandre Muehlmann. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy//Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2017. – Review. – P. 1–10.

REFERENCES

1. Filonenko E.V. The history of development of fluorescence diagnosis and photodynamic therapy and their capabilities in oncology. *Russian Journal of General Chemistry*, 2015, Vol. 85 (1), pp. 211–216.
2. Ancély Ferreira dos Santos, Daria Raquel Queiroz de Almeida, Leticia Ferreira Terra, Mauricio S. Baptista, Leticia Labriola. Photodynamic therapy in cancer treatment – an update review. *J Cancer Metastasis Treat*, 2019, Vol. 25. (3), pp.1–20.
3. Allison, R.R. Photodynamic Therapy: PDT Mechanisms., R.R. Allison, K. Moghissi. *Clin. Endosc.*, 2013, Vol. 46, pp. 24–29.
4. Bikbov E.N., Privalov V.A., Kurenkov E.L. Dynamics of morphological changes in the tumor in PDT in the experiment. *Ieroglif*, 2009, № 21, pp. 41–59. (in Russian)
5. Juan Zhang, Chengshi Jiang, João Paulo Figueiró Longo et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2017, Review, pp. 1–10.
6. Ponomarev G.V. Prospects for creating photosensitizers based on natural chlorophyll A. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal*, 2007, Vol. 6 (1), p. 24. (in Russian).

6. Пономарев Г.В. Перспективы создания фотосенсибилизаторов на основе природного хлорофилла А//Российский биотерапевтический журнал. – 2007. Т. 6, № 1. – С. 24.
7. Странадко Е.Ф., Рябов М.В. Фотосенсибилизаторы хлориновой группы – шаг вперед в развитии фотодинамической терапии//Альманах клинической медицины. – 2006. – Т. XII. – С. 36–37.
8. Чан Тхи Хай Иен, Г.В. Раменская, Н.А. Оборотова. Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в фотодинамической терапии опухолей//Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 4, № 8. – С. 99–105.
9. А.О. Райков, А. Хашем, М.А. Барышникова. Липосомы для направленной доставки противоопухолевых препаратов//Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 15, № 2. – С. 90–96.
10. Круглякова А.А. Особенности фармакокинетики липосомальных препаратов//Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2012. – № 1. – С. 37–40.
11. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Орлова О.Л., Полозкова А.П., Агапов И.И., Кирпичников М.П. Липосомальная лекарственная форма борхлорина//Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 31–36.
12. Дмитриева М.В. Создание липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора на основе борированного хлорина//Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. Москва, 2015.
13. Ruud Weijer, Mans Broekgaarden, Milan Kos, Remko van Vught, Erik A.J. Rauws, Eefjan Breukink, Thomas M. van Gulik, Gert Storm, Michal Heger. Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery//Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. – 2015. – Vol. 23. – P. 103–131.
14. L. A. Muehlmann, G. A. Joanitti, J. R. Silva, J. P. F. Longo, R. B. Azevedo. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy//Brazilian journal of medical and biological research. – 2011. – Vol. 44. – P. 729–737.
15. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор)//Хим. фарм. журнал. – 2001. – Т. 35, № 4. – С. 32–38.
16. Mathias Viard, Anu Puri. Chapter One – Stimuli-Sensitive Liposomes: Lipids as Gateways for Cargo Release//Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. – 2015. – Vol. 22. – P. 1–41.
17. Luguya R, Fronczek F.R, Smith K.M, Vicente M.G. Synthesis of novel carboranyl chlorins with dual application in boron neutron Capture therapy (BNCT) and photodynamic therapy (PDT)//Appl Radiat Isot. – 2004. – Vol. 61. – P. 1117–1123.
18. Игнатова А.А., Маслова А.С., Кирпичников М.П., Феофанов А.В. Взаимодействие фотосенсибилизатора 13,15-N-(3'-гидроксипропил) циклоимида хлорина р6 с нормальными и раковыми клетками крови//Биоорганическая химия. – 2009. – Т. 35, № 6. – С. 830–836.
19. Рокицкая Т.И., Зайцев А.В., Ольшевская В.А., Калинин В.Н., Мойсенович М.М., Агапов И.И., Антоненко Ю.Н. Борированные производные хлорина е6 и фторсодержащих порфиринов как проникающие анионы: исследование на бислойных липидных мембранах//Биохимия. – 2012. – Т. 77, № 9. – С. 1177–1185.
20. Yuri N. Antonenko, Elena A. Kotova, Elena O. Omarova, Tatyana I. Rokitskaya, Valentina A. Ol'shevskaya, Valery N. Kalinin, Roza G. Nikitina, Julia S. Osipchuk, Mikhail A. Kaplan, Alla A. Ramonova, Mikhail M. Moisenovich, Igor I. Agapov, Mikhail P. Kirpichnikov. Photodynamic activity of the boronated chlorin e6 amide in artificial and cellular membranes//Biochimica et Biophysica Acta. – 2014. – Vol. 1838 (3). – P. 793–801.
21. Ryuji Asano, Amon Nagami, Yuki Fukumoto, Kaori Miura, Futoshi Yazama, Hideyuki Ito, Isao Sakata, Akihiro Tai. Synthesis and bio-
7. Stranadko E.F., Ryabov M.V. Photosensitizers of the chlorin group – a step forward in the development of photodynamic therapy. *Almanah klinicheskoy mediciny*, 2006, Vol. XII, pp. 36–37. (in Russian).
8. Chan Thi Hai Yen, G.V. Ramenskaya, N.A. Oborotova. Photosensitizers of the chlorin series in photodynamic therapy of tumors. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*, 2009, Vol. 4 (8), pp. 99–105. (in Russian)
9. A.O. Raikov, A. Hashem, M.A. Baryshnikova. Liposomes for targeted delivery of antitumor drugs. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*, 2015, Vol. 15 (2), pp. 90–96. (in Russian).
10. Kруглякова А.А. Features of pharmacokinetics of liposomal preparations. *Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv*, 2012, No. 1, pp. 37–40. (in Russian).
11. Dmitrieva M.V., Oborotova N.A., Orlova O.L. et al. Liposomal dosage form of borchlorin. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*, 2014, Vol. 13 (1), pp. 31–36. (in Russian).
12. Dmitrieva M.V. Creation of a liposomal dosage form of a photosensitizer based on borinated chloride. *Dissertation for the degree of Candidate of Pharmaceutical Sciences. Moscow*, 2015. (in Russian)
13. Ruud Weijer, Mans Broekgaarden, Milan Kos. et al. Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2015, Vol. 23, pp. 103–131.
14. L.A. Muehlmann, G.A. Joanitti, J.R. Silva, et al. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2011, Vol. 44, pp. 729–737.
15. Oborotova N.A. Liposomal dosage forms of antitumor drugs (review). *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*, 2001, Vol. 35 (4), pp. 32–38. (in Russian).
16. Mathias Viard, Anu Puri. Chapter One – Stimuli-Sensitive Liposomes: Lipids as Gateways for Cargo Release. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 2015, Vol. 22, pp. 1–41.
17. Luguya R, Fronczek F.R, Smith K.M, Vicente M.G. Synthesis of novel carboranyl chlorins with dual application in boron neutron Capture therapy (BNCT) and photodynamic therapy (PDT). *Appl Radiat Isot*, 2004, Vol. 61, pp. 1117–1123.
18. Ignatova A.A., Maslova A.S., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Interaction of photosensitizer 13,15-N – (3'-hydroxypropyl) cycloimide of chloride p6 with normal and cancer blood cells. *Bioorganicheskaja himija*, 2009, Vol. 35 (6), pp. 830–836. (in Russian).
19. Rokitskaya T.I., Zaitsev A.V., Olshevskaya V.A., et al. Borinated derivatives of e6 chloride and fluorinated porphyrins as penetrating anions: a study on bilayer lipid membranes. *Biohimija*, 2012, Vol. 77 (9), pp. 1177–1185. (in Russian)
20. Y.N. Antonenko, E.A. Kotova, E.O. Omarova, et al. Photodynamic activity of the boronated chlorin e6 amide in artificial and cellular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, Vol. 1838 (3), pp. 793–801.
21. Ryuji Asano, Amon Nagami, Yuki Fukumoto, et al. Synthesis and biological evaluation of new boron-containing chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014, Vol. 24 (5), pp. 1339–1343.
22. Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. *M. Grif and K*, 2012, Part 1, pp. 640–670. (in Russian).
23. Yu.S. Osipchuk, V.V. Drozhzhina. Photodynamic therapy of rat sarcoma M-1 using a new photosensitizer borchlorin liposomal lyophilizate. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal*, 2013, Vol. 12 (4), pp. 47–50. (in Russian).
24. Panchenkov D.N., Leonov S.D., Rodin A.V. Development of an algorithm for bioimpedance analysis of neoplasms on a model of a transferable tumor MS-1 in an experiment. *vestnik-surgery.ru> arhiv/20/20_3.pdf*, 2013, pp. 287–291. (in Russian).

- logical evaluation of new boron-containing chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer//*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2014. – Vol. 24 (5). – P. 1339–1343.
22. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств//М. Гриф и К. 2012.– Часть 1.– С. 640–670.
 23. Ю.С. Осипчук, В.В. Дрожжина. Фотодинамическая терапия саркомы М-1 крыс с использованием нового фотосенсибилизатора борхлорин липосомальный лиофилизат//*Российский биотерапевтический журнал*. – 2013.– Т. 12, № 4.– С. 47–50.
 24. Панченков Д.Н., Леонов С.Д., Родин А.В. Разработка алгоритма биоимпедансного анализа новообразований на модели перевиваемой опухоли РС-1 в эксперименте//*vestnik-surgery.ru> arhiv/20/20_3. pdf*. 201/3. С. 287–291.
 25. М.А. Каплан, В.Н. Галкин, Ю.С. Романко, Ю.С. Осипчук, В.В. Дрожжина, Т.И. Малова, В.А. Ольшевская. Изучение эффективности фотодинамической терапии экспериментальной опухоли РС-1 с использованием липосомального фотосенсибилизатора на основе борированного хлорина е6//*Радиация и риск*. –2016.– Т. 25, № 3.– С. 57–65.
 26. Ю.С. Осипчук, М.А. Каплан, В.В. Дрожжина. Фотодинамическая терапия меланомы В16 у мышей с новым фотосенсибилизатором борированным хлорином//*Biomedical Photonics Engineering*. – 2015 –Т.– 4, № 2.– С. 3–8.
 27. Бурмистрова Н.В., Дрожжина В.В., Каплан М.А., Южаков В.В., Бандурко Л.Н., Цыганова М.Г., Иванов С.А., Архипова Л.М., Абрамова О.Б. Фотодинамическая активность липосомального борированного хлорина е6//*Радиация и риск*. – 2019. – Т. 28. № 4.– С. 96–107. DOI: 10.21870/0131–3878–2019–28–4–96–107.
 28. Дрожжина В.В., Осипчук Ю.С. Сравнительный анализ противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов борированного хлорина и борхлорина липосомального лиофилизат после фотодинамической терапии саркомы М-1 крыс//*Российский биотерапевтический журнал*. – 2014. – Т. 13, № 3.– С. 45–50.
 25. M.A. Kaplan, V.N. Galkin, Yu.S. Romanko, et al. Study of the effectiveness of photodynamic therapy of an experimental MS-1 tumor using a liposomal photosensitizer based on borinated chloride е6. *Radiacija i risk*, 2016, Vol. 25 (3), pp. 57–65. (in Russian).
 26. Yu.S., Osipchuk, M.A. Kaplan, V.V. Drozhzhina. Photodynamic therapy of B16 melanoma in mice with a new photosensitizer borated chloride. *Biomedical Photonics Engineering*, 2015, Vol. 4 (2), pp. 3–8. (in Russian)
 27. Burmistrova N.V., Drozhzhina V.V., Kaplan M.A., et al. Photodynamic activity of liposomal borinated chlorin е6. *Radiacija i risk*, 2019, Vol. 28 (4), pp. 96–107. DOI: 10.21870/0131–3878–2019–28–4–96–107. (in Russian).
 28. Drozhzhina V.V., Osipchuk Yu.S. Comparative analysis of anti-tumor activity of photosensitizers of borinated chloride and borchlorin liposomal lyophilizate after photodynamic therapy of rat sarcoma M-1. *Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal*, 2014, Vol. 13 (3), pp. 45–50. (in Russian).