

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ ГИБЕЛИ НА МОДЕЛИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ КОЖИ

М.Л. Гельфонд^{1,2}, И.А. Балдуева^{1,2}, А.С. Барчук^{1,2}, Г.И. Гафтон^{1,3}, В.В. Анисимов¹, Ю.В. Семилетова^{1,2}, А.В. Новик¹, М.Ю. Мяснянкин², Т.Л. Нехаева¹, А.Б. Данилова¹, Е.В. Воробейчиков¹, А.И. Вааль¹, И.Г. Гафтон¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия

²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

В статье представлены результаты экспериментального исследования иммунного ответа клеток меланомы кожи человека Mel 226 на фотодинамическое воздействие. Изучен фотоиндуцированный апоптоз клеток меланомы кожи *in vitro*. Исследования показали, что облучение с препаратом фотодитазин в концентрациях 0,5–2,5 мкг/мл (экспозиция в течение 6 и 10 мин за 30 мин до облучения; параметры облучения: длина волны 662 нм, суммарная доза облучения от 40 до 60 Дж/см²) индуцирует ранний апоптоз. Увеличение времени лазерного облучения достоверно ускоряет переход фотосенсибилизированных опухолевых клеток из ранней фазы апоптоза в позднюю.

Ключевые слова: меланома кожи человека, апоптоз, иммунный ответ, апоптотический индекс, фотодинамическое воздействие, фотодитазин.

Для цитирования: Гельфонд М.Л., Балдуева И.А., Барчук А.С., Гафтон Г.И., Анисимов В.В., Семилетова Ю.В., Новик А.В., Мяснянкин М.Ю., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Воробейчиков Е.В., Вааль А.И., Гафтон И.Г. Изучение механизмов фотоиндуцированной гибели на модели клеток меланомы кожи // *Biomedical Photonics*. – 2016. – Т. 5, № 3. – С. 4–8.

Контакты: Гельфонд М.Л., e-mail: mark.gelfond@gmail.com

THE STUDY OF MECHANISMS OF PHOTOINDUCED APOPTOSIS IN THE SKIN MALIGNANT MELANOMA CELL MODEL

Gelfond M.L.^{1,2}, Baldueva I.A.^{1,2}, Barchuk A.S.^{1,2}, Gafton G.I.^{1,3}, Anisimov V.V.¹, Semiletova Yu.V.^{1,2}, Novik A.V.¹, Myasnyankin M.Yu.², Nekhaeva T.L.¹, Danilova A.B.¹, Vorobeychikov E.V.¹, Vaalj A.I.¹, Gafton I.G.¹

¹Federal State Institution N.N.Petrov Research Institute of Oncology of Federal Agency of High Technology Medical Assistance, Saint-Petersburg, Russia

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

³Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

The results of the experimental study of immune response of human skin malignant melanoma cells Mel 226 on photodynamic exposure are represented in the article. Photoinduced apoptosis of skin malignant melanoma was studied *in vitro*. The study showed that irradiation with the agent fotoditazin at dose of 0.5–2.5 µg/ml (6 and 10 min exposure 30 min before irradiation; irradiation parameters: wavelength of 662 nm, total light dose from 40 to 60 J/cm²) induced early apoptosis. The increase of the time of laser irradiation significantly accelerates the conversion of photosensitized tumor cells from early to late apoptosis.

Key words: human skin malignant melanoma, apoptosis, immune response, apoptotic index, photodynamic exposure, fotoditazin.

For citations: Gelfond M.L., Baldueva I.A., Barchuk A.S., Gafton G.I., Anisimov V.V., Semiletova Yu.V., Novik A.V., Myasnyankin M.Yu., Nekhaeva T.L., Danilova A.B., Vorobeychikov E.V., Vaalj A.I., Gafton I.G. The study of mechanisms of photoinduced apoptosis in the skin malignant melanoma cell model, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 3, pp. 4–8 (in Russian).

Contacts: Gelfond M.L., e-mail: mark.gelfond@gmail.com

Введение

Меланома кожи на сегодняшний день представляет собой чрезвычайно актуальную проблему. Заболеваемость этой формой злокачественной опухоли составляет 5,65 случаев на 100 тыс. населения, занимая по темпам прироста в Российской Федерации третье место. Среди пациентов в возрасте 20-25 лет эта нозологическая форма является четвертой по удельному весу среди всей онкопатологии [1,2].

Ежегодно 56,7% больных меланомой кожи получают лечение по поводу местно-распространенного опухолевого процесса. Большинство из них в дальнейшем умирает от прогрессирования заболевания. Пятилетняя выживаемость составляет 35% у мужчин и 53% у женщин [3]. Столь низкие показатели эффективности лечения при меланоме кожи связаны с высоким риском развития микрометастазов еще до хирургического лечения.

Теоретические предпосылки и практический опыт последних лет делают перспективным использование у данных больных фотодинамической терапии (ФДТ), что делает необходимым и целесообразным доклиническое изучение механизмов фотодинамического воздействия при лечении меланомы.

Предпосылкой к этой работе стали недавние исследования, показавшие, что такие инициированные фотодинамической терапией процессы, как апоптоз опухолевых клеток, развитие острой воспалительной реакции и распознавание CD8⁺ Т-лимфоцитами MHC I* рестриктированных эпитопов опухолеассоциированных антигенов могут стать «пусковым» механизмом в активации противоопухолевого иммунного ответа [4-9]. Кроме того, ФДТ обладает прямым цитотоксическим эффектом. Погибшие опухолевые клетки фагоцитируются, процессируются и презентуются макрофагами и дендритными клетками «наивным» Т-лимфоцитам в лимфатических узлах [10,11].

Задачей исследования являлось изучение *in vitro* фотоиндуцированного апоптоза клеток меланомы кожи человека под влиянием ФДТ.

Материал и методы

Для опытов *in vitro* использовали клеточную линию меланомы кожи человека (Mel 226), полученную в лаборатории клеточных технологий отделения химиотерапии и инновационных клеточных технологий и депонированную в Российском Банке клеточных линий позвоночных. Фотосенсибилизатор фотодитазин (ООО «БЕТА-ГРАНД», Россия, регистрационное удостоверение №ЛС 001246 от 18.05.2012) добавляли в культуральную среду в разных концентрациях: 1) 0,5 мкг/мл; 2) 1 мкг/мл (эквивалент дозе 1 мг/кг, рекомендованной в инструкции по медицинскому применению фотодитазина); 3) 2,5 мкг/мл. Через 30 мин проводили облучение культуры клеток лазерным излучением с длиной волны 662 нм с экспозицией на чашку Петри 6 и 10 мин. Суммарная доза облучения составила от 40 до 60 Дж/см². Анализ эффекта проводили через 1 и 4 ч после фотодинамического воздействия. Для этого к полученной суспензии клеток (1×10⁶/мл) добавляли аннексин V-FITC (Annexin V-FITC), FITC (Fluorescein Isothiocyanate) («BD», США) и пропидиум йодид (PI (Propidium Iodide) («BD», США), затем инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Подсчет клеток проводили с использованием флуоресцентного микроскопа («Carl Zeiss», Германия). Уровень апоптоза оценивали по апоптотическому индексу (АИ). Данный параметр отражает относительное число клеток с характерными морфологическими или биохимическими признаками апоптоза и определяется по следующей формуле:

$$\text{АИ} = \frac{\text{Количество апоптотических клеток}}{\text{Общее кол-во клеток}} \times 100\%$$

АИ учитывали отдельно для всех анализируемых клеток:

- клетки с зеленым окрашиванием, находящиеся на стадии раннего апоптоза (Annexin+; PI-), (рис. 1а);
- клетки с двойным окрашиванием (Annexin+; PI+) – на стадии позднего апоптоза (рис. 1б).

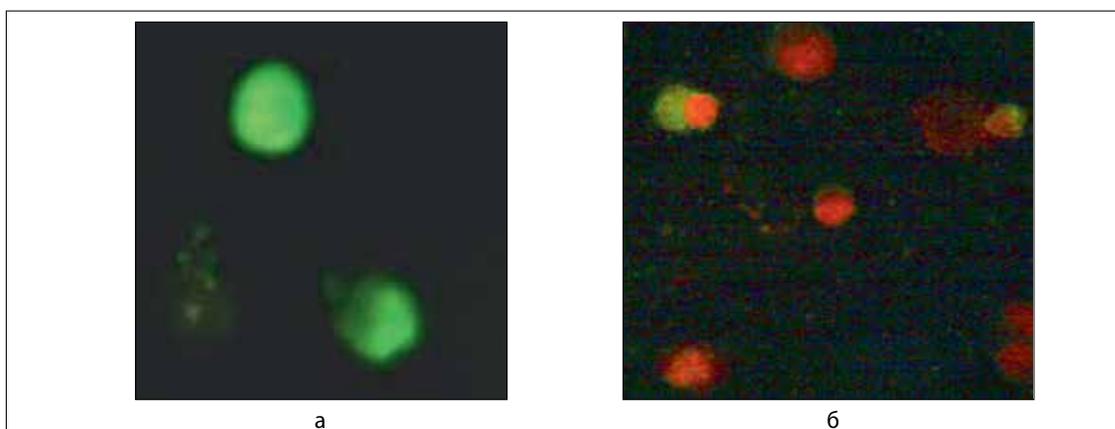


Рис. 1. Клетки меланомы кожи человека: а – на стадии раннего апоптоза; б – на стадии позднего апоптоза
Fig. 1. Human skin malignant melanoma: a – in early apoptosis; b – in late apoptosis

Результаты

Результаты подсчета АИ для клеток через 1 и 4 ч после ФДТ представлены на рис. 2 и рис. 3, соответственно.

Как видно на представленных рисунках, все изученные концентрации фотосенсибилизатора (0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 2,5 мкг/мл) обладают сопоставимой способностью индуцировать ранний апоптоз. При увеличении времени лазерного облучения происходит более быстрый переход фотосенсибилизированных опухолевых клеток в позднюю фазу апоптоза ($p < 0,05$).

Обсуждение

Механизмы клеточной смерти после ФДТ

Противоопухолевый эффект ФДТ обусловлен тремя взаимосвязанными процессами: прямой гибелью опухолевых клеток, повреждением сосудов и активацией неспецифического иммунного ответа [13-15].

В то время как их общий вклад в результат лечения хорошо известен, относительную значимость каждого из этих механизмов определить трудно. Манипулируя дозой света, временем облучения после введения фотосенсибилизатора или комбинацией этих факторов можно оценить роль каждого процесса в общем ответе на фотодинамическое действие.

Большинство экспериментальных данных свидетельствует о том, что при оптимальных режимах ФДТ (достаточная концентрация ФС и уровень освещенности) опухолевые клетки некротизируются. Факторы, способствующие некрозу, включают экстрамитохондриальную локализацию фотосенсибилизатора, высокие дозы света, гипогликемию [16-19]. Кроме того, на форму гибели клетки после ФДТ может влиять ее генотип [20].

При глубокой локализации опухоли в тканях (с освещением субоптимальными дозами света в начале сеанса) эффективность ФДТ может снижаться. При

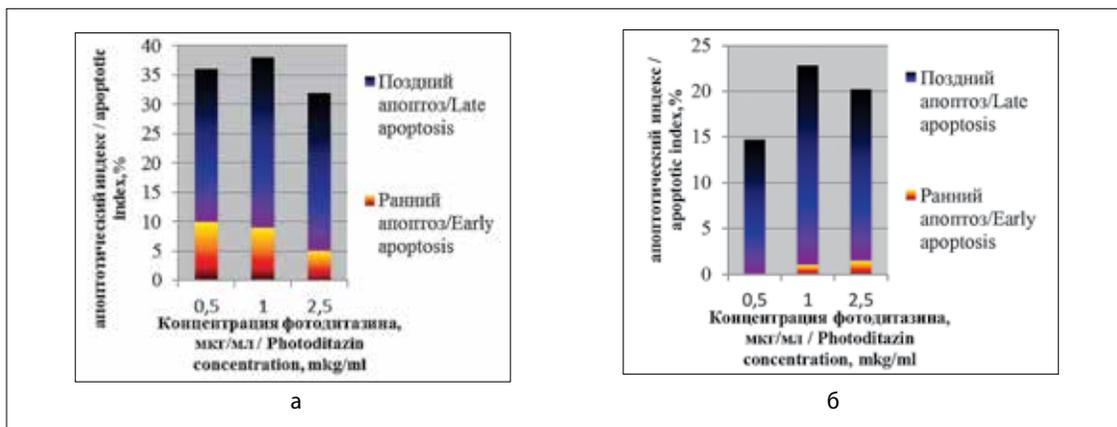


Рис. 2. Апоптотический индекс через 1 ч после ФДТ при раннем и позднем апоптозе: а – экспозиция 6 мин; б – экспозиция 10 мин

Fig. 2. Apoptotic index 1 h after PDT for early and late apoptosis: а – 6 min exposure; б – 10 min exposure

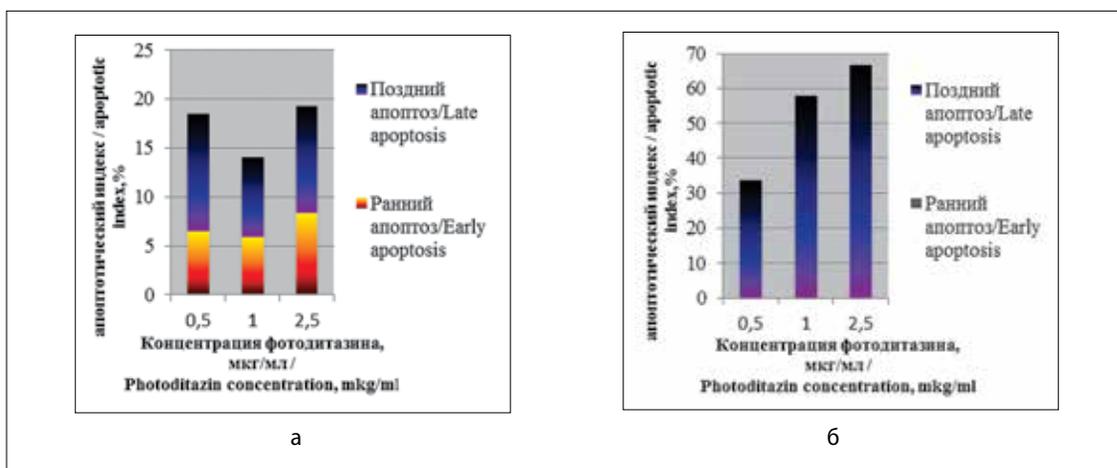


Рис. 3. Апоптотический индекс через 4 ч после ФДТ при раннем и позднем апоптозе: а – экспозиция 6 мин; б – экспозиция 10 мин

Fig. 3. Apoptotic index 4 h after PDT for early and late apoptosis: а – 6 min exposure; б – 10 min exposure

этом клетки опухоли способны противостоять этим воздействиям и восстанавливать повреждения. Если им удастся это сделать, то выживший клон даст начало рецидиву (если не будут иметь место смертельная ишемия или активация иммунного ответа).

Однако развитие событий возможно и по другому сценарию, когда опухолевые клетки вступают в процесс апоптоза – т.е. программированной гибели.

Индукция апоптоза

Апоптоз является жестко контролируемым, энергетически зависимым процессом программированной самоликвидации клеток при активации гидролитических ферментов, протеаз и нуклеаз, что приводит к фрагментации ДНК и деградации внутриклеточных структур [21].

Важнейшими морфологическими изменениями в результате данного процесса являются конденсация хроматина, клеточная фрагментация и продукция апоптотических телец, которые поглощаются окружающими клетками и фагоцитами.

После ФДТ с различными сенсibilизаторами и типами клеток апоптоз является быстрой и доминирующей формой клеточной смерти [22]. Фотодинамическая терапия вызывает апоптоз двумя основными патофизиологическими путями: митохондриальным или внутренним путем, и рецептор-опосредованная гибель или наружный путь [16].

Фотоиндуцированный апоптоз зависит также от отличных от внутреннего и внешнего клеточных сигнальных путей, таких как гомеостаз кальция, церамида и MAPK-киназа.

Влияние ФДТ на ДНК

Так как ДНК кодирует генетическую информацию, любые повреждения, которые происходят в геноме, способны создать крайне опасную ситуацию для клет-

ки. Механизмы повреждений ДНК, индуцированных фотодинамической терапией, пока не очень понятны. ФДТ может привести к окислению оснований, полимеризации нитей ДНК или обмену родственными хроматидов (структурных элементов хромосом) [23-25].

В нашем исследовании после фотодинамического воздействия на культуру клеток меланомы был зафиксирован ранний и поздний апоптоз. При этом индукция раннего апоптоза не зависела от концентрации фотосенсибилизатора и происходила даже при минимальных его дозах. Однако при увеличении времени лазерного облучения и, таким образом, поглощенной дозы света, происходил более быстрый переход фотосенсибилизированных опухолевых клеток в позднюю фазу апоптоза.

Заключение

Фотодинамическая терапия является одним из наиболее перспективных терапевтических методов, которые активно развиваются в онкологии в последние 30 лет. Несмотря на огромное количество научных статей, опубликованных на эту тему в последние годы, мы еще далеки от ясного понимания молекулярных механизмов гибели клеток опухоли после фотодинамического воздействия. Опубликованные отчеты полны противоречивых результатов. Одной из возможных причин этих расхождений являются чрезвычайно сложные взаимодействия между светом, фотосенсибилизатором, молекулярным кислородом и внутриклеточными структурами. Будущие исследования должны быть комплексными и включать в себя анализ многих компонентов фотодинамического действия. Выяснение механизмов фотоиндуцированной клеточной гибели позволит создать более эффективные схемы лечения онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2009 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: ООО "Антиф", 2011. – 260 с.
2. Филоненко Е.В., Серова Л.Г., Урлова А.Н. Фотодинамическая терапия больных с внутрикожными метастазами меланомы // *Biomedical Photonics*. – 2015. – Т. 4, № 2. – С. 22-25.
3. Мерабишвилли В.М. Выживаемость онкологических больных. – СПб: ООО "Фирма Коста", 2006. – 438 с.
4. Балдуева И.А. Иммунологические особенности взаимоотношения опухоли и организма при меланоме // *Практическая онкология*. – 2001. – № 4(8). – С. 37-41.
5. Gollnick S., Evans S., Baumann H. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation // *Br. J. Cancer*. – 2003. – Vol. 88. – P. 1772-9.
6. Gollnick S., Vaughan L., Henderson B. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy // *Cancer Res*. – 2002. – Vol. 62. – P. 1604-8.
7. Gollnick S.O., Brackett C.M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy // *Immunol Res*. – 2010. – Vol. 46(1-3). – P. 216-26.

REFERENCES

1. *Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2009 godu (zabolevaemost' i smertnost')* / (Malignant neoplasms in Russia in 2009 (incidence and mortality), by eds. V.I. Chissoy, V.V. Starinskii, G.V. Petrova. Moscow, OOO Antif Publ., 2011. 260 p.
2. Filonenko E.V., Serova L.G., Urlova A.N. Photodynamic therapy in patients with skin metastases of melanoma, *Biomedical Photonics*, 2015, Vol. 4, No. 2, pp. 22-25. (in Russian).
3. Merabishvili V.M. *Vyzhivaemost' onkologicheskikh bol'nykh* (Survival rate of cancer patients). Saint Petersburg, OOO Firma Kosta Publ., 2006. 438 p.
4. Baldueva I.A. Immune characteristics of tumor-host interaction in melanoma, *Prakticheskaya onkologiya*, 2001, No. 4(8), pp. 37-41. (in Russian).
5. Gollnick S., Evans S., Baumann H. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation, *Br. J. Cancer*, 2003, Vol. 88, pp. 1772-9.
6. Gollnick S., Vaughan L., Henderson B. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy, *Cancer Res*, 2002, Vol. 62, pp. 1604-8.

8. Preise D., Oren R, Glinert I., et al. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity // *Cancer. Immunol. Immunother.* – 2009. – Vol. 58. – P. 71-84.
9. Preise D., Scherz A., Salomon Y. Antitumor immunity promoted by vascular occluding therapy: lessons from vascular-targeted photodynamic therapy (VTP) // *Photochem Photobiol Sci.* – 2011. – Vol. 10(5). – P. 681-8.
10. Huang Z., Xu H., Meyers A.D., et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors-potential and technical challenges // *Technol Cancer Res Treat.* – 2008. – Vol. 7(4). – P. 309-20.
11. Mroz P., Szokalska A., Wu M.X., Hamblin M.R. Photodynamic Therapy of Tumors Can Lead to Development of Systemic Antigen-Specific Immune Response // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5(12). – P. 151-94.
12. Abels C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT) // *Photochem Photobiol Sci.* – 2004. – No. 3. – P. 765-71.
13. Golab J., Wilczynski G., Zagodzoon R., et al. Potentiation of the anti-tumor effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF // *Br. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 82(8). – P. 1485-91.
14. Van Duijnhoven F.H. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review // *Immunobiology.* – 2003. – Vol. 207. – P. 105-13.
15. Акопов А.Л., Казаков Н.В., Русанов А.А., Карлсон А. Механизмы фотодинамического воздействия при лечении онкологических больных // *Biomedical Photonics.* – 2015. – Т. 4, № 2. – С. 9-16.
16. Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1704. – P. 59-86.
17. Kiesslich T., Plaetzer K., Oberdanner C.B., et al. Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction // *FEBS Lett.* – 2005. – Vol. 579. – P. 185-190.
18. Oberdanner C.B., Kiesslich T., Krammer B., Plaetzer K. Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis // *Photochem Photobiol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 695-703.
19. Филоненко Е.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия – обоснование применения и возможности в онкологии // *Biomedical Photonics.* – 2014. – Т. 3, № 1. – С. 3-7.
20. Wyld L., Reed M.W., Brown N.J. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type // *Br. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 84. – P. 1384-86.
21. Reed M., Miller F., Weiman T., et al. The effect of photodynamic therapy on the microcirculation // *J. Surg. Res.* – 1988. – Vol. 45. – P. 452-9.
22. Oleinick N., Morris R., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why and how // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – Vol. 1. – P. 1-7.
23. Hayle A.K., Ward T.H., Moore J.V. DNA damage and repair in Gorlin syndrome and normal fibroblasts aer aminolevulinic acid photodynamic therapy: a comet assay study // *Photochem. Photobiol.* – 2003. – Vol. 78. – P. 337-41.
24. McNair F.I., Marples B., West C.M., Moore J.V. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells aer photodynamic therapy using hematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin // *Br J Cancer.* – 1997. – Vol. 75. – P. 1721-9.
25. Woods J.A., Traynor N.J., Brancalion L., Moseley H. The effect of photofrin on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study // *Photochem. Photobiol.* – 2004. – Vol. 79. – P. 105-13.
7. Gollnick S.O., Brackett C.M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy, *Immunol Res.*, 2010, Vol. 46(1-3), pp. 216-26.
8. Preise D., Oren R, Glinert I., Kalchenko V., Jung S., Scherz A., Salomon Y. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity, *Cancer. Immunol. Immunother.*, 2009, Vol. 58, pp. 71-84.
9. Preise D., Scherz A., Salomon Y. Antitumor immunity promoted by vascular occluding therapy: lessons from vascular-targeted photodynamic therapy (VTP), *Photochem Photobiol Sci.*, 2011, Vol. 10(5), pp. 681-8.
10. Huang Z., Xu H., Meyers A.D., Musani A.I., Wang L., Tagg R., Barqawi A.B., Chen Y.K. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors-potential and technical challenges, *Technol Cancer Res Treat*, 2008, Vol. 7(4), pp. 309-20.
11. Mroz P., Szokalska A., Wu M.X., Hamblin M.R. Photodynamic Therapy of Tumors Can Lead to Development of Systemic Antigen-Specific Immune Response, *PLoS ONE*, 2010, Vol. 5(12), pp. 151-94.
12. Abels C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT), *Photochem Photobiol Sci.*, 2004, No. 3, pp. 765-71.
13. Golab J., Wilczynski G., Zagodzoon R., Stoklosa T., Dabrowska A., Rybczynska J., Wasik M., Machaj E., Olda T., Kozar K., Kaminski R., Giermasz A., Czajka A., Lasek W., Feleszko W., Jakobisiak M. Potentiation of the anti-tumor effects of Photofrin-based photodynamic therapy by localized treatment with G-CSF, *Br. J. Cancer.*, 2000, Vol. 82(8), pp. 1485-91.
14. Van Duijnhoven F.H. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review, *Immunobiology*, 2003, Vol. 207, pp. 105-13.
15. Akopov A.L., Kazakov N.V., Rusanov A.A., Karlson A. The mechanisms of photodynamic action for treating of cancer patients, *Biomedical Photonics*, 2015, Vol. 4, No. 2, pp. 9-16. (in Russian).
16. Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2004, Vol. 1704, pp. 59-86.
17. Kiesslich T., Plaetzer K., Oberdanner C.B., Berlanda J., Obermair F.J., Krammer B. Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction, *FEBS Lett.*, 2005, Vol. 579, pp. 185-190.
18. Oberdanner C.B., Kiesslich T., Krammer B., Plaetzer K. Glucose is required to maintain high ATP-levels for the energy-utilizing steps during PDT-induced apoptosis, *Photochem Photobiol.*, 2002, Vol. 76, pp. 695-703.
19. Filonenko E.V. Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy: justification of applications and opportunities in oncology, *Biomedical Photonics*, 2014, Vol. 3, No. 1, pp. 3-7. (in Russian).
20. Wyld L., Reed M.W., Brown N.J. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type, *Br. J. Cancer.*, 2001, Vol. 84, pp. 1384-86
21. Reed M., Miller F., Weiman T., Tseng M.T., Pietsch C.G. The effect of photodynamic therapy on the microcirculation, *J. Surg. Res.*, 1988, Vol. 45, pp. 452-9.
22. Oleinick N., Morris R., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why and how, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, Vol. 1, pp. 1-7.
23. Hayle A.K., Ward T.H., Moore J.V. DNA damage and repair in Gorlin syndrome and normal fibroblasts aer aminolevulinic acid photodynamic therapy: a comet assay study, *Photochem. Photobiol.*, 2003, Vol. 78, pp. 337-41.
24. McNair F.I., Marples B., West C.M., Moore J.V. A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells aer photodynamic therapy using haematoporphyrin derivative, methylene blue and meso-tetrahydroxyphenylchlorin, *Br J Cancer*, 1997, Vol. 75, pp. 1721-9.
25. Woods J.A., Traynor N.J., Brancalion L., Moseley H. The effect of photofrin on DNA strand breaks and base oxidation in HaCaT keratinocytes: a comet assay study, *Photochem. Photobiol.*, 2004, Vol. 79, pp. 105-13.